



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

RAFAELA MENDONÇA BAGGIO

**INVESTIGAÇÃO DA FORMAÇÃO DE INFLAMASSOMA EM
PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

CAMPINAS

2019

RAFAELA MENDONÇA BAGGIO

INVESTIGAÇÃO DA FORMAÇÃO DE INFLAMASSOMA EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME

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 RAFAELA MENDONÇA BAGGIO, E ORIENTADA PELA
PROFA. DRA. NICOLA AMANDA CONRAN ZORZETTO

CAMPINAS

2019

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2016/08729-8; CAPES

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

B146i Baggio, Rafaela Mendonça, 1990-
Investigação da formação de inflamassoma em pacientes com anemia falciforme / Rafaela Mendonça Baggio. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

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

1. Anemia falciforme. 2. Inflamação. 3. Inflamassomos. 4. Interleucina-18. 5. Interleucina-1beta. I. Zorzetto, Nicola Amanda Conran, 1972-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Investigation of inflammasome formation in sickle cell anemia patients

Palavras-chave em inglês:

Sickle cell anemia

Inflammation

Inflammasomes

Interleukin-18

Interleukin-1beta

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Nicola Amanda Conran Zorzetto [Orientador]

Fabiola Traina

Erich Vinicius de Paula

Alessandra Gambeiro

Vanessa Moreira

Data de defesa: 08-03-2019

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

RAFAELA MENDONÇA BAGGIO

ORIENTADORA: PROFA. DRA. NICOLA AMANDA CONRAN ZORZETTO

MEMBROS:

1. PROFA. DRA. NICOLA AMANDA CONRAN ZORZETTO

2. PROFA. DRA. FABÍOLA TRAINA

3. PROF. DR. ERICH VINICIUS DE PAULA

4. PROFA. DRA. ALESSANDRA GAMBEIRO

5. PROF. DRA. VANESSA MOREIRA

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 da Defesa: 08/03/2019

*Dedico esta tese a mulher mais
incrível, corajosa e sábia que já tive
a oportunidade de conhecer...ela
que não é conhecedora de livros,
mas que me ensinou os valores
mais preciosos que foram
essenciais para chegar até aqui!
Minha amada e querida Mãe.*

*A sabedoria é a coisa principal; adquiere, pois, a sabedoria;
sim, com tudo o que possuis, adquiere o conhecimento.*

Provérbios 4.7

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me fortalecer nos momentos de dificuldades e renovar a minha fé diariamente, a Ele eu agradeço por todas as oportunidades e sonhos realizados durante toda a minha vida.

Ao meu esposo Rafael Lélis Baggio, por ser meu companheiro, amigo, meu amor e por sempre cuidar de mim nos momentos bons e difíceis, por acreditar no meu sonho e dividir comigo toda essa trajetória, com certeza sem seu apoio tudo seria mais difícil.

À minha mãe Valdenice Pereira Mendonça, que sempre me ensinou a lutar por aquilo que eu acredito ser o melhor para mim, que sempre se dedicou para que eu pudesse chegar até aqui, que sempre esteve presente com um abraço e palavras positivas e que acima de tudo me ensinou a ter fé e a nunca desistir dos meus sonhos.

Aos meus irmãos, Ricardo e Renata, que me apoiaram em todas as minhas escolhas e sempre estiveram por perto com uma palavra de força e carinho, sem dúvida, eles foram essenciais nessa trajetória.

À minha amada família, meu Pai (Daniel), meus sobrinhos (Ana Luiza e Ricardo), minha cunhada (Gabriele), meus tios (Aparecida e Alexandre *in memoriam*), que sempre me apoiaram através de carinho e orações.

À família Lélis Baggio (Jorge, Andrea, Katia, Daniel, Stefano e Lorenzo), por todo o apoio e força durante essa trajetória.

À minha orientadora Nicola Conran, por ser uma cientista e acima de tudo uma mulher brilhante, acessível, inteligente e admirável. Agradeço diariamente a oportunidade de ter desenvolvido meu projeto de doutorado ao lado de alguém que me ensinou a importância de se fazer um excelente trabalho e que confiou a mim um projeto tão desafiador e surpreendente.

A todos os meus amigos, que de forma direta ou indireta torceram por mim, estiveram presentes e que hoje compartilham da minha conquista!

À minha amiga Patrícia Barbalho, que foi essencial durante a minha caminhada, por compartilhar da mesma profissão e entender os desafios de um doutorado, sempre esteve presente com seu apoio e ombro amigo.

À minha amiga Claudia Bertolacini, que me acompanhou desde a minha primeira iniciação científica e até hoje é alguém que posso contar com sua amizade e companheirismo.

À minha amiga Mariane Teixeira, por compartilhar todos estes anos ao meu lado, com carinho, conselhos e acima de tudo com a sua amizade que é tão importante para mim!

Agradeço as amizades que o doutorado me concedeu e que fizeram do meu dia-a-dia mais alegre: Cecilia, Flavia Garcia, Cris, Marina, Pri, Selma e Dani.

As minhas amigas da bancada rosa (Flávia, Bruna, Van, Fer, Isa e Rita) do laboratório da Dra. Sara Saad que me adotaram como membro e que foram essenciais durante todos estes anos.

Agradeço a todos os colegas do laboratório de Inflamação Vascular, que de alguma forma me ajudaram na realização deste projeto: Flávia Garcia, Flávia Costa, Angélica, Venina, Cecília, Juliete, Wilson, Lediane, Lidiane, Pamela, Hannan, Erika e Fernanda.

Agradeço especialmente a Flavia Garcia, que me ajudou na realização dos experimentos do Amnis e que sempre esteve disponível para discutir meus resultados ou simplesmente por me ouvir falando sobre os “inflamassomas” incansavelmente!

Agradeço a Flávia Costa, por me ajudar nos experimentos de PCR real time e ajuda nas compras de reagentes para o laboratório, como no gerenciamento do mesmo.

Aos colegas do laboratório de Biologia Molecular: Cris, Marina, Dani, Selma, Pri, Myriam, Rê, Athos, Thaís, Priscila, Fábio, Renata, Helga, Ingrid, Alexandre e Flávia Recife, que fizeram parte da história desta tese.

Aos funcionários do laboratório de Biologia Molecular do Dr. Fernando Costa: Ucha, Dul, Carol, Carla, Pri, Dani, Ana Luísa. Agradeço pelo aprendizado que obtive com vocês durante este período no laboratório.

Aos funcionários do laboratório de Biologia Molecular da Dr. Sara Saad: Karla, Fernanda, Simone, Dil, Adriana, Audrey, Lena, Irene e Ana Leda. Agradeço pelo aprendizado que obtive com vocês durante este período no laboratório.

Agradeço especialmente alguns funcionários que me ajudaram por um longo período: Karla, Fernanda, Irene e Ana Leda. Obrigada por toda paciência e ajuda

no que foi necessário para a realização dos experimentos de Western Blotting e citometria de fluxo.

Agradeço ao INFABIC (Instituto nacional de Ciência e tecnologia de fotônica aplicada a biologia celular).

Agradeço as enfermeiras da coleta de sangue do ambulatório de Hematologia e do Centro de doação de sangue, o trabalho de vocês foi primordial para que este projeto fosse executado.

Ao Professor Dr. Fernando Ferreira Costa, por permitir o uso de seu laboratório e reagentes para o desenvolvimento deste projeto.

À Professora Dra. Sara Saad, por me acolher em seu laboratório quando fui aluna de treinamento técnico e por permitir o uso de seu laboratório e reagentes para o desenvolvimento deste projeto.

À professora Dra. Lisa Bouchier-Hayes e Prof. Dr. Jonathan Flannagan, por me receber como aluna de doutorado sanduiche no Texas Children's Hospital e por me ensinar tanto. Essa experiência foi fundamental para o meu crescimento profissional e pessoal.

Agradeço aos colegas (Beatriz, Vanda e Katie) e funcionários do Texas Children's Hospital e Baylor College of Medicine, por me receber com tanto carinho e respeito! Sou grata pelo tempo que passei nesse Hospital e o tanto que me foi ensinado.

Agradeço a minha roommate e amiga Milica Ilic, que tive a oportunidade de conhecer durante o meu estágio no exterior e que foi uma pessoa que me ajudou muito na minha estadia por lá.

Agradeço a todos os pacientes envolvidos neste estudo, que muitas vezes confiaram a mim às suas dores (emocional e física) e me fizeram ter cada vez mais vontade de me dedicar a este projeto! Espero um dia, por meio do meu trabalho científico, recompensar toda a amostra doada por cada participante.

Agradeço ao auxílio financeiro referente ao processo *nº 2016/08729-8*, oferecido através da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (*FAPESP*).

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

RESUMO

A hemoglobinopatia, anemia falciforme (AF), apresenta uma fisiopatologia complexa que resulta num estado inflamatório crônico, fundamental para o início e propagação dos processos vaso-oclusivos associados à doença, bem como muitas das suas variáveis manifestações, como a síndrome torácica aguda, hipertensão pulmonar, AVC e nefropatia. Acredita-se que o estado inflamatório crônico da AF seja resultado de processos de hemólise intravascular e de isquemia/reperfusão; por sua vez, o processo vaso-oclusivo é desencadeado pela adesão dos glóbulos vermelhos e leucócitos ao endotélio da microcirculação, formando uma barreira física para o sangue. Atualmente, o tratamento da AF é limitado à terapia de transfusão de eritrócitos, transplante de células tronco-hematopoiéticas e alguns farmacoterápicos (como a hidroxiureia) que mostram eficácia em pacientes AF. Acreditamos que a formação de estruturas do inflamassoma nos leucócitos de indivíduos com AF possa contribuir de forma significativa para o seu estado inflamatório. O inflamassoma é um complexo proteico multimérico formado em células inflamatórias, sendo constituído muitas vezes por uma molécula sensora, (como a NLRP3), uma proteína adaptadora, denominada ASC (Apoptosis associated speck like protein containing a CARD), e a caspase-1 (inflamassoma clássico). A formação do inflamassoma pode ser estimulada por uma série de moléculas liberadas durante um processo infeccioso ou durante danos teciduais/desequilíbrios metabólicos; estas moléculas são conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs), respectivamente. Este projeto teve como objetivo comprovar (ou não) a existência da formação de inflamassoma nos neutrófilos e monócitos de indivíduos com AF, bem como identificar os componentes deste complexo e os possíveis DAMPs que podem contribuir para a sua formação nesta doença. As técnicas utilizadas para este estudo foram: ELISA, citometria de Fluxo, imunofluorescência e microscopia confocal, citometria de fluxo com imagem, PCR quantitativo (PCRq), *Western blotting*, co-imunoprecipitação, cultura de células primárias e de linhagem, clonagem de plasmídeos, ensaios de transfecção e a técnica de *Bimolecular fluorescence complementation*. Concentrações circulantes de IL-1 β e IL-18 foram encontradas significativamente elevadas na população de pacientes com AF estudada. Além disso,

apresentamos dados inéditos que indicam que neutrófilos de indivíduos AF (neutrófilos AF) liberam IL-1 β em uma quantidade aumentada, quando comparado a neutrófilos de indivíduos saudáveis. No entanto, de forma interessante, o processamento dessa citocina nos neutrófilos AF foi dependente da atividade aumentada de caspase-1, mas não da participação do sensor NLRP3 ou da molécula ASC. Assim sendo, sugerimos que o processamento de IL-1 β por neutrófilos em indivíduos AF não é mediado pela formação clássica do inflamassoma NLRP3. Em monócitos de indivíduos AF, observamos o processamento e liberação de IL-1 β e IL-18, mas não encontramos diferenças significativas na sua liberação para o meio extracelular em comparação aos monócitos de indivíduos saudáveis. No entanto, dado o número aumentado desses leucócitos na circulação de indivíduos AF, não podemos excluir a participação dos monócitos nas concentrações elevadas de IL-1 β e IL-18 observadas na AF. Evidências indicam que este inflamassoma, formado em monócitos AF, é mediado pela forma clássica do inflamassoma NLRP3 e necessita do recrutamento da molécula ASC para ativação de caspase-1. DAMPs são significativamente aumentados no meio circulante em indivíduos AF; demonstramos também que o plasma de indivíduos AF é capaz de estimular a formação do inflamassoma em neutrófilos e, mais importante, é capaz de ativar a maquinaria inflamatória em células não imunes transfectadas. Esses achados são importantes para o aprimoramento da nossa compreensão da fisiopatologia da AF, uma vez que mecanismos que induzem o processamento da IL-1 β amplificam as respostas inflamatórias e podem representar importantes alvos terapêuticos para a doença.

Palavras chave: Anemia falciforme, inflamação, inflamassomos, interleucina-18, interleucina-1beta.

ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) has a complex pathophysiology that results in a chronic inflammatory state, which plays a fundamental role in the initiation and propagation of the vaso-occlusive processes that are associated with the disease, as well as many of its variable manifestations, such as acute chest syndrome, pulmonary hypertension, stroke and nephropathy. It is probable that the chronic inflammatory state in SCA occurs as the result of intravascular hemolysis and ischemia/reperfusion events. Consequently, the vaso-occlusive process is initiated by the adhesion of red blood cells and activated leukocytes to the activated endothelium of the microcirculation, forming a physical barrier to blood flow. Currently, the treatment of SCA is limited to blood transfusion, hematopoietic stem cell transplant and some pharmacotherapeutics, such as hydroxyurea. We postulate that the formation of the inflammasome complex in the leukocytes of patients with SCA may potentially contribute significantly to the inflammatory state in this disease. The inflammasome is a multimeric protein complex, formed in inflammatory cells, which often consists of a sensor molecule (such as NLRP3), an adapter protein called ASC (Apoptosis associated speck like protein containing a CARD) and caspase-1. The formation of the inflammasome can be stimulated by a number of molecules released during an infectious process or during tissue damage / metabolic imbalances; these molecules are known as pathogen associated molecular patterns (PAMPs) and damage associated molecular patterns (DAMPs), respectively. The aim of this project was to demonstrate the existence of inflammation in the neutrophils and monocytes of individuals with SCA, as well as to identify the components of this complex and the possible DAMPs that may contribute to inflammasome formation in this disease. The techniques used for this study were: ELISA, flow cytometry, immunofluorescence and confocal microscopy, imaging flow cytometry, quantitative PCR (PCRq), Western blotting, co-immunoprecipitation, culture of primary and lineage cells, plasmid cloning, transfection assays, and Bimolecular Fluorescence complementation. Circulating concentrations of both IL-1 β and IL-18 were significantly elevated in the population of patients with SCA studied. Furthermore, novel findings demonstrate that neutrophils from the SCA individuals (SCA neutrophils) studied release IL-1 β in increased amounts, when compared to neutrophils from healthy individuals. However, interestingly, while

the processing of this cytokine in SCA neutrophils was dependent on increased caspase-1 activity, it was independent of the participation of NLRP3 and the ASC molecule. Therefore, we suggest that the processing of IL-1 β by neutrophils in SCA individuals is not mediated by the classic formation of the inflammatory molecule, NLRP3. In monocytes from SCA individuals, we observed the processing and release of IL-1 β and IL-18, but we did not find significant differences in their release to the extracellular medium, as compared to monocytes from healthy individuals; however, given the increased numbers of these leukocytes in the SCA circulation, we cannot exclude the participation of the monocytes in the elevated concentrations of IL-1 β and IL-18 observed in SCA. The inflammasome observed in SCA monocytes appears to be mediated by the classical NLRP3 inflammasome with recruitment of the ASC molecule for activation of caspase-1. Circulating DAMPs are significantly augmented in SCA individuals, and we also showed that the plasma of SCA individuals is able to stimulate the formation of inflammasome in neutrophils and, importantly, is able to activate the inflammasome machinery in transfected non-immune cells. These findings are of importance for the improvement of our understanding of the pathophysiology of SCA, since mechanisms that induce IL-1 β processing amplify inflammatory responses and may constitute important therapeutic targets for the disease.

Keywords: Sickle cell anemia, inflammation, inflammasomes, interleukin-18, interleukin-1beta.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Detalhes clínicos dos pacientes participantes deste estudo (população – Hemocentro, UNICAMP, Campinas, Brasil.....67

Tabela 2. Avaliação da liberação de pró-IL-1 β em lisado e sobrenadante de neutrófilos provenientes de indivíduos saudáveis e AF70

Tabela 3. Dados clínicos dos pacientes participantes deste estudo (população – Ambulatório de Hematologia Pediátrica – Texas Children’s Hospital/Houston-TX-EUA).....118

LISTA DE ABREVIATURAS

AF: anemia falciforme

AIM2: absent in melanoma-2 (AIM2)-like receptors

APC: allophycocyanin, aloficocianina

ASC: apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain

ATP: adenosina trifosfato

AVC: acidente vascular cerebral

BiFC: bimolecular fluorescence complementation

BIR: baculovirus inhibitor repeat

BSA: albumina sérica bovina

CARD: caspase recruitment domain

CIITA: transactivator de Classe II

CLR: C-type lectin receptors; receptores de lectina do tipo C

CTRL: indivíduos controles saudáveis

CVO: crises dolorosas vaso-oclusivas

DAMP: damage-associated molecular patterns; padrões moleculares associados ao dano

DNA: ácido desoxirribonucleico

DMSO: dimetilsulfóxido

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

EMA: agência europeia de medicamentos

ET: extrato total

ET-1: endotelina-1

L-glutamina: suplemento de aminoácido

FDA: the United States Food and Drug Administration

FITIC: fluorescein isothiocyanate; isotiocianato de fluoresceína

FN: fibronectina

GBT-440: voxelotor

GMI-1070: rivipansel

GSH: glutathionina

GVHD: graft versus host disease ou doença do enxerto contra hospedeiro

HbC: hemoglobina C

HbD: hemoglobina D

HbF: hemoglobina fetal

Hb-Fe³⁺: produto da hemoglobina oxidada

HLA: antígenos Leucocitários Humanos

HMGB-1: proteína do grupo 1 de mobilidade alta

HSP70: proteína de choque térmico 70

HbS: hemoglobina S

HbSC: hemoglobina SC

HPLC: cromatografia líquida de alta pressão

HU: hidroxiuréia

IB: *immunoblotting*

ICAM-1: molécula de adesão intercelular 1

IFN: interferon

IgG: imunoglobulina não específico

IL: interleucina

iNKT: células naturais killer; “ células exterminadoras naturais”

IP: imunoprecipitação

IRF: fator de resposta

LRR: repetições ricas em leucinas

NAD: nicotinamida

NAIP: proteínas neuronais inibidoras de apoptose

NBD: domínio central NACHT

NET: neutrophil extracellular traps; “armadilhas” extracelulares de neutrófilos

NF-κB: fator nuclear kappa B

NLRP: the nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) - Leucine Rich Repeats (LRR)-containing receptors; receptores do tipo NOD

NO: óxido nítrico

NOD: nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors

NRTI: nucleósido da transcriptase reversa

MAP: proteínas quinases ativadas por mitógenos

PAMP: pathogen-associated molecular patterns; padrões moleculares associados à patógenos

Pam3: agonista de TLR1/TLR2

PBMC: células mononucleares

PerCP: peridinin Chlorophyll Protein

P2X7: receptor de ATP

PRR: pattern recognition receptors; receptores de reconhecimento de padrões

PYD: pyrin domain; domínio pirina

PYRIN: pyrin e HIN domain-containing protein

ROS: espécies reativas de oxigênio

RLH: retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-1)-like receptors (RLR; aka RIG-1-like helicases; receptores do tipo RIG

SEG-101: crizanlizumabe

TIR: domínio intracelular C terminal

TLR: toll-like receptor; receptores do tipo toll

TNF: fator de necrose tumoral

VCAM-1: vascular cell adhesion molecule 1; molécula de adesão vascular 1

YFP: Yellow fluorescent protein

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de vaso-oclusão na anemia falciforme 34

Figura 2. Ativação do inflamassoma e seus componentes 44

Figura 3. Mecanismo de ativação (*priming*) do inflamassoma NLRP3 e liberação de IL-1 β 47

Figura 4. Determinação dos níveis plasmáticos de IL-1 β e IL-18. Níveis de (A) IL-1 β e (B) IL-18 no plasma de indivíduos controles (CTRL, n= 11-12) e indivíduos portadores de AF (AF, n= 23). Os níveis de IL-1 β e IL-18 foram avaliados através de ELISA. Para o teste estatístico usou-se o teste de Mann-Whitney, ***p<0.001; comparado ao grupo controle..... 68

Figura 5. Determinação dos níveis de IL-1 β no sobrenadante de neutrófilos. Liberação de IL-1 β pelos neutrófilos de indivíduos controles (CTRL, n=8) e de indivíduos portadores de AF (AF, n=19). Células isoladas foram incubadas (2h, 37°C, 5% CO₂) e as concentrações de IL-1 β no sobrenadante foram avaliados através do ensaio de ELISA. Para o teste estatístico usou-se o teste de Mann-Whitney. ****p< 0.0001; comparado ao grupo controle 69

Figura 6. Avaliação da ativação de caspase-1 em neutrófilos em indivíduos controles e AF. Avaliação da ativação de caspase-1 (FLICA⁺) em neutrófilos (CD66b⁺) de indivíduos controles (CTRL, N=9) e indivíduos portadores de AF (AF, N= 21 [A] e 15 [B]). A ativação de caspase-1 foi avaliada através do kit FAM FLICA Caspase 1; (A) Ativação é expressa como porcentagem dos neutrófilos (CD66⁺) positivas para FLICA; (B) avaliação da contagem de neutrófilos com caspase-1 ativada na circulação sanguínea. Para o teste estatístico usou-se o teste de Mann-Whitney. *** p< 0.001; comparado ao grupo controle 72

Figura 7. Avaliação da ativação de caspase-1 em neutrófilos. Avaliação da atividade de caspase-1 em neutrófilos de indivíduos controles saudáveis (CTRL) e indivíduos portadores de AF (AF), utilizando citometria de fluxo com imagem. (A) Imagens representativas de neutrófilos CTRL e AF com ≥ 1 speck de caspase-1 (observados como aglomerados puntiformes de caspase-1 ativa). A ativação de caspase-1 pode ser observada em verde (que representa a clivagem peptídica da sonda FAM-YVAD-FMK-FLICA). Neutrófilos foram identificados por citometria de fluxo e as imagens foram obtidas (Amnis ImageStream Mark II) com aumento de 40X para a caracterização dos aglomerados de caspase-1 ativada. (B) Porcentagem de neutrófilos provenientes de indivíduos controles saudáveis (CTRL; N=6) e indivíduos portadores de AF (N=12), com múltiplas *specks* de caspase-1 ativada. Para o teste estatístico usou-se o teste de two-

way ANOVA seguido de Bonferroni com Múltiplas comparações, * $p < 0,05$, comparado ao grupo controle 74

Figura 8. Avaliação da liberação de IL-1 β dependente de caspase-1 em neutrófilos. Neutrófilos isolados de controles saudáveis (CTRL; N=3) foram ativados ou não com LPS (100 ng/ml) e ATP (2,5 mM) e co-incubados com YVAD (40 μ M); neutrófilos (não estimulados) de indivíduos portadores de AF (AF; N=10) também foram incubados na presença ou ausência de YVAD. Os dados estão representados como média $\pm$ SEM. Para o teste estatístico usou-se o teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunns. ## $p < 0.01$, comparado ao CTRL; * $p < 0.05$; comparado ao grupo CTRL; ** $p < 0.01$, comparado ao grupo AF 75

Figura 9. Avaliação da aglomeração da molécula ASC em neutrófilos. Aglomeração da molécula ASC em neutrófilos representativas de (A) indivíduos controles (CTRL) sem estímulo, (B) indivíduos controles, quando estimulados com ATP (2,5 mM) por 30 min; (C) de indivíduo portador de AF sem estímulo e com estímulo com ATP (D). (E) quantificação da porcentagem de neutrófilos de indivíduos CTRL (N=2) e de indivíduos AF (N= 7) com aglomerados de ASC. Para o teste estatístico usou-se o teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunns.* $p < 0.05$, comparado ao grupo CTRL. As imagens foram feitas no microscópio confocal invertido LSM 780 NLO, utilizando os lasers Argon (488) e NLO Mai Tai (DAPI), com aumento de 60 x. Anticorpos: anticorpo primário anti-ASC, anticorpo secundário conjugado ao alexa fluor 488 (verde), Wheat germ Agglutinin, alexa fluor 555 (vermelho) e Prolong® Gold DAPI (azul). Estas imagens são representativas de um N experimental de 4 indivíduos controles e 7 indivíduos portadores de AF 77

Figura 10. Observação da oligomerização da molécula ASC em neutrófilos. Avaliação da expressão e oligomerização de ASC specks, visualizadas por citometria de fluxo com imagem (Amnis ImageStream®) em neutrófilos indivíduos controles e indivíduos AF. (A) Imagens de neutrófilos de indivíduos saudáveis (CTRL) e indivíduos portadores de AF (AF) com ASC oligomerizada. (B) Porcentagens de neutrófilos de indivíduos controles (CTRL; N=7) e de indivíduos portadores de AF (N=12) que demonstraram *specks* de ASC. Para o teste estatístico usou-se o teste de Mann-Whitney, Valores, media $\pm$ SEM; * $p < 0.05$, comparado ao grupo controle 79

Figura 11. Observação da expressão proteica da molécula ASC em neutrófilos. Neutrófilos foram isolados de indivíduos CTRL (N=2) e de um indivíduo portador de AF (N=1) e a expressão da molécula adaptadora ASC foi detectada por Western blotting. Os lisados celulares (100 μ g) foram fracionados em gel de poliacrilamida 15%, transferidos para membrana e esta foi incubada com anticorpo anti-ASC. (A) *Western Blotting* representativo da expressão de ASC em indivíduos controles (CTRL) e indivíduos AF (AF); (B) quantificação da densidade relativa das bandas.....81

Figura 12. Investigação da interação da ASC e pró-caspase-1 em neutrófilos de indivíduos controles e portadores de AF. (A) Extratos celulares de neutrófilos foram imunoprecipitados com IgG não específico ou anti-ASC de coelho. Os imunoprecipitados (IP) e extratos totais foram fracionados em gel de poliacrilamida 15%, transferidos para membrana e esta foi incubada com IgG anti-caspase-1 (painéis

superiores). Uma banda de pró-caspase 1 (50-45 kDa) co-imunoprecipitou especificamente com ASC (painel superior). O painel do meio mostra a caspase-1 em sua forma clivada (subunidade p20). Posteriormente, a membrana foi incubada com o anticorpo anti-ASC para confirmação da presença de ASC nas membranas (24 kDa, painel inferior). Todas as bandas foram detectadas com anticorpo secundário conjugada a HRP e as bandas visualizadas com reagente ECL. Densidade relativa da expressão de ASC. (B); de para o-caspase-1/ASC (C); e de caspase-1 clivada (D). Dados são referentes aos pools de proteínas; cada pool consiste da extração proteica de neutrófilos provenientes de 6 indivíduos. IP=imunoprecipitação; IgG= imunoglobulina não específico; ET= extrato total; IB=immunoblotting; CTRL= indivíduos controles saudáveis; AF= indivíduos portadores de AF. Tetrâmero p20= caspase-1 clivada 83

Figura 13. Avaliação da co-localização de caspase-1 ativada e ASC em neutrófilos através da citometria de fluxo com imagem; (A) imagens representativas de neutrófilos de indivíduos controle (CTRL; N=6) e de indivíduos portadores de AF (N=12), após marcação para caspase-1 ativa (Flica; FAM-YVAD-FMK, verde) e com anti- ASC alexa flúor 647(vermelho); ampliação 60x. (B) Porcentagem de neutrófilos que apresentarem co-localização de caspase-1 e ASC. Para o teste estatístico usou-se o teste de two-way ANOVA seguido de Bonferroni com Múltiplas comparações, $P > 0,05$ comparando CTRL com AF para cada parâmetro..... 85

Figura 14. Liberação de IL-1 β por neutrófilos de indivíduos AF após tratamento com droga inibidora da molécula ASC. Neutrófilos isolados de indivíduos portadores de AF (AF, N=8) e co-incubados com o inibidor de ASC, CAPE (1 e 5 μ M, 1 hora). Concentrações de IL-1 β nos sobrenadantes foram determinadas através de ELISA. Os dados estão representados como média $\pm$ SEM. $P > 0,05$ 86

Figura 15. Avaliação da liberação de IL-1 β dependente do receptor NLRP3 em neutrófilos. Neutrófilos isolados de controles saudáveis foram ativados ou não com LPS (100 ng/ml) e ATP (2,5 Mm) (CTRL, N=6) e co-incubados, ou não, com o inibidor de NLRP3, MCC950 (5 μ M). Neutrófilos de indivíduos portadores de AF (AF, N=10), também foram incubados na presença ou ausência de MCC950 (5 μ M). Os sobrenadantes foram retirados e armazenados para detecção da presença de IL-1 β . Os dados estão representados como média $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, comparado ao CTRL basal; # $p < 0.05$, comparado aos neutrófilos ativados com LPS/ATP; ●●● $p < 0.001$ comparado ao grupo CTRL. Para o teste estatístico usou-se o Kruskal-Wallis com pós teste de Dunns 88

Figura 16. Avaliação da expressão gênica dos receptores (NOD-like) e componentes do inflamassoma em neutrófilos. Expressão dos genes *NLRP3*, *NLRP1*, *NLRP6*, *NLRP12*, *ASC* e *Caspase-1* (envolvidos na formação de inflamassomas) em neutrófilos de indivíduos controles (N=6) e de indivíduos portadores de AF (N= 14). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (UA) da expressão gênica quando comparados com os genes de controle endógeno, ACTB e RPL13. Para o teste estatístico usou-se o teste de Mann-Whitney, Valores, média $\pm$ SEM; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$, comparado ao grupo controle..... 90

Figura 17. Avaliação da liberação de IL-1 β em sobrenadantes de monócitos. (A) Sobrenadante de monócitos de indivíduos controles (CTRL, N=6) e indivíduos

portadores de AF (AF, N=8), após incubação (2h, 37°C, 5% CO₂). Os níveis de IL-1 β foram avaliados através do ensaio de ELISA. Valores, media $\pm$ SEM e para o teste estatístico usou-se o teste não-pareado de Mann-Whitney. **p< 0,01; comparado ao grupo controle..... 91

Figura 18. Avaliação da liberação de IL-1 β de monócitos. Liberação de IL-1 β em sobrenadante de monócitos de indivíduos controles (CTRL, N= 3-5) e indivíduos portadores de AF (AF, N= 4-6), após incubação (37°C, 5% CO₂) por 1 hr (A); 3 hrs (B), 5 hrs (C) e 12 hrs (D); os níveis de IL-1 β foram avaliados através do ensaio de ELISA. Valores, media $\pm$ SEM e para o teste estatístico usou-se o teste não-pareado de Mann-Whitney; p>0.05 para todas as comparações 93

Figura 19. Avaliação da liberação de IL-18 em sobrenadantes de monócitos. (A) Sobrenadante de monócitos de indivíduos controles (CTRL, N=4) e indivíduos portadores de AF (AF, N=6), após incubação (1h, 37°C, 5% CO₂); (B) Sobrenadante de monócitos de indivíduos controles (CTRL, N=5) e indivíduos portadores de AF (AF, N=6), após incubação (3h, 37°C, 5% CO₂); (C) Sobrenadante de monócitos de indivíduos controles (CTRL, N=6) e indivíduos portadores de AF (AF, N=7), após incubação (5h, 37°C, 5% CO₂). Os níveis de IL-18 foram avaliados através do ensaio de ELISA. Valores, media $\pm$ SEM e para o teste estatístico usou-se o teste não-pareado de Mann-Whitney. P>0.05 para todas as comparações..... 94

Figura 20. Determinação da ativação da caspase-1 em monócitos de indivíduos portadores de anemia falciforme. Ativação de caspase-1 (FLICA-) em (A) monócitos clássicos (CD14⁺ CD16⁻); (B) monócitos não clássicos (CD 14⁺ CD16⁺); (C) número total de monócitos não-clássicos positivos para caspase-1 ativada na circulação sanguínea de indivíduos controles (CTRL, n= 13) e indivíduos portadores de AF (AF, n= 22). O número de monócitos positivos para caspase-1, foi calculado a partir do número total de monócitos obtidos através do hemograma. A ativação de caspase-1 foi avaliada através do kit FAM FLICA Caspase 1. Valores, media $\pm$ SEM e para o teste estatístico usou-se o teste não-pareado de Mann-Whitney; * p< 0.05; **** p< 0.0001, comparado ao grupo controle..... 96

Figura 21. Caracterização da ativação de caspase-1 em monócitos. Avaliação da atividade de caspase-1 em neutrófilos de indivíduos controles saudáveis (CTRL) e indivíduos portadores de AF (AF). (A) Imagens representativas de monócitos não-clássicos CTRL e de monócitos AF com ≥ 1 *speck* de caspase-1 (representado como aglomerados puntiformes de caspase-1 ativa, em verde). As imagens foram obtidas por citometria com imagem (Amnis ImageStream Mark II) com aumento de 40X. (B) Porcentagem de monócitos clássicos (CD14⁺CD16⁻) provenientes de indivíduos controles saudáveis (CTRL; N=7) e indivíduos portadores de AF (N=11); (C) Porcentagem de monócitos inflamatórios (CD14^{hi} CD16⁺) provenientes de indivíduos controles saudáveis (CTRL; N=8) e indivíduos portadores de AF (N=11); (D) Porcentagem de monócitos patrulheiros (CD14^{lo} CD16^{hi}) provenientes de indivíduos controles saudáveis (CTRL; N=7) e indivíduos portadores de AF (N=11) com múltiplas caspase-1 *specks*. Para análise estatística, usou-se o teste não-pareado de Mann-Whitney, p>0.05..... 98

Figura 22. Observação da oligomerização da molécula ASC em monócitos; representativas de (A) indivíduos controles sem estímulo (CTRL), (B) indivíduos controles, estimulados com ATP (2,5 mM) por 30 min (CTRL positivo); de indivíduo portador de AF sem estímulo (C) e com estímulo com ATP (D). As imagens foram feitas no microscópio confocal invertido LSM 780 NLO, utilizando os lasers Argon (488) e NLO Mai Tai (DAPI), com aumento de 60 x (INFABIC-UNICAMP). Anticorpos: anticorpo primário anti-ASC, anticorpo secundário conjugado ao alexa fluor 488 (verde), Wheat germ Agglutinin, alexa fluor 555 (vermelho) e Prolong® Gold DAPI (azul). Estas imagens são representativas de um N experimental de 6 indivíduos controles e 6 indivíduos portadores de AF 100

Figura 23. Observação da oligomerização da molécula ASC em subpopulações de monócitos através da técnica de citometria por imagem. Observação da oligomerização de ASC specks, visualizada por citometria de fluxo por imagem (Amnis ImageStream®); (A) Imagens representativas da oligomerização de ASC em monócitos inflamatórios; (B) Porcentagens de monócitos inflamatórios de indivíduos controles (CTRL; N=7) e de indivíduos portadores de AF (N=9) que demonstraram aglomerados de ASC (≥ 6 specks) (C) Porcentagens de monócitos clássicos de indivíduos controles (CTRL; N=7) e de indivíduos portadores de AF (N=9) que demonstraram aglomerados de ASC (≥ 6 specks). Para o teste estatístico usou-se o teste de Mann-Whitney, Valores, media $\pm$ SEM; * $p < 0,05$, comparado ao grupo controle 102

Figura 24. Avaliação da co-localização de caspase-1 ativada e ASC em monócitos por citometria de fluxo com imagem; (A) imagens representativas de monócitos de indivíduos controle (CTRL; N=7) e de indivíduos AF (N=10), apresentando co-localização de caspase-1 ativa (Flica; FAM-YVAD-FMK, verde) e vermelho - ASC (ampliação 60x); (B) Porcentagem de monócitos inflamatórios ($CD14^{hi}CD16^{+}$) co-localizados com caspase-1 e ASC; (C) Porcentagem de monócitos patrulheiros ($CD14^{lo}CD16^{hi}$) co-expressos com caspase-1 e ASC; (D) Porcentagem de monócitos clássicos ($CD14^{+}CD16^{-}$) co-localizados com caspase-1 e ASC. Para o teste estatístico usou-se o teste de Mann-Whitney, $P > 0.05$ 104

Figura 25. Co-imunoprecipitação da proteína ASC com caspase-1 em PBMC. (A) Extratos celulares de PBMC foram imunoprecipitados com IgG controle não específico de coelho ou IgG anti-ASC. Os imunoprecipitados (IP) e extratos totais foram fracionados em gel de poliacrilamida 15%, transferidos para membrana e esta foi incubada com anticorpo anti-caspase-1 (painéis superiores). Uma banda de pró-caspase 1 de peso molecular aproximado de 50-45 kDa co-imunoprecipitou especificamente com ASC (painel superior). No painel do meio, é possível observar a caspase-1 em sua forma clivada (subunidade p20). Posteriormente, a membrana foi incubada com o anticorpo anti-ASC para confirmação da presença de ASC nas membranas (24 kDa, painel inferior). Estes dados são referentes aos pools de proteínas; cada pool consiste da extração proteica de PBMC provenientes de 6 indivíduos. IP=imunoprecipitação; IgG= imunoglobulina controle de coelho; ET= extrato total (controle positivo); IB=immunoblotting; CTRL= indivíduos controles saudáveis; AF= indivíduos portadores de AF. Tetrâmero p20= caspase-1 clivada..... 106

Figura 26. Liberação de IL-1 β em monócitos após tratamento com inibidores do inflamassoma. (A) Monócitos isolados de indivíduos controles foram ativados ou não com LPS (100 ng/ml) e ATP (2,5 mM) (CTRL, N=3) e co-incubados, ou não, com os

inibidores de NLRP3, MCC950 (5 μ M), YVAD-FMK (40 μ M) e com BAY117082 (10 μ M); (B) Monócitos isolados de indivíduos AF (N=8) foram co-incubados com MCC950 (5 μ M), YVAD-FMK (40 μ M) e com BAY117082 (10 μ M) durante 1 hora. Os sobrenadantes foram retirados e armazenados para detecção da presença de IL-1 β . Os dados estão representados como média $\pm$ SEM. Para o teste estatístico usou-se o teste não-pareado de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn's. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ comparado ao não tratado 108

Figura 27. Liberação de IL-1 β em monócitos de indivíduos AF após incubação com inibidor da molécula ASC. Monócitos isolados de indivíduos portadores de AF (AF, N=3) e co-incubados com o inibidor de ASC - CAPE (1, 5 e 10 μ M). A IL-1 β foi determinada através de Kit de ELISA, em sobrenadantes de monócitos AF incubados por 1 hora. Os dados estão representados como média $\pm$ SEM. Para o teste estatístico usou-se o teste não-pareado de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn's. * $p < 0,05$; comparado ao grupo AF 109

Figura 28. Expressão proteica de NLRP3, ASC, caspase-1, IL-1 β em células mononucleares. Células mononucleares (PBMC) foram isolados de indivíduos CTRL e de indivíduos portadores de AF e a expressão dos componentes do inflamassoma foram detectados por Western blotting. Os extratos totais foram fracionados em gel de poliacrilamida 15%, transferidos para membrana e esta foi incubada com os anticorpos de interesse (A) *Western Blotting* representativo da densidade relativa de NLRP3; (B) densidade relativa de ASC; (C) densidade relativa de caspase-1 clivada; (D) densidade relativa de IL-1 β . Representação da densidade relativa das bandas foi avaliada por densitometria usando o Image Lab software (BioRad).....111

Figura 29. Determinação dos níveis circulantes de determinados DAMPs em indivíduos controles e portadores de anemia falciforme. Determinação dos níveis de (A) heme livre total; (B) HSP70; (C) HMGB1; (D) ATP; (E) IL-33 no plasma de indivíduos controles (CTRL, n=12) e indivíduos portadores de AF (AF, n=24). Os níveis de HSP70, HMGB1, IL-33 e TNF- α foram quantificados através do ensaio de ELISA, heme através do kit Quantichrome heme assay e ATP através do kit Molecular Probes ATP Determination Kit. Para o teste estatístico usou-se o teste de Mann-Whitney. *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$, comparado ao grupo controle 113

Figura 30. Determinação dos níveis plasmáticos de TNF- α em indivíduos controles e portadores de anemia falciforme. Determinação dos níveis de TNF- α no plasma de indivíduos controles (CTRL, N=12) e indivíduos portadores de AF (AF, N=24). Os níveis de TNF- α foram quantificados através do ensaio de ELISA de alta sensibilidade. Para o teste estatístico usou-se o teste de Mann-Whitney. *** $p < 0,001$; comparado ao grupo controle 114

Figura 31. Avaliação da ativação da caspase-1 em neutrófilos saudáveis estimulados com plasma de indivíduos portadores de AF. Ativação de caspase-1 em neutrófilos controles (2×10^6 células/ml) após incubação de 2 horas com 5-10% de pool de plasma de indivíduos controles (CTRL, N=6) e pool de plasma de indivíduos

portadores de AF (AF, N=12). A ativação de caspase-1 foi avaliada através do kit FAM-FLICA caspase 1 e citometria de fluxo convencional. Para o teste estatístico usou-se o teste de Kruskal-Wallis; * $p < 0,05$, comparado ao grupo controle 115

Figura 32. Avaliação da liberação de IL-1 β em neutrófilos saudáveis estimulados com pool de plasma de indivíduos CTRL e portadores de AF. Liberação de IL-1 β por neutrófilos controles (2×10^6 células/ml, n=6) após incubação de 2 horas com 5-10% de plasma de indivíduos controles (CTRL, pool de n=6), e plasma de indivíduos portadores de AF (pool de n=6). A liberação de IL-1 β foi avaliada através do kit de Human IL-1 β DuoSet ELISA 116

Figura 33. Avaliação do efeito do plasma de indivíduos portadores de AF na indução de caspase-1 BiFC em células HeLa. As células HeLa foram transfectadas transitoriamente com C1-Pro VC (5ng), C1-Pro VN (5ng) e dsRed-mito (5 ng) com/sem um plasmídeo codificando ASC (controle positivo, 125 ng). 24 horas após da transfecção, 10% de plasma de indivíduos portadores de AF (AF, N=8) e/ou plasma de indivíduos CTRL (CTRL, N=5) foram adicionados em seus respectivos poços. Para o teste estatístico usou-se o teste de Kruskal Wallis com pós teste de Dunn's. ** $p < 0.01$, quando comparado as células HeLa basal. As células vênus positivas foram determinadas a partir de um mínimo de 100 células positivas para dsRed-mito (contagem manual). (B) Imagens representativas de caspase-1 BiFC em células HeLa, em vermelho (mitocôndrias), em verde (dimerização de caspase-1 BiFC)..... 120

Figura 34. Avaliação da transfecção com o plasmídeo mutante D59R para induzir a dimerização de caspase-1. (A). As células HeLa foram transfectadas transitoriamente com C1-Pro VC (5ng), C1-Pro VN (5ng), par de plasmídeo mutante *D59R C1-Pro venus* (10 ng) e dsRedmito (5ng). (B) Imagens representativas de caspase-1 BiFC em células HeLa, em vermelho (mitocôndrias), em verde (dimerização de caspase-1 BiFC). Para o teste estatístico usou-se o teste de Two-Way ANOVA com múltiplas comparações. *** $p < 0.001$ quando comparado ao grupo não-tratado. # $p < 0.05$ e ## $p < 0.01$ quando comparado com cada não-D59R grupo. Ampliação de x100 122

Figura 35. Avaliação do papel do plasma de indivíduos portadores de AF na indução de caspase-1 BiFC em células MCF-7. As células MCF-7 foram transfectadas transitoriamente com C1-Pro VC (5ng), C1-Pro VN (5ng) e dsRed-mito (5 ng) com/sem um plasmídeo codificando ASC (controle positivo, 125 ng). Após 24 hrs da transfecção, 10% de plasma AF (AF, N=10) e/ou plasma CTRL (CTRL, N=5) foram adicionados em seus respectivos poços. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$, quando comparado as células MCF-7 não tratadas, Kruskal Wallis com pós teste de Dunn's. As células vênus positivas foram determinadas a partir de um mínimo de 100 células positivas para dsRed-mito (contagem manual). (B) Imagens representativas de caspase-1 BiFC em células MCF-7, em vermelho (mitocôndrias), em verde (dimerização de caspase-1 BiFC). Ampliação de x100 125

Figura 36. Associações entre a capacidade dos plasmas de indivíduos AF a induzir a dimerização de caspae-1 e o uso de terapia com HU e níveis de hemoglobina fetal. Associações entre o uso de terapia com hidroxíureia (HU) ou não (A) e níveis de hemoglobina fetal (% HbF) (B) com a capacidade do plasma de pacientes AF em induzir

a dimerização de caspase-1 BiFC em células HeLa e MCF-7. * $p < 0,05$, ANOVA com múltiplas comparações, comparado ao efeito do plasma de controle (CTRL)... 128

Figura 37. O efeito da hemopexina na dimerização de caspase-1 induzida por plasma AF em células MCF-7. As células MCF-7 foram transfectadas transitoriamente com C1-Pro VC (5ng), C1-Pro VN (5ng) e dsRed-mito (5 ng) com/sem um plasmídeo codificando ASC (controle positivo, 125 ng). Após 24 hrs da transfecção, 10% de plasma AF (AF, N=2) e/ou (50, 100 e 250 nM) de hemopexina (HPX), foram adicionados nas células, 24 horas depois, as células venus positivas foram determinadas a partir de um mínimo de 100 células positivas para dsRed-mito (contagem manual). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, quando comparado as células MCF-7 não tratadas, Kruskal Wallis com pós teste de Dunn's 130

Figura 38. Avaliação da estimulação da dimerização de caspase-1 induzida por sobrenadante de neutrófilos em células HeLa. Neutrófilos (1×10^6 células/ml) provenientes de indivíduos controles (N=2) e de AF (N=2) foram estimulados com nigericina (5 μ M) durante 1,5 hrs. Células HeLa foram transfectadas transitoriamente com C1-Pro VC (5ng), C1-Pro VN (5ng) e dsRed-mito (5 ng) com/sem plasmídeo codificando ASC (controle positivo, 125 ng). Após 24 horas, sobrenadantes de neutrófilos controles e/ou AF foram adicionados. Após 24 horas, as células venus positivas foram determinadas a partir de um mínimo de 100 células positivas para dsRed-mito (contagem manual). Comparações entre os efeitos do sobrenadante de neutrófilos não tratados (A) ou tratados com nigericina (B). * $p < 0.05$, comparado com o grupo não-tratado (Kruskal Wallis com pós teste de Dunn's múltiplas comparações) 132

Figura 39. Modelo proposto para ativação de inflamassoma atípico e liberação de IL-1 β em neutrófilos AF. O sinal 1 induz a expressão gênica de pró-IL1 β , através de moléculas não estéreis (PAMPs) ou moléculas estereis que podem ser reconhecidas via TLR4, regulando positivamente a expressão gênica (do sensor e pró-IL-1 β). O sinal 2 pode ocorrer através dos DAMPs. Os DAMPs, por sua vez são reconhecidos pelo receptor NLR que recruta diretamente pró-caspase-1, sem a necessidade do recrutamento da molécula adaptadora ASC. ASC por sua vez, se encontra em vesículas no citosol da célula, sem necessidade de oligomerização. A dimerização e ativação da caspase-1 leva a clivagem proteolítica de pró-IL-1 β para sua forma ativa IL-1 β e liberação para o meio extracelular 142

Figura 40. Modelo proposto para ativação clássica de inflamassoma NLRP3 e processamento de IL-1 β em monócitos AF. Para formação do inflamassoma NLRP3 pela via canônica, é necessário o reconhecimento de dois sinais. O sinal 1 para o processamento de pró-IL-1 β , pode ser através de moléculas estéreis (como por exemplo a alarmina S100A8) que pode ser reconhecida via TLR4, regulando positivamente a expressão gênica (NLRP3 e pró-IL-1 β). O sinal 2 pode ser através dos DAMPs, que são liberados quando temos o processo de hemólise e isquemia/reperfusão nos indivíduos AF. Os DAMPs, por sua vez são reconhecidos pelo receptor NLRP3 que recruta a molécula adaptadora ASC para o complexo e assim a ativação de caspase-1 e a clivagem proteolítica de pró-IL1 β em sua forma bioativa IL-1 β 143

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	32
1.1.Aspectos gerais da anemia falciforme	32
1.2. Classificação da anemia falciforme	32
1.3. O processo vaso-oclusivo e o estado inflamatório na anemia falciforme	33
1.4. Terapias de tratamento para pacientes com anemia falciforme.....	34
1.5. Mecanismos Inflamatórios.....	37
1.6. O Processo vaso-oclusão e a inflamação	38
1.7. A hemólise intravascular e a inflamação.....	39
1.8. Reconhecimento de danos pelo sistema imune inato	41
1.9. Os inflamassomas e a sua formação	43
1.10. O Inflamassoma do tipo NLRP3.....	45
1.11. O inflamassoma como alvo terapêutico em doenças inflamatórias crônicas.....	47
2. JUSTIFICATIVA.....	49
2.1. Subprojeto I:.....	49
2.2. Subprojeto II:.....	49
3. OBJETIVOS	50
3.1. Subprojeto I:.....	50
3.2. Subprojeto II:.....	50
4. CASUÍSTICA E ASPECTOS ÉTICOS	52
4.1. Subprojeto 1:.....	52
4.2. Subprojeto 2:.....	52
5. MATERIAIS E METODOS.....	54
5.1. Separação de plasma do sangue periférico	54
5.2. Separação de monócitos e neutrófilos do sangue periférico	54
5.3. Separação de células mononucleares (PBMC) do sangue periférico	55
5.4. Purificação de monócitos CD14+ por seleção positiva de células usando colunas magnéticas	55
5.5. Separação de neutrófilos de buffy coat	56
5.6. ELISA	57
5.7. Determinação de ATP e heme no plasma	57
5.8. Citometria de Fluxo para determinação da ativação de caspase-1	57

5.9. Imunofluorescência e microscopia confocal para análise da molécula ASC.....	58
5.10. Identificação dos “specks” de caspase-1 e de ASC por citometria de fluxo por imagem	59
5.11. Tratamento das células com drogas inibidoras de componentes de inflamassoma e de NFkB	59
5.12. Tratamento das células com pool de plasma.....	60
5.13. Determinação de pró-IL 1 β	60
5.14. Extração de RNA.....	61
5.15. Tratamento do RNA total com DNase I e síntese de cDNA	61
5.16. PCR quantitativo (PCRq).....	61
5.17. Extração de proteínas, imunoprecipitação de complexos proteicos e Western blotting	62
5.18. Cultivo de células HeLa e MCF-7 para estudo de transfecção BiFC	63
5.19. Clonagem de Plasmídeos	64
5.20. Ensaio de transfecção	64
5.21. Análise de células vênus-positivas em tempo real por microscopia confocal	65
5.22. Análise Estatística.....	65
6. RESULTADOS.....	66
6.1. Subprojeto 1: Investigação da formação de inflamassoma em pacientes com anemia falciforme	66
6.1.1. População de pacientes AF estudados.....	66
6.1.2. Determinação dos níveis plasmáticos de IL-1 β e IL-18	67
6.1.3. Determinação da liberação de IL-1 β por neutrófilos de indivíduos controles e AF..	68
6.1.4. Avaliação da produção e liberação de Pró-IL-1 β em neutrófilos	69
6.1.5. Avaliação da ativação de caspase-1 em neutrófilos através da técnica de citometria de fluxo.....	71
6.1.6. Avaliação da ativação de caspase-1 em neutrófilos através da técnica de citometria de fluxo com imagem	73
6.1.7. Avaliação da liberação de IL-1 β dependente de caspase-1 em neutrófilos.....	75
6.1.8. Avaliação da aglomeração da molécula ASC em neutrófilos através de imunofluorescência e microscopia confocal.....	76
6.1.9. Observação da oligomerização da molécula ASC em neutrófilos através da técnica de citometria de fluxo com imagem	78
6.1.10. Observação da expressão proteica da molécula ASC em neutrófilos através da técnica de Western blotting.....	80
6.1.11. Investigação da interação da ASC e pró-caspase-1 em neutrófilos de indivíduos controles e portadores de anemia falciforme.....	81
6.1.12. Avaliação da co-localização de caspase-1 ativada e ASC através da citometria de fluxo com imagem	84

6.1.13. Liberação de IL-1 β em neutrófilos após tratamento com droga inibidora da molécula ASC.....	86
6.1.14. Avaliação da liberação de IL-1 β dependente do receptor NLRP3 em neutrófilos ..	87
6.1.15. Avaliação da expressão gênica dos receptores (NOD-like) e componentes do inflamassoma em neutrófilos de indivíduos saudáveis e portadores de AF.....	88
6.1.16. Avaliação da liberação de IL-1 β em sobrenadantes de monócitos.....	91
6.1.17. Avaliação da liberação de IL-18 em sobrenadantes de monócitos.....	93
6.1.18. Determinação da ativação da caspase-1 em monócitos de indivíduos portadores de anemia falciforme	95
6.1.19. Caracterização da ativação de caspase-1 em monócitos através da técnica de citometria de fluxo com imagem	97
6.1.20. Observação da oligomerização da molécula ASC em monócitos através da técnica de microscopia confocal e imunofluorescência	99
6.1.21. Observação da oligomerização da molécula ASC em subpopulações de monócitos através da técnica de citometria de fluxo com imagem	100
6.1.22. Avaliação da porcentagem de monócitos apresentando co-localização de ASC <i>specks</i> e ativação de caspase-1	103
6.1.23. A proteína ASC interage com caspase-1 em células mononucleares de indivíduos portadores de anemia falciforme	105
6.1.24. Liberação de IL-1 β em monócitos AF após tratamento com inibidores do inflamassoma	107
6.1.25. Liberação de IL-1 β em monócitos após tratamento com droga inibidora da molécula ASC.....	109
6.1.26. Confirmação da expressão dos componentes necessários para formação do inflamassoma NLRP3 através da técnica de Western blotting	110
Subprojeto 2: Ativação de caspases inflamatórias na anemia falciforme: Papel dos leucócitos e do meio circulante.....	112
6.2.1. Determinação dos níveis plasmáticos de DAMPS em indivíduos saudáveis e pacientes portadores de AF	112
6.2.2. Determinação dos níveis plasmáticos de IL-1 α e TNF- α em indivíduos saudáveis e pacientes portadores de AF	114
6.2.3. Avaliação da ativação da caspase-1 em neutrófilos saudáveis estimulados com plasma de indivíduos portadores de AF.....	115
6.2.4. Avaliação da liberação de IL-1 β em neutrófilos saudáveis estimulados com plasma de indivíduos portadores de AF	116
6.2.5. Populações de indivíduos controles e pacientes AF estudados.....	117
6.2.6. Avaliação da indução de caspase-1 BiFC em células HeLa por plasma de indivíduos saudáveis e de portadores de AF	118
6.2.7. Avaliação da transfecção com o plasmídeo mutante D59R para induzir a dimerização de caspase-1	121

6.2.8. Avaliação do papel do plasma de indivíduos portadores de AF na indução de caspase-1 BiFC em células MCF-7	123
6.2.9. Associações entre a capacidade do plasma de indivíduos portadores de AF em induzir a dimerização de caspase-1 e o uso de HU e a porcentagem de HbF.....	126
6.2.10. O efeito da hemopexina na dimerização de caspase-1 induzida por plasma AF em células MCF-7	129
6.2.11. Avaliação da estimulação da dimerização de caspase-1 induzida por sobrenadante de neutrófilos em células HeLa	130
7. DISCUSSÃO.....	133
8. CONCLUSÕES	144
9. REFERÊNCIAS	145
10. APÊNDICES	156
10.1. APÊNDICE I	156
10.2. APÊNDICE II	157
10.3. APÊNDICE III	158
10.4. APÊNDICE IV	159
10.5. APÊNDICE V	160
10.6. APÊNDICE VI	161
10.7. APÊNDICE VII	162
11. ANEXOS.....	164
11. 1. ANEXO I	164
11.2. ANEXO II	166

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais da anemia falciforme

A anemia falciforme (AF), a doença genética mais frequente nos seres humanos, é uma hemoglobinopatia hereditária resultante de uma mutação de ponto no gene da globina beta, que leva à substituição do ácido glutâmico por uma valina na sexta posição. Esta mutação resulta na formação de uma hemoglobina com propriedades físico-químicas anormais, conhecida como HbS (1)(2). Na presença de baixa tensão de oxigênio, a hemoglobina S (HbS) polimeriza, formando fibras (3), resultando na deformação dos eritrócitos, que adquirem um formato de foice (4)(5).

A substituição de um único aminoácido na estrutura da hemoglobina compreende a base molecular para a anemia falciforme, mas a fisiopatologia e a evolução clínica correspondente a esta doença é complexa e consequentemente, pode-se observar no indivíduo acometido diversas manifestações e complicações crônicas e agudas que incluem; anemia hemolítica crônica, crises dolorosas vaso-oclusivas (CVO), asplênia funcional, síndrome torácica aguda, hipertensão pulmonar, acidente vascular cerebral, dano cumulativo de múltiplos órgãos e baixa expectativa de vida (6)(5).

1.2. Classificação da anemia falciforme

O termo “doença falciforme” é utilizado para se referir a todos os diferentes genótipos que causam a síndrome clínica característica, enquanto que o termo “anemia falciforme” refere-se especificamente a homozigose do alelo β^s , a forma mais comum da doença falciforme. No entanto, as formas heterozigóticas são representadas pela associação de HbS em heterozigose com outras variantes de hemoglobinas, tais como: HbC (HbSC), HbD (HbSD) ou com as talassemias (HbS/ β^0 talassemia, HbS/ β^+ talassemia, HbS/ α talassemia) (7). Em populações de origem étnica Africana, a anemia falciforme geralmente é responsável por 70% dos casos da doença falciforme, sendo a maioria do restante dos casos, doença da hemoglobina SC (doença falciforme SC). Essa variante da doença

falciforme resulta da co-hereditariedade dos alelos β^S e β^C e possui uma gravidade clínica intermediária (8).

Em 2016, 1.071 recém-nascidos tinham a doença falciforme e > 60.000 eram heterozigotos para o alelo β^S em todo o território Brasileiro. No total, há cerca de 30.000 pessoas com anemia falciforme em todo o país. A prevalência do alelo β^S varia de 1,2 % a 10,9%, dependendo da região, enquanto que a prevalência do alelo β^C está entre 0,15% e 7,4% (2)(9).

1.3. O processo vaso-oclusivo e o estado inflamatório na anemia falciforme

O processo vaso-oclusivo compreende várias etapas, tipos celulares e mecanismos, resultando na oclusão de vasos, particularmente na microcirculação. Esse processo vaso-oclusivo incorre danos a tecidos e é a principal causa de morbidade e mortalidade da doença (10). A fragilidade das hemácias resulta em eventos constantes de hemólise intravascular que levam à uma exacerbação do processo inflamatório (11)(12)(13) e a diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) no vaso, favorecendo a vasoconstrição (14)(15), a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a ativação de células endoteliais. Após ativação, as células endoteliais apresentam maior expressão das moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina) na sua superfície e também liberam mais citocinas e quimiocinas, como a IL-8, IL-6 e IL-1 β , que juntamente com o TNF- α , podem colaborar para a inflamação vascular e a ativação e recrutamento das células sanguíneas (16). Eventos de hipóxia/reperfusão também podem contribuir para a geração de espécies reativas de oxigênio e moléculas inflamatórias no vaso (17)(18).

Assim, processos inflamatórios são fundamentais para a iniciação e propagação do processo vaso-oclusivo na AF. Existem muitas evidências que sugerem um papel importante dos leucócitos na doença falciforme e no processo vaso-oclusivo. Os leucócitos são encontrados em um estado ativado na circulação de indivíduos portadores de AF e estes leucócitos demonstram uma maior expressão de moléculas de adesão e alterações significativas nas suas propriedades adesivas, facilitando o seu recrutamento ao endotélio (19). A formação de agregados heterocelulares entre leucócitos, plaquetas e hemácias,

também tem sido relatado na anemia falciforme, podendo contribuir para amplificar o recrutamento celular e a obstrução do vaso (20). A obstrução física do vaso pelo recrutamento de leucócitos, plaquetas e hemácias ao endotélio, ocasiona uma redução no fluxo sanguíneo com consequente diminuição na concentração de oxigênio e falcização das hemácias, dificultando assim o fluxo contínuo e resultando na vaso-oclusão (Figura 1).

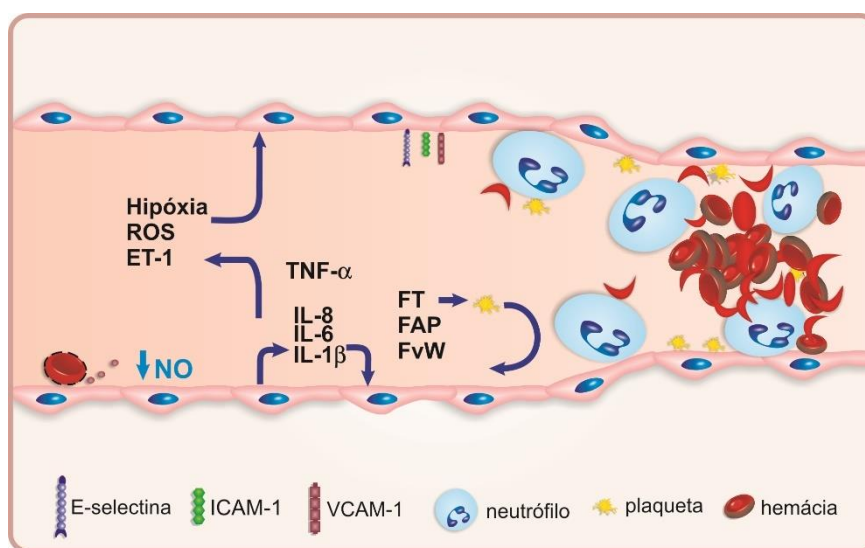


Figura 1. Mecanismo de vaso-oclusão na anemia falciforme. O contato direto das hemácias SS com a parede vascular pode contribuir para a ativação das células endoteliais; a presença da hemoglobina livre na circulação tem efeito deletério no vaso e ainda consome o óxido nítrico (NO) sintetizado pelas células endoteliais. Juntamente com a presença de espécies reativas de oxigênio (ROS), a hipóxia e moléculas vasoconstritoras (como endotelina-1, ET-1), processos inflamatórios causam a ativação das células endoteliais, o recrutamento de leucócitos e hemácias e a obstrução do vaso sanguíneo (6).

1.4. Terapias de tratamento para pacientes com anemia falciforme

Atualmente, o tratamento da AF é limitado à terapia de transfusão de eritrócitos, transplante de células tronco-hematopoiéticas e alguns farmacoterápicos que mostram eficácia em pacientes AF. A terapia de transfusão sanguínea melhora o fluxo microvascular através da diminuição do número de eritrócitos falciformes circulantes e está associada à diminuição da lesão endotelial e do dano inflamatório (21)(22).

Nos EUA, a terapia transfusional crônica, quando disponível, é prescrita para cerca de 10% dos pacientes com AF principalmente aqueles pacientes que apresentam alto risco de acidente vascular cerebral, podendo melhorar e prevenir as crises de AVC (23). Entretanto, existem vários efeitos adversos potenciais da terapia transfusional, como por exemplo; a sobrecarga de ferro, aloimunização e reações transfusionais hemolíticas e ainda podemos citar a limitação do teste para detecção de agentes infecciosos nos hemoderivados (23).

O transplante alogênico de células-tronco da medula óssea ou de sangue do cordão umbilical é uma terapia potencialmente curativa, embora seja aplicável apenas para uma pequena porcentagem dos pacientes jovens com sintomas graves que possuem doadores irmãos HLA-compatíveis. Entretanto, o transplante de células alogênicas, pode acarretar o risco da doença do enxerto-versus-hospedeiro (GVHD), que pode ser causa de elevada morbidade (24).

Atualmente a droga mais utilizada para o tratamento de AF, é a hidroxiureia (HU), a qual foi aprovada pelo FDA Americano (The United States Food and Drug Administration), em 1998 apenas para o uso em pacientes adultos e pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) em 2007 para o uso em pacientes pediátricos e adultos, para o tratamento de indivíduos acometidos com anemia falciforme. Em dezembro de 2017, o FDA aprovou, pela primeira vez, o uso de HU para reduzir a frequência de crises dolorosas e a necessidade de transfusão crônica em pacientes AF com dois anos, ou mais, que apresentem recorrentes crises dolorosas moderadas a graves (25)(26) e também para o uso em crianças que vivem em áreas endêmicas de malária (27)(28).

A droga modifica o processo da doença, melhorando a incidência de crises vaso-oclusivas, parâmetros hematológicos e o tempo de hospitalização, podendo reduzir a taxa de mortalidade e morbidade dos pacientes (29)(30). No entanto, estudos de revisão realizados pela Cochrane em 2017, concluíram que não há, atualmente, evidências suficientes dos benefícios a longo prazo do uso de HU para prevenção das complicações crônicas da doença (31). A droga apresenta excelente perfil de segurança, embora alguns pacientes não tenham uma resposta benéfica, geralmente por limitações de adesão ao tratamento, e possivelmente por razões farmacogenômicas (2). A HU age principalmente

através do aumento da produção de hemoglobina fetal (HbF), um tipo de hemoglobina que inibe a polimerização da HbS. Embora a HU seja conhecida por inibir a síntese de DNA através do ribonucleotídeo redutase (32), sugere-se também que esta possa atuar como um doador de NO *in vitro* e *in vivo* (33). De fato, alguns benefícios da droga são observados antes mesmo do aumento da HbF nas hemácias, como a diminuição dos números de leucócitos e aumento do transporte de cátions nos eritrócitos (33). Adicionalmente, trabalhos recentes relatam que a HU pode também exercer efeitos imediatos que são intermediados pela liberação de NO. Em um modelo animal de AF, a administração de HU associada a um estímulo inflamatório, inibiu a iniciação e a propagação do processo vaso-oclusivo nesses animais (34). Ademais, a HU possui efeitos benéficos imediatos que reverterem os efeitos inflamatórios agudos derivados processos hemolíticos (13).

Recentemente, foi aprovado pelo FDA americano, o uso de um suplemento de aminoácido, L-glutamina, o qual tem atividade antioxidante, reduzindo o estresse oxidativo e assim diminuindo a falcização dos eritrócitos (FDA Briefing Document, Oncologic Drugs Advisory Committee Meeting, NDA 208587, L-glutamine, Applicant: Emmaus Medical, Inc. U.S. 2017). A L-glutamina é um aminoácido essencial para síntese de NAD (nicotinamida), arginina e glutathionina (GSH). Um estudo clínico multicêntrico de fase III, testou a L-glutamina em mais de 230 pacientes AF durante 48 semanas, concomitantemente ou não ao uso de HU. Os resultados obtidos, através do ensaio, mostraram que os pacientes que receberam o tratamento com L-glutamina tiveram menos episódios de vaso-oclusão, crises de dor, síndrome torácica aguda e menor aderência de eritrócitos a células endoteliais no vaso. Porém, não foi possível observar melhorias significativas nos parâmetros hematológicos como; níveis de hemoglobina, hematócrito ou contagem de reticulócitos e ainda foi observado que o grupo de pacientes em tratamento com L-glutamina, apresentou dor torácica não cardíaca, fadiga e dor muscular, quando comparados com o grupo placebo (35)(36)(37).

Nos últimos 10 anos, o desenvolvimento e investigação de um grande número de novas estratégias farmacoterapêuticas vem sendo estudadas para o tratamento da AF, adicionalmente, outros medicamentos já em desenvolvimento

ou em uso para o tratamento de outras doenças inflamatórias crônicas estão sendo explorados em estudos pré-clínicos e ensaios clínicos para avaliar sua eficácia nessa doença (28). Dentre as drogas que estão sendo testadas em estudos clínicos de fase III, nos últimos 5 anos, podemos destacar; o voxelotor (GBT-440) que propõe aumentar a afinidade da hemoglobina (HbS) por oxigênio e consequentemente inibe sua polimerização quando submetida a condições de hipóxia (38); *NCT03036813*; o rivipansel (GMI-1070) que age como um agonista da pan-selectina, e se liga a todos os três membros da família da selectina, E, P e L-selectina, com potencial prevenção a crises vaso oclusivas e tratamento de pacientes AF hospitalizados com episódios vaso-oclusivos (39); *NCT02187003*; e o crizanlizumabe (SEG-101) que é um anticorpo monoclonal anti-P-selectina que neutraliza a atividade da P-selectina na superfície de células endoteliais e plaquetas e que tem se mostrado eficaz na redução da frequência de crises vaso-oclusivas em pacientes AF (40).

Nos Estados Unidos, a decisão da Divisão de Produtos de Hematologia da FDA, considera o desenvolvimento de novos tratamentos para a AF como prioridade máxima e pode conceder a designação de medicamento órfão com “*fast tracking*”, facilitando os investimentos das indústrias farmacêuticas para submissão de novos estudos clínicos (2).

1.5. Mecanismos Inflamatórios

A inflamação constitui a resposta adaptativa das células de um organismo a um estímulo, como infecção ou lesão tecidual, com o objetivo de restaurar a função e a homeostase dos órgãos (41)(42). Durante o processo inflamatório agudo, ocorrem diversos eventos mediados por componentes solúveis, celulares e vasculares que induzem alterações morfológicas e bioquímicas. O processo inflamatório tem como sua principal característica o recrutamento de células inflamatórias, predominantemente os leucócitos que, em geral, apresentam um papel essencial no desenvolvimento deste processo. Durante a inflamação, os neutrófilos podem se acumular no tecido inflamado devido a sua rápida ativação e resposta ao estímulo quimiotático, seguida de uma segunda onda de infiltração celular composta principalmente de células mononucleares, como os monócitos,

os quais, podem se diferenciar nos tecidos em fagócitos mononucleares incluindo macrófagos e células dendríticas (43).

Embora a resposta inflamatória à invasão por patógenos tenha sido caracterizada há muito tempo, os ativadores não microbianos também desencadeiam mecanismos inflamatórios em processos de inflamação estéril (41). O estresse ou lesão tecidual pode levar à liberação de moléculas endógenas que atuam como padrões moleculares associados a danos (DAMPs, *em inglês: Damage-associated molecular patterns*), sendo estes iniciadores de processos inflamatórios (44). A inflamação estéril ocorre durante condições agudas de lesão tecidual e após alguns eventos como lesão de isquemia-reperfusão, além de se manifestar como inflamação crônica em certas doenças, como a aterosclerose e a anemia falciforme (45). Em contrapartida, a inflamação não-estéril, ocasionada por agentes microbianos, denominados de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, *em inglês: pathogen-associated molecular patterns*), ocorre em resposta a estímulos inflamatórios infecciosos e esta por sua vez, pode levar a uma resposta controlada do sistema imune inato, restaurando a lesão tecidual e mantendo a homeostase (46). Sabe-se que as respostas inflamatórias são importantes para a reparação da homeostase tecidual, entretanto, a inflamação não resolvida, devido a constante liberação de DAMPs e a incapacidade de remover os estímulos inflamatórios prejudiciais, pode ser maléfica ao organismo e resultar em lesões teciduais e inflamação não controlada (45)(46).

1.6. O Processo vaso-oclusão e a inflamação

No caso da anemia falciforme, o maior desencadeador do processo de inflamação crônica é o fenômeno de vaso-oclusão (47)(48). As interações celulares desempenham um papel central no processo vaso-oclusivo, onde as células endoteliais são ativadas pelo contato direto com os eritrócitos alterados, heme livre e a liberação de ROS, induzido pela hipóxia local (49)(50). A redução da biodisponibilidade de NO pode induzir a expressão de moléculas de adesão no endotélio e a produção de endotelina 1 (51)(52). A expressão aumentada de moléculas de adesão nas células endoteliais e nas células circulantes, como

VCAM-1, ICAM-1, P-selectina, E-selectina, CD47, integrina $\alpha V\beta 3$, proteoglicanos e fosfatidilserina, resulta na adesão de eritrócitos e leucócitos a parede do vaso (53)(54)(55)(56)(57)(52).

As células endoteliais, monócitos, neutrófilos e plaquetas ativadas produzem mediadores inflamatórios, como IL-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral- α (TNF) (49)(58)(2), no entanto, outros fenômenos também são importantes para levar a um estado inflamatório crônico como, por exemplo, alterações na membrana dos glóbulos vermelhos e hemólise podem desencadear sinais pró-inflamatórios que levam ao círculo vicioso de ativação *pan-celular*. Esses processos inflamatórios desempenham um papel fundamental no início das crises dolorosas agudas que representam a principal causa de hospitalização em indivíduos com a doença (59) e muitas de suas numerosas manifestações, incluindo a autosplenectomia (60), hipertensão pulmonar (61), síndrome torácica aguda (62), úlceras de perna (63), nefropatia (64), função cognitiva prejudicada (65) e acidente vascular cerebral (66).

1.7. A hemólise intravascular e a inflamação

Os eritrócitos de indivíduos AF são altamente instáveis, com uma vida útil reduzida em $\geq 75\%$ (2). Hipóteses sugerem que a taxa de hemólise intravascular na AF é insuficiente para produzir um fenótipo clínico, incluindo a hipertensão pulmonar, a consequência mais grave da hemólise intravascular. Contudo, os dados epidemiológicos, bioquímicos, genéticos e fisiológicos apoiam uma ligação entre a hemólise intravascular e a fisiopatologia da AF (2)(67)(68).

Evidências recentes demonstram que a hemólise intravascular tem uma participação significativa no estado inflamatório da anemia falciforme. A hemoglobina livre, quando no plasma, sequestra o NO proveniente das células endoteliais e ocasiona a produção de ROS (69). Como o NO é um potente vasodilatador que também inibe processos inflamatórios, a diminuição da biodisponibilidade de NO na AF provavelmente tem um papel importante em facilitar a vaso-constricção e aumentar a ativação endotelial e processos inflamatórios na doença (69), no entanto, o produto da hemoglobina oxidada, Hb-Fe³⁺, acumula-se na circulação e nos tecidos, onde por sua vez ocorre à

liberação do grupo heme, uma molécula hidrófoba inflamatória (70). Estudos recentes sugerem que micropartículas de eritrócitos carregadas do grupo heme são geradas na anemia falciforme e que estas micropartículas podem se ligar e interagir com células endoteliais, induzindo estresse oxidativo e apoptose (71).

O Heme é caracterizada como um potente DAMP, exercendo vários efeitos incluindo a ativação de leucócitos e células endoteliais pelo receptor do tipo *toll-like* receptor 4 (TLR4), aumentando a expressão das moléculas de adesão, e a produção de oxidantes e a peroxidação lipídica (11)(70)(72)(73)(74). Publicações recentes indicam um papel para o heme livre no plasma, na ativação de neutrófilos com a consequente liberação de NETs (*neutrophil extracellular traps* - redes extracelulares de neutrófilos) (75). A ejeção da cromatina para o espaço extracelular durante a formação dos NETs tem sido descrita como uma resposta pró-inflamatória de neutrófilos para imobilizar e matar patógenos extracelulares (76)(77).

De grande importância, estudos publicados por Dutra e colaboradores, indicam que o heme provoca a formação de inflamassoma do tipo NLRP3 em macrófagos, e o subsequente processamento de IL-1 β , que por sua vez, pode promover o recrutamento de leucócitos para o local afetado, favorecendo a acumulação destas células em doenças hemolíticas como a anemia falciforme (73).

A hemólise também é conhecida pela liberação de ATP dos eritrócitos. O ATP extracelular funciona como uma molécula de sinalização através da ativação de receptores purinérgicos do tipo P2 (78), a ligação do ATP ao receptor P2X7, pode levar ao efluxo de K⁺, via abertura do canal catiônico controlado por ATP e pode contribuir para a ativação de inflamassomas do tipo NLRP3 (79).

Além disso, o ATP extracelular é rapidamente convertido em adenosina pelas ectonucleotidases, enquanto que a interação da adenosina com o receptor de adenosina Adora2a, pode ter efeitos anti-inflamatórios, inibindo seletivamente as células iNKT (em inglês: célula natural *killer* ou “ exterminadoras naturais”). Porém, a sinalização da adenosina através do receptor de adenosina Adora2b na membrana eritrocitária pode contribuir para a falcização dos eritrócitos na AF (80)(81).

1.8. Reconhecimento de danos pelo sistema imune inato

Os padrões moleculares associados a danos (DAMPs), liberados durante as lesões celulares, por células apoptóticas, necróticas ou por eritrócitos submetidos a processos hemolíticos, podem ser detectados por células inflamatórias; tais como: neutrófilos, monócitos, células T, macrófagos e células dendríticas (82)(74). As células necróticas liberam uma variedade de DAMPs, incluindo a *proteína do grupo 1 de mobilidade alta* (HMGB-1), *proteína de choque térmico 70* (HSP70) e metabólitos de purinas, como o ATP, enquanto que, os eritrócitos rompidos liberam hemoglobina, heme livre, HSP70, ATP e DNA mitocondrial (83)(74)(84). As reservas intracelulares de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 α e IL-33, também podem ser liberadas por células necróticas, juntamente com (ROS) e proteases ativadas, que podem estimular vias inflamatórias estéreis (45).

O sistema imune inato é composto de uma grande variedade de receptores específicos para o reconhecimento de patógenos ou lesões endógenas, estes receptores são reconhecidos como “receptores de reconhecimento de padrões” (PRR, em inglês: *pattern recognition receptors*), que ao identificar *PAMPs* ou *DAMPs*, ativam vias de sinalização que resultam na produção de citocinas (85)(45). Existem quatro subfamílias principais de PRR: receptores do tipo *toll* (**TLRs**, em inglês: *Toll-like receptors*), receptores do tipo NOD (**NLRs**; em inglês: *the nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-Leucine Rich Repeats (LRR)-containing receptors (NLR)*), receptores de lectina do tipo C (em inglês: *C-type lectin receptors (CLRs)*), receptores do tipo RIG e sensores de DNA citosólico (em inglês: *retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-1)-like receptors (RLR; aka RIG-1-like helicases—RLH)*)(86).

No entanto, os PRRs mais estudados são os *TLRs* e os *NLRs*. A família dos receptores do tipo *toll* é composta por 10 membros que compreende do TLR1-TLR10. Os TLRs são glicoproteínas de membrana que possuem dois domínios: o domínio intracelular C terminal, denominado TIR e o domínio externo N-terminal composto por repetições ricas em leucinas (LRR) (85)(87). A localização dos *TLRs* na célula é variável, podendo ser encontrado em

superfícies celulares ou nas membranas de vesículas endocíticas (88)(89). Além das células do sistema imune, outros tipos celulares também podem expressar os TLRs (89). Em mamíferos, os ligantes de TLRs podem ser agrupados, em três categorias: (1) lipídeos e lipopeptídeos que podem ser reconhecidos através dos receptores: TLR1, TLR2, TLR4, TLR6; (2) proteínas que podem ser reconhecidas pelo receptor TLR5; (3) ácidos nucleicos que podem ser reconhecidos através dos receptores: TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 (89)(90). A estimulação de TLRs por seus ligantes resulta no recrutamento de moléculas adaptadoras específicas que irão transduzir o sinal, levando a ativação das cascatas de sinalização NF- κ B, interferon (IFN), fatores de resposta (IRFs) e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAP). Esses fatores de transcrição induzem a ativação de vários genes da resposta imune, incluindo as citocinas inflamatórias (IL-6, IL-12, IL-23 e TNF- α) (89)(91).

A família dos receptores do tipo NLR é composta de 23 proteínas (em humanos) e mais de 34 genes NLR já foram descritos em camundongos (92). Os NLRs são constituídos por três domínios funcionais: (1) um domínio de interação proteína-proteína com uma porção N-terminal, necessário para a transdução do sinal; (2) um domínio central NACHT ou (NBD), necessário para oligomerização; e (3) um domínio C-terminal com repetições ricas em leucina (LRR), que confere reconhecimento ao ligante, mas também age como um repressor da sinalização de *NLR*, na ausência de estímulo (93). Os NLRs de mamíferos são classificados de acordo com o tipo do seu domínio N-terminal: Os NLRA, ou *transactivator de Classe II* (CIITA), contém um domínio de transativação ácida; NLRBs ou proteínas neuronais inibidoras de apoptose (NAIPs), contém um inibidor de baculovírus (BIR); as NLRCs possuem um domínio de ativação e recrutamento de caspase (CARD) e NLRPs contém um domínio de pirina (PYD) (93).

Após a sinalização de um estímulo, os NLRs são ativados para mediar respostas imunes inatas, tais como a indução de inflamação, autofagia ou morte celular (93). Os receptores do tipo NLRP10, NOD1, NOD2, NLRC3, NLRC5, NLRX1 e CIITA podem mediar a regulação das vias do fator de transcrição nuclear- κ B (NF- κ B), proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), ou até mesmo, atuam como reguladores transcricionais no núcleo celular. Os receptores

NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP7, NLRP12, NLRC4 e NAIP são conhecidos como sensores intracelulares de PAMPs e/ou DAMPs, sendo sua ativação essencial para desencadear a formação de um complexo multiproteico denominado inflamassoma (93)(94).

1.9. Os inflamassomas e a sua formação

A plataforma molecular do inflamassoma, cuja existência foi proposta pela primeira vez por Martinon e colaboradores em 2002 (95), é responsável pela maturação e liberação das citocinas, IL-1 β e IL-18, embora uma organização complexa de várias proteínas seja necessária para que isto ocorra (96). Os inflamassomas são compostos, de maneira geral, (1) por uma proteína iniciadora pertencente a uma família de PRRs, podendo ser um sensor citosólico da família NLR, AIM2 (em inglês: the absent in melanoma-2 (AIM2)-like receptors (ALRs) ou da família de sensores do tipo PYRIN (pyrin e HIN domain-containing protein); (2) por uma molécula adaptadora denominada ASC (em inglês: *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*); (3) e por moléculas efetoras, que são cisteíno-proteases de pró-caspase 1, 4 ou 5 (em humanos) e pró-caspase 11 (em camundongos) (97)(42)(98). Uma vez que os sinais de danos são detectados através dos receptores, o sensor que antes estava em um estado inibitório, agora se apresenta ativado e oligomeriza a molécula ASC, induzindo interações homotípicas entre seus domínios efetores do tipo pirina (PYD). Em seguida, ASC recruta a pró-caspase-1 por meio de interações entre seu domínio CARD e os domínios de caspase (99)(100).

Os NLRs que possuem o domínio PYD, como o NLRP3 e o AIM2, são estritamente dependentes do adaptador ASC. Em contraste, NLRP1 e NLRC4 possuem um domínio CARD e podem recrutar caspase-1 diretamente, podendo induzir a montagem do inflamassoma e a maturação das citocinas pró-inflamatórias independente de ASC (101) (Figura 2).

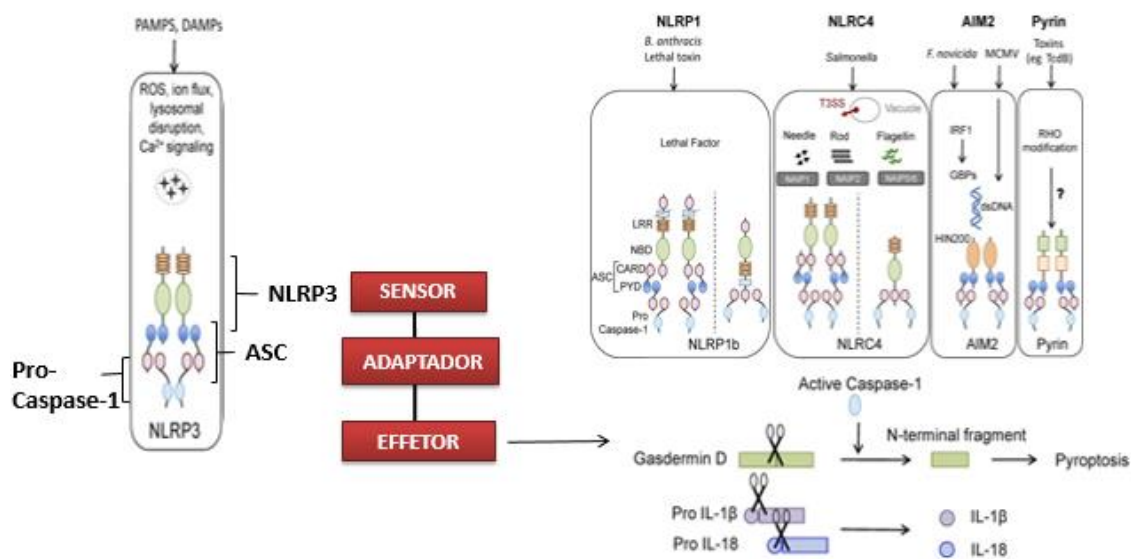


Figura 2. Ativação do inflamassoma e seus componentes. Os inflamassomas são ativados por um amplo espectro de DAMPs e PAMPs. O NLR se encontra inativado, porém, uma vez que reconhece um sinal de perigo, este sofre uma mudança conformacional, permitindo a ligação do receptor NLR a proteína ASC, através dos domínios de pirina (PYD). O ASC atua como uma proteína adaptadora e se liga a pró-caspase-1 (efetora), através dos domínios de recrutamento de caspase (CARD). Os inflamassomas NLRP3 e o AIM2 são estritamente dependentes do adaptador ASC para montagem da maquinaria, enquanto os sensores NLRP1 e NLRC4 possuem um domínio CARD e podem recrutar caspase-1 diretamente, resultando na ativação de caspase-1 que, por sua vez, cliva seus efetores: Gasdermina-D (envolvido na morte celular por piroptosis) e as pró-formas das citocinas IL-1 β e IL-18 - Adaptado de (97).

As cisteíno-proteases (caspases) são amplamente conhecidas como as principais mediadoras da resposta de morte celular apoptótica (102). As caspases inflamatórias (-1, -4, -5) participam da montagem e/ou ativação dos inflamassomas (103). Porém, a melhor elucidada no contexto do nosso trabalho, é a caspase-1, que uma vez ativada permite o processamento e ativação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 (geradas na sua forma inativa, pró-IL 1 β e pró-IL 18). Após o processamento e clivagem das pró-formas, essas citocinas se tornam biologicamente ativas e são liberadas para o meio extracelular (103).

Além da maturação e liberação das citocinas IL-1 β e IL-18, provocadas pela clivagem da caspase-1, a formação do inflamassoma resulta em morte celular programada com liberação do conteúdo intracelular pró-inflamatório, chamada de *piroptosis* (104). Uma vez processadas e liberadas, as citocinas IL-1 β e IL-18 ativam e estimulam interações adesivas das células endoteliais,

leucócitos e células do músculo liso, estimulando a liberação de IL-6, IL-17 (via da IL-1 β) e interferon γ (IFN- γ), IL-2 e IL-12 (via da IL-18), que então podem levar à indução de respostas imunes do tipo T-helper 1 (Th1) e T-helper 17 (105). O complexo inflamassoma pode ser encontrado em diversas células inflamatórias, tais como: macrófagos, neutrófilos e células dendríticas e tem sido observado em diferentes doenças: gota, artrite, diabetes tipo 2, doença de Alzheimer, aterosclerose e obesidade (94)(101).

1.10. O Inflamassoma do tipo NLRP3

O inflamassoma melhor caracterizado até o momento é o NLRP3, o qual pode ser formado principalmente em monócitos, macrófagos e células dendríticas e alguns estudos demonstram a formação deste inflamassoma também em neutrófilos (106)(107). O inflamassoma do tipo NLRP3 pode reconhecer uma variedade de estímulos exógenos e endógenos, tais como agonistas microbianos, ATP, heme, DNA mitocondrial, HMGB-1 e HSP70 (108)(109). No entanto, a ativação do NLRP3 por DAMPs específicos parece ocorrer através de um mecanismo indireto, desencadeado por intermediários de sinalização; redução nos níveis intracelulares de potássio, desestabilização lisossomal e a geração de ROS mitocondrial (110)(111)(112). Após reconhecer o sinal de dano, o receptor NLRP3 induz rapidamente a oligomerização de ASC, que por sua vez, fornece um recrutamento e dimerização de pró-caspase-1, resultando na sua auto ativação e consequente clivagem das citocinas pró-IL-1 β e pró-IL-18 e liberação das citocinas IL-1 β e IL-18 na sua forma clivada (113)(114)(115)(116).

Além dos sinais liberados por PAMPs ou DAMPs, também é necessário um sinal de “*priming*” para que a produção da IL-1 β clivada possa ocorrer. Este sinal de *priming*, ou “sinal 1”, regula positivamente a transcrição dos genes do complexo inflamassoma e a forma imatura da IL-1 β , e um segundo sinal é necessário para que inicie a montagem da maquinaria do inflamassoma, direcionando para clivagem da caspase-1 e a consequente liberação de IL-1 β (108)(117). Por exemplo, para o heme induzir a formação do inflamassoma NLRP3 em macrófagos, essas células necessitam receber *priming* por LPS (ou

outra molécula inflamatória) para ativar a via de NF- κ B e induzir a expressão dos genes NLRP3, caspase 1 e IL-1 β , sendo este mecanismo provavelmente mediado por TLRs (como demonstra a Figura 3).

O *priming* celular acontece tipicamente através de um ligante microbiano do tipo TLR. Entretanto, os inflamassomas também são ativados durante a progressão de doenças inflamatórias estéreis, como a aterosclerose, doença metabólica e distúrbios neuroinflamatórios. Portanto, é importante considerar os fatores e mecanismos endógenos que podem estimular o inflamassoma em certas condições (118).

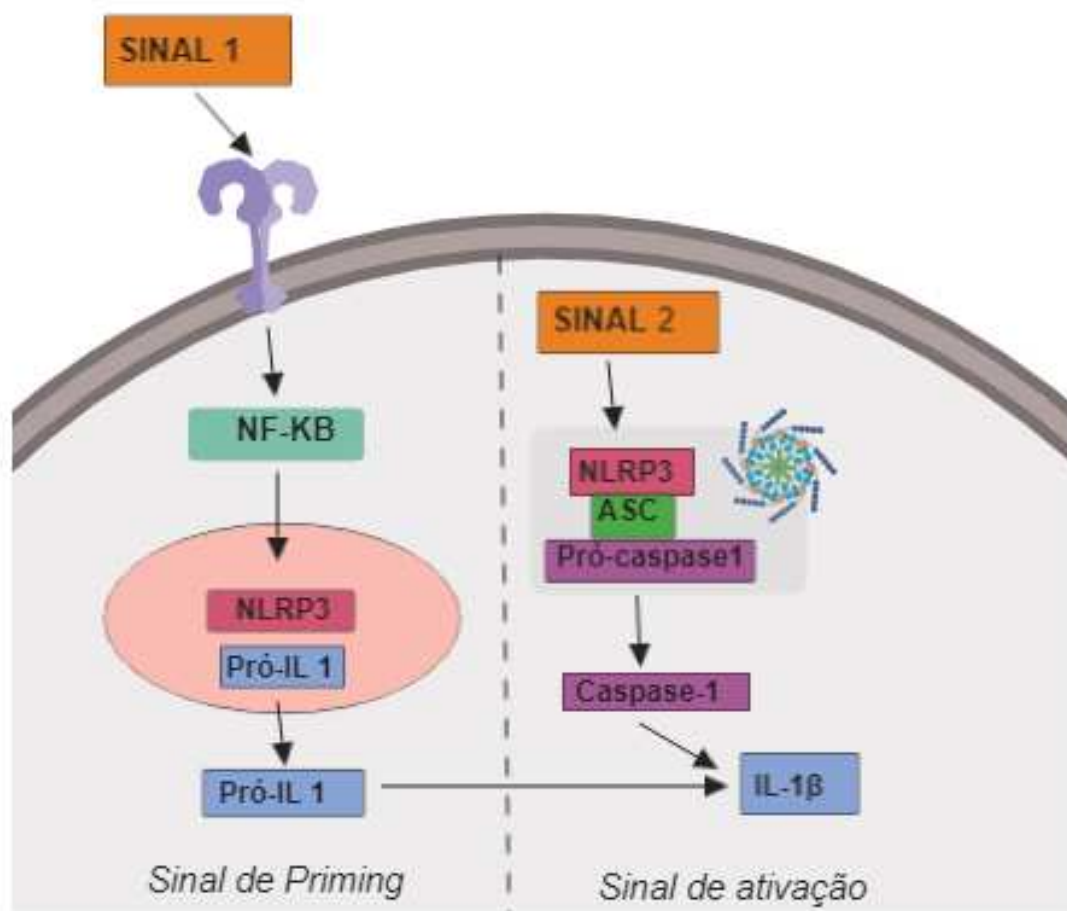


Figura 3. Mecanismo de ativação (*priming*) do inflamassoma NLRP3 e liberação de IL-1 β . A liberação de IL-1 β é regulada por duas etapas: a síntese transcricional de pró-IL 1 β e o processamento proteolítico na sua forma ativa pelos inflamassomas. A regulação transcricional do RNAm da IL-1 β é mediado por receptores do tipo TLRs e receptores de IL-1 (sinal 1), que também induz a expressão do RNAm do receptor NLRP3. A ativação do inflamassoma NLRP3 induz a clivagem de caspase-1 e o consequente processamento da pró-IL-1 β para sua forma ativa (sinal 2).

1.11. O inflamassoma como alvo terapêutico em doenças inflamatórias crônicas

Desde a descoberta do inflamassoma e a sua relação com as doenças inflamatórias crônicas, vários grupos de pesquisas e indústrias farmacêuticas vem desenvolvendo novas substâncias capazes de bloquear ou atenuar os efeitos desse complexo multiproteico, seja através da via de liberação das citocinas IL-1 β e IL-18, ou até mesmo, bloqueando os componentes da formação deste complexo. No entanto, podemos destacar algumas drogas já conhecidas

e que cada vez mais, estão sendo aplicadas no tratamento de diferentes doenças inflamatórias crônicas; a *anakinra* (recombinante da proteína antagonista do receptor da IL-1), *canakinumab* (inibidor de IL-1 β), *rinolacept* (IL-1 *Trap*, inibidor de IL-1), proteína de ligação da IL-18, receptores solúveis da IL-18 e os anticorpos monoclonais anti-receptor da IL-18 foram desenvolvidos para o tratamento de doenças inflamatórias. Entretanto, independente da IL-1 β e IL-18, a morte celular inflamatória do tipo *pyroptosis* irá liberar DAMPs para induzir um novo processo de inflamação e assim reiniciar a formação de inflamassomas constantemente. Neste caso, os inibidores dos componentes do inflamassoma (*small drugs*) são uma promessa terapêutica para o futuro (119).

A glibenclamida que é um agente antidiabético da classe das sulfonilureias de segunda geração, foi o primeiro composto a ser identificado como um possível inibidor do receptor NLRP3 e assim inibir a liberação de IL-1 β . Um fármaco recentemente identificado como inibidor do receptor NLRP3, através da sinalização do canal de ATP (P2X7) é o inibidor de nucleósido da transcriptase reversa (NRTIs), que é principalmente usado para bloquear a replicação de retrovírus (116).

Recentemente um novo estudo propôs a eficácia da inibição do receptor NLRP3, através do composto MCC950. Estudos *in vitro* demonstraram que o MCC950 foi capaz de bloquear a ativação do inflamassoma NLRP3 canônico e não-canônico, em concentrações nanomolares, sendo um inibidor específico apenas do receptor NLRP3. Estudos *in vivo*, demonstraram que o MCC950 reduziu a produção de IL-1 β e atenuou os sintomas em um modelo de doença de esclerose múltipla (120).

Como a anemia falciforme se apresenta como uma doença inflamatória crônica, estudos *in vivo* com os inibidores de IL-1 e inibidores dos componentes do inflamassoma seria uma opção para o descobrimento de novos tratamentos para essa doença, podendo dessa forma atenuar os sintomas e conseqüentemente melhorar as condições de sobrevivência.

2. JUSTIFICATIVA

Dois subprojetos foram desenvolvidos:

2.1. Subprojeto I:

A anemia falciforme é reconhecida como uma doença inflamatória crônica, diante disso, temos como hipótese a formação de inflamassomas nos leucócitos de pacientes com essa doença. Há relatos que as concentrações plasmáticas das citocinas IL-1 β e IL-18 sejam aumentadas em alguns pacientes com AF, que seria indicativo da formação destes inflamassomas (121)(122), bem como evidências de concentrações aumentadas de heme livre e outros DAMPs potentes (HMBG-1, ATP) e da alarmina IL-33 no plasma destes pacientes (123)(124)(125)(126)(81). Assim sendo, o objetivo deste estudo foi identificar se há a formação de inflamassomas na AF e em quais células, pois estas estruturas inflamatórias podem contribuir de forma significativa para a fisiopatologia da AF. Inicialmente, o foco do nosso estudo foi compreender quais os estímulos endógenos (sinal 1 e/ou sinal 2) que poderiam contribuir para indução do processamento das citocinas IL-1 β e IL-18, bem como identificar os componentes da formação de inflamassomas nas células desses indivíduos. Essas descobertas foram importantes, pois podem ser usadas como alvos moleculares para eventual intervenção terapêutica futura.

2.2. Subprojeto II:

Dada a dificuldade em averiguar e identificar as atividades das caspases inflamatórias nas células e a necessidade de definir mecanismos pelos quais o processamento de IL-1 β ocorre, este projeto teve como objetivo a investigação da capacidade do plasma de pacientes com AF de induzir a dimerização específica de caspases na presença de componentes do inflamassoma. Além disso, buscamos entender o papel dos neutrófilos de indivíduos AF na ativação dos mecanismos da via de ativação da caspase-1.

3. OBJETIVOS

3.1. Subprojeto I:

Objetivo geral:

Identificar a formação, ou não, de inflamassomas e de seus componentes em leucócitos de indivíduos portadores de anemia falciforme.

Objetivos Específicos:

- 1-** Estabelecer se há formação e ativação dos componentes do inflamassoma (com a consequente produção e liberação de IL-1 β e IL-18) nos leucócitos (neutrófilos e monócitos) de indivíduos portadores de anemia falciforme.
- 2-** Avaliar a presença de alguns DAMPs circulantes que potencialmente contribuem para a formação de inflamassoma na anemia falciforme.
- 3-** Caracterizar a via de ativação da formação dos inflamassomas leucocitários na anemia falciforme.

3.2. Subprojeto II:

Objetivo geral:

Empregar a técnica BiFC, desenvolvida pelo laboratório da Dr. Bouchier-Hayes, para investigar a capacidade do plasma e do sobrenadante de neutrófilos provenientes de indivíduos portadores de AF em ativar caspase-1 e avaliar a dimerização desta caspase com os componentes do inflamassoma.

Objetivos Específicos:

- 1- Avaliar a capacidade do plasma de indivíduos portadores de AF em induzir a dimerização de caspase-1 e/ou a secreção de IL-6 (via da IL-1 β), em células HeLa e MCF-7.
- 2- Correlacionar o efeito do plasma de indivíduos pediátricos portadores de AF na dimerização de caspase-1 com os parâmetros hematológicos e níveis de HbF destes indivíduos.
- 3- Avaliar o papel do heme (DAMP) na indução da atividade de caspase-1, observando o efeito da co-incubação com hemopexina (*scavenger* de heme) na dimerização de caspase-1.
- 4- Avaliar se o sobrenadante de neutrófilos AF, ativados ou não, induz a dimerização de caspase-1 e/ou a secreção de IL-6, quando co-incubados com células HeLa.

4. CASUÍSTICA E ASPECTOS ÉTICOS

4.1. Subprojeto 1:

Os Médicos responsáveis pelos pacientes portadores de anemia falciforme (pacientes AF): Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa, Prof^a Dra. Sara T.O. Saad, Centro de Hematologia e Hemoterapia, UNICAMP, foram os responsáveis por revisar os casos dos pacientes portadores de AF. Foram recrutados para este estudo, pacientes AF homozigotos (AF) e indivíduos saudáveis sem anemia falciforme (CTRL). Pacientes AF em acompanhamento pelo Hemocentro da UNICAMP foram diagnosticados através dos métodos de eletroforese de hemoglobina e de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) (VARIANTTM; Bio-Rad Laboratories). Os pacientes foram recrutados para o estudo em fase estável, ausência de crises de dores, sem infecção e transfusões prévias por pelo menos 3 meses anteriores à data da coleta das amostras. O início do tratamento do grupo de pacientes em terapia com hidroxiuréia (HU; 15-30 mg/Kg/dia em tratamento há pelo menos 3 meses) foi decidido pelo médico responsável de acordo com os seguintes critérios de inclusão: ocorrência de crises de vaso-oclusão superiores à 3 vezes ao ano, e/ou repetidos episódios de síndrome torácica aguda. Todos os indivíduos que participaram deste estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado no dia 29 de Janeiro de 2015, pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Projeto de acordo com a Resolução CSN 466/12 número CAAE 31962214.1.0000.5404 (anexo 1). (Veja Tabela 1 para dados clínicos e demográficos para estes pacientes).

4.2. Subprojeto 2:

Pacientes pediátricos e jovens adultos com AF (AF – com idade entre 10-20 anos) sem ou com tratamento de Hidroxiureia (n=14) e adultos controles (n=5) (CTRL- com idade entre 18-35 anos) foram recrutados para o estudo. Os pacientes AF foram diagnosticados através dos métodos de eletroforese de

hemoglobina e de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) (VARIANT™; Bio-Rad Laboratories) e estavam recebendo acompanhamento médico no Texas Children's Hospital. Neste projeto, o grupo controle foi composto através de funcionários (indivíduos saudáveis) do Baylor College of Medicine/Texas Children's Hospital (Houston-TX, EUA). Os pacientes foram recrutados durante o estado estacionário da doença, sem nenhum episódio doloroso agudo ou crises de vaso oclusão durante os 3 meses anteriores à data da coleta. Para os pacientes em uso de HU, o início do tratamento do grupo em terapia com hidroxiuréia (HU; 15-30 mg/Kg/dia) teve início pelo menos 3 meses antes da data de coleta.

O consentimento informado por escrito foi obtido de sujeitos e/ou responsáveis pelos indivíduos com idade inferior a 18 anos, de acordo com o comitê de ética estabelecido pelo Texas Children's Hospital e submetido ao comitê de ética em pesquisa do Baylor College of Medicine. O hemograma de rotina e a dosagem dos níveis de hemoglobina fetal (HbF) foram adquiridos após a inclusão dos pacientes no estudo (Veja Tabela 2 para dados clínicos e demográficos para estes pacientes).

5. MATERIAIS E METODOS

5.1. Separação de plasma do sangue periférico

O sangue periférico foi coletado em tubo de EDTA e centrifugado a 1000g durante 15 minutos a temperatura de 4 °C. As amostras de sangue foram processadas dentro de 30 minutos, após a coleta para evitar a ocorrência de hemólise. O plasma foi retirado e cuidadosamente fracionado para armazenamento em -80°C (19).

5.2. Separação de monócitos e neutrófilos do sangue periférico

O sangue periférico foi coletado em tubo de heparina; os neutrófilos foram separados utilizando um gradiente de Ficoll-Hypaque® (Sigma-Aldrich, MN, EUA) de densidades 1.0771 g/mL e 1.1191 g/mL de acordo com (19). Para o isolamento dos monócitos totais, a primeira camada, contendo as células mononucleares (PBMC) foi retirada e as células foram diluídas 1:2 em meio RPMI; após essa etapa, os monócitos foram separados através de um gradiente de Percoll® (Sigma-Aldrich) (45%), de acordo com (127) e ressuspensos em meio RPMI (5×10^5 células/mL) para uso nos ensaios. A segunda camada de células (localização dos neutrófilos, no gradiente de ficoll-hypaque), foi retirada e realizada uma “*lise celular*” com o uso do tampão de lise de amônia, após essa etapa, os neutrófilos foram lavados em PBS, ressuspensos em meio RPMI e ajustados para a concentração de 2×10^6 células/mL para o uso em ensaios. Apenas as amostras com mais de 92% de pureza foram utilizadas nos experimentos (determinado por *cytospin* das células e análise morfológica).

5.3. Separação de células mononucleares (PBMC) do sangue periférico

Após a coleta do sangue em tubo de heparina, as células PBMC foram isoladas utilizando um gradiente de Ficoll-Hypaque de densidades 1.0771 g/mL e 1.1191 g/mL de acordo com (19). Subsequentemente, a primeira camada de células foi retirada e resuspensa em PBS, para depois isolar as células PBMC por centrifugação (800g, 20 minutos, 20°C). O sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi usado para os experimentos de Western blotting e co-immunoprecipitação.

5.4. Purificação de monócitos CD14+ por seleção positiva de células usando colunas magnéticas

Os monócitos também foram isolados com o uso das beads CD14+, uma vez, que quando isolados pela técnica de Percoll®, não obtemos uma pureza maior que >80%. As células PBMC foram isoladas a partir de amostras de sangue através da técnica de separação por Ficoll-Hypaque de densidades 1.0771 g/mL e 1.1191 g/mL de acordo com (19). Da suspensão de células PBMC, os monócitos CD14+ foram isolados utilizando microbeads magnéticas anti-CD14 (Miltenyi Biotech®, Auburn, CA, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. As células foram lavadas com tampão MACS (PBS suplementado com 1% de BSA e citrato ácido dextrose) e centrifugadas a 360g durante 5 minutos. O sobrenadante foi completamente eliminado e as células foram ressuspensas em tampão MACS (para cada 10^7 de células foi usado 40µl de tampão) e para cada 10^7 células foram adicionados 10µL de beads anti-CD14 (Miltenyi microbeads Biotech). A solução de células/beads foi uniformizada, e incubada durante 20 minutos a 4 °C, em seguida as células foram lavadas em tampão MACS e centrifugadas a 650g durante 10 minutos. As células foram ressuspensas em 500µl de tampão MACS e passadas através de um filtro de 70µm (BD Falcon) para remover aglomerados celulares. A coluna magnética LS (Miltenyi Biotech®) foi fixada no seu respectivo suporte magnético e lavada com 3mL tampão de MACS. Posteriormente as células foram adicionadas na coluna, seguida por 3 lavagens de 3mL com tampão de MACS. Em seguida, a coluna foi

removida do suporte magnético e com auxílio de um êmbolo as células CD14⁺ aderidas na coluna foram eluídas em 5mL de tampão de MACS. As células purificadas foram lavadas em RPMI completo, centrifugadas a 360g durante 5 minutos, contadas e ajustada na concentração de acordo com o experimento.

5.5. Separação de neutrófilos de buffy coat

Bolsas de buffy coat foram obtidas do Gulf Coast Regional Blood Center com o consentimento do Conselho do banco de Sangue do Texas. Para as amostras de pacientes AF, foram coletadas bolsas de sangue, provenientes do serviço de aférese do Texas Children's Hospital com consentimento e de acordo com as normas estabelecidas pelo hospital.

A amostra foi diluída 1:2 com PBS estéril e centrifugada (Centrífuga Eppendorf 5810R) a 1250g durante 10 minutos à temperatura ambiente. A camada do buffy coat que continha os leucócitos foi removida, diluída em PBS, e submetida a gradiente de densidade com Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare®, Chicago, EUA). Subsequentemente, os neutrófilos foram isolados por centrifugação (800g, 30 minutos, 20°C). A camada de neutrófilos foi cuidadosamente removida usando uma pipeta Pasteur, e as células foram lavadas em PBS estéril e centrifugada durante 10 minutos a 650g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento contendo os neutrófilos foi submetido à lise das hemácias (em tampão de lise de amônia - durante 15 min) e centrifugado novamente a 290g durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em meio RPMI completo e realizada a contagem total das células. O meio RPMI completo foi suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de L-Glutamina e 100 unidades/mL de penicilina. Para a contagem, as células em meio RPMI foram diluídas em azul de tripan (Sigma Aldrich®, Missouri, EUA) e os neutrófilos viáveis foram contados através de um microscópio. Os neutrófilos obtidos por esta técnica foram utilizados nas concentrações especificadas nos experimentos realizados no subprojeto II.

5.6. ELISA

Concentrações de Pró-IL-1 β , IL-1 β , IL-18, IL-1 α , TNF- α , IL-33, e IL-6 foram determinados no plasma e/ou sobrenadante celular utilizando kits de ELISA específicos para a detecção de cada proteína (R&D systems®, Minneapolis, MN, EUA). O nível plasmático de HMGB1 foi determinado com o uso do Kit de ELISA HMGB1 (CD creative diagnostics®, NY, EUA). A proteína HSP70 foi determinada através do uso do kit de ELISA HSP70 HS (Enzo life sciences®, NY, EUA). A faixa de detecção de cada Kit de ELISA e fabricantes pode ser acessada no apêndice I.

5.7. Determinação de ATP e heme no plasma

Os níveis de ATP foram avaliados através do ensaio de bioluminescência utilizando o Kit Molecular probes® ATP determination (Thermofischer®, Rockford, IL, EUA), de acordo com as instruções do fabricante e utilizando o equipamento SpectraMax® minimax 300 Imaging Cytometer para detecção da bioluminescência. Os níveis de Heme livre nas amostras de plasma foram quantificados através do kit colorimétrico Quantichrom heme assay (Bioassay systems®, Hayward, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

5.8. Citometria de Fluxo para determinação da ativação de caspase-1

Utilizamos a técnica de citometria de fluxo com o emprego da sonda de marcação intracelular, FAM-YVAD-FMK (Fam-Flica Caspase-1 reagent, Immunochemistry Technologies®, Bloomington, MN, EUA), a qual, ao se ligar irreversivelmente a caspase-1 ativada, se torna covalentemente acoplado a enzima ativa, sendo retido intracelularmente. O sangue periférico foi submetido à lise das hemácias, utilizando o tampão de lise (Pharm Lyse Buffer – BD) e as células foram imediatamente lavadas com DPBS Calcium, Magnesium (Dulbecco's phosphate buffer saline - 1X - pH=7,4). As células foram ressuspensas a 1×10^7 células/mL em PBS em tubos de citometria. O reagente

FAM-YVAD-FMK (Fam-Flica Caspase-1 reagent, Immunochemistry Technologies®) foi adicionado (1:40), de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, foram adicionados anticorpos anti-CD66b conjugado ao fluorocromo PE (para identificação de neutrófilos – 1:100) e anticorpos anti-CD16 conjugado ao fluorocromo APC (1:100) e CD14 conjugado ao fluorocromo Percp (1:30) (para identificação de monócitos) - (Becton Dickinson®, Franklin Lakes, NJ, EUA). Após incubação á 30 min, 37° C, 5% CO₂, as células foram lavadas 2x com PBS 1X. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson®), utilizando o BD FACSDIVA® Software (Becton Dickinson®). Foram analisadas um total de 50.000 células, das quais os neutrófilos e monócitos foram identificados de acordo com os parâmetros FSC/SSC e a expressão dos marcadores celulares. A porcentagem de células Caspase-1 positiva (FLICA+) foi calculada utilizando dot plots. As imagens dos dot plots podem ser acessadas no apêndice II.

5.9. Imunofluorescência e microscopia confocal para análise da molécula ASC

As células (2x10⁶ total) foram aderidas á lamínulas previamente recobertas com fibronectina 20 µg/mL (16h, 37° C, 5% CO₂). Subsequentemente, as lamínulas foram lavadas repetidamente com PBS, fixadas com paraformaldeído 4% e bloqueadas com PBS/BSA 3%. As células foram incubadas com o anticorpo primário anti-ASC (Santa Cruz Biotechnology ® Dallas, TX, EUA) (com diluição de 1:100 em PBS/BSA 3%) por 16h, o mesmo foi realizado com o anticorpo secundário conjugado ao Alexa fluor 488 (com diluição de 1:400) (Life Technologies®, Waltham, MA, EUA). Para finalização, as lamínulas foram montadas com o marcador nuclear DAPI (Prolong Gold DAPI ThermoFisher®). As observações das células foram realizadas no microscópio invertido confocal LSM780 NLO (Zeiss ®, Alemanha) com controle de temperatura e CO₂, utilizando os lasers Argon para visualização do fluorocromo 488 e o NLO-Mai Tai para o DAPI (INFABIC-UNICAMP) (128).

5.10. Identificação dos “specks” de caspase-1 e de ASC por citometria de fluxo por imagem

Utilizamos citometria de fluxo por imagem (*Amnis ImageStream Mark II/ Milipore®*) para identificar e quantificar a presença de “specks” de caspase-1 e de ASC em neutrófilos e em monócitos. Após o isolamento das células (como descrito anteriormente), estas ($2 \times 10^7/\text{mL}$) foram marcadas com anticorpos fluorescentes; anti-CD66b PE (1:50) para identificação de neutrófilos, e anti-CD14 PercP (1:50) mais anti-CD16 APC (1:50) (Becton Dickinson®) para identificação dos monócitos e de suas subpopulações. Os aglomerados de caspase-1 ativada e de ASC foram revelados mediante incubação das células com a sonda FAM-YVAD-FMK FLICA® (como descrito previamente) seguida de marcação intracelular com o anticorpo anti-ASC Alexa Flúor 647 (30 minutos, 1:50) - (Santa Cruz Biotechnology®). Aproximadamente 10.000 eventos contidos em uma região delimitada por área igual ou superior a $100\mu^2$ foram adquiridos em citômetro de imagem com 488 nm, 642 nm e 785 nm ativados e amplificação de imagem configurada para 40X. As imagens foram analisadas pela aplicação de um protocolo de análise guiada, o “*Spot Wizard*”, do *software* IDEAS. Durante o processo guiado pelo “Spot Wizard” foi criada uma máscara sobre as regiões brilhantes do objeto (“*spots ou specks*”) e, manualmente, foram selecionadas imagens representativas de duas populações: uma população contendo poucos “*spots*” de caspase-1 ou de ASC e outra contendo muitos “*spots*” para caspase-1 ou ASC; finalmente, a partir desses modelos de populações, o “*Spot Wizard*” gerou um histograma da frequência de células para cada número de “*spots*” (106).

5.11. Tratamento das células com drogas inibidoras de componentes de inflamassoma e de NFkB

Após isolamento dos neutrófilos e monócitos (2×10^6 e 5×10^5 células totais, respectivamente, em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino 10%), as células foram incubados com o inibidor de NLRP3 - *MCC 950* (5 μM) (Invivogen®, San Diego, CA, EUA), com o inibidor de caspase 1 - *YVAD* (40 μM) (Biovision Incorporated®, Milpitas, CA, EUA) com o inibidor de NFkB- *BAY*

117082 (10 μ M) (Calbiochem®, La Jolla, CA, EUA), e/ou com o inibidor de ASC – CAPE (5 μ M) (Abcam®, Cambridge, Inglaterra) ambos por 1 hora. Posteriormente foi realizada a retirada do sobrenadante e o congelamento do mesmo para mensuração dos níveis de IL-1 β , através de ELISA. Adicionalmente, as células foram analisadas para a atividade de caspase-1, como descrito anteriormente. Células estimuladas com LPS (100 ng/mL) (*priming* de sinal 1) durante 3 horas e com ATP (sinal 2) durante 30 min foram utilizadas como um controle positivo.

5.12. Tratamento das células com pool de plasma

Após isolamento, os neutrófilos (2×10^6 células/mL em meio RPMI) foram incubados com 5-10% do pool de plasma de controles saudáveis ($n=6$) ou pool de plasma de AF em uso ou não de HU ($n=6$) por 2 horas, posteriormente, as células foram processadas de acordo com a técnica descrita.

5.13. Determinação de pró-IL 1 β

Neutrófilos de controles saudáveis e de pacientes AF com e sem HU, foram isolados (6×10^6 células em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino). Após esse período de incubação, retiramos o sobrenadante e às células aderentes foram lisadas com tampão de lise celular, associado com lise mecânica (aproximadamente 60 segundos com movimentos circulares e força constante), para verificação da lise, a placa foi levada ao microscópio invertido para total certificação de que não haviam células aderidas na placa. Após finalização, o sobrenadante e lisado celular foram congelados e posteriormente realizado ELISA para avaliação da liberação de pró-IL 1 β (R&D systems® - faixa de detecção: 23,4 – 1.500 pg/mL e sensibilidade de detecção de 3.3 pg/mL).

5.14. Extração de RNA

O RNA dos neutrófilos foi isolado utilizando o método de extração por Trizol (ThermoFisher scientific ®), seguindo as instruções do fabricante a partir de 15×10^6 células totais. A quantificação do RNA foi realizada através da leitura da densidade óptica (DO) de uma alíquota da amostra em espectrofotômetro NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer) com comprimento de onda equivalente a 260 nm, considerando que 1 DO à 260 nm equivale a 40 mg/mL de RNA. A relação entre as leituras realizadas a 260 e 280 nm foi utilizada como parâmetro na estimativa do grau de contaminação do RNA por proteínas. A integridade das amostras foi avaliada pelo programa 2100 Expert (Agilent) na qual permite uma estimativa da integridade do RNA por meio de análise da intensidade das bandas de todo o traçado eletroforetico da amostra. Apenas as amostras de alta integridade foram utilizadas nos experimentos.

5.15. Tratamento do RNA total com DNase I e síntese de cDNA

O RNA total de neutrófilos foi tratado com DNase livre de RNase 1 U/ μ L (Life Technologies®), utilizando 1 U da enzima para tratar 5 μ g de RNA por 15 minutos à temperatura ambiente, a fim de eliminar uma possível contaminação deste material com DNA genômico. A reação foi interrompida pela adição de uma solução de EDTA com concentração final de 2 mM. A enzima foi inativada por uma incubação de 10 minutos a 65°C. A transcrição reversa foi realizada utilizando-se o kit Super Script III (Life Technologies ®), de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA produzido foi armazenado a -20°C até o uso em ensaios.

5.16. PCR quantitativo (PCRq)

A amplificação do cDNA foi realizada no ABI 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA) utilizando-se SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems®). Quarenta ng de cada amostra de cDNA

foram utilizadas na reação com os iniciadores. Um controle negativo, sem adição de cDNA, foi realizado para cada par de iniciadores. O protocolo de dissociação se realizou no final de cada reação para verificar amplificações não específicas. Cada reação foi repetida duas vezes no mesmo experimento. Os primers foram desenhados de acordo com (Primer-express, Applied Biosystems®) e comprados (Invitrogen®, São Paulo, Brasil). Para confirmar a precisão e reprodutibilidade da PCR em tempo real, a precisão intra-ensaio foi calculado de acordo com a equação $E (-1/\text{slope})$. As amostras foram analisadas em duplicata e os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (UA) da expressão gênica quando comparados com o gene controle *Beta-Actina* (*ACTB*) e Ribosomal protein L13 (*RPL 13*)(129). As sequências de iniciadores podem ser acessadas no apêndice III.

5.17. Extração de proteínas, imunoprecipitação de complexos proteicos e Western blotting

As células (neutrófilos e células mononucleares) foram lisadas em tampão HSLB (50 mM HEPES, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, glicerol 10%, NP-40 1%) contendo inibidores de protease (PMSF 100 mM, leupeptina 1mg/mL, Na_3VO_4 100 mM) e mantidas em gelo por 30 minutos. Em seguida, os lisados foram centrifugados a 12.000 *g* por 20 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos de 1,5 mL e o conteúdo proteico foi dosado pela utilização do reagente (BioRad®, Hercules, CA, EUA), tendo como base uma curva padrão de albumina (BSA), segundo as especificações do fabricante. Quando foram realizados estudos de co-imunoprecipitação, quantidades correspondentes a 400 µg de extrato proteico foram incubadas com 2-5 µg do anticorpo (conforme recomendado pelo fabricante) por 16-18 horas (4°C) sob agitação. Os imuno-complexos foram recuperados pela incubação com solução de 50% proteína-A Sepharose (GE) por 1 hora sob agitação (4°C), seguida de lavagens em tampão solução para lavar o imunoprecipitado (três lavagens com centrifugações de 30 segundos 10.000 *g* entre elas) para remoção das ligações inespecíficas.

Quantidades de proteínas correspondentes a 25 µl foram fracionadas em gel á 15% de poliacrilamida-SDS. Após a corrida, as proteínas foram transferidas

para membranas de nitrocelulose de 0.45 *Microns* (Thermo Scientific®) por 2 horas (4°C), 100 volts. As membranas foram incubadas em solução de TBS-T (50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl e 0,1% Tween-20) contendo 5% de leite desnatado para bloqueio dos sítios inespecíficos. Em seguida foram incubadas com anticorpo primário de interesse (diluições 1:1000) por 16-18 horas. No dia seguinte foram lavadas em TBS-T por 3 vezes de 10 minutos e, em seguida, foram incubadas com anticorpo secundário conjugado a peroxidase (KPL) por 1 hora (temperatura ambiente). Seguiram-se outras lavagens para retirada do excesso de anticorpo e os Westerns foram revelados utilizando-se o reagente *Pierce ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Scientific®). Para quantificação das bandas na membrana utilizou-se o programa ImageJ, disponível no site do NIH (Bethesda, USA) (130).

Para Western blotting, extratos totais das células (50-100 µg), foram submetidos à eletroforese em gel de 15% de poliacrilamida-SDS e a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose ocorreu como descrito acima. Em seguida a membrana foi incubada com o anticorpo de interesse, como descrito acima. A diluição dos anticorpos utilizados no Western blotting, pode ser acessada no apêndice IV.

5.18. Cultivo de células HeLa e MCF-7 para estudo de transfecção BiFC

As células de linhagem HeLa (células imortalizadas provenientes de um câncer cervical), MCF-7 (células provenientes de um câncer de mama) foram obtidas através do banco da American Type Culture Collection – (ATCC, Manassas, VA, EUA). As células HeLa e MCF-7 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, L-glutamina e penicilina. As células foram cultivadas a 37°C em uma estufa umidificada com 5% de CO₂. As células estavam na 15ª passagem e a cada dois dias (70-90% de confluência celular) foram tratadas com tripsina e transferidas para uma nova placa.

5.19. Clonagem de Plasmídeos

Os plasmídeos de caspase BiFC, dsRed-mito e ASC foram clonados pela técnica de PCR padrão com a utilização de *primers* específicos para incorporação dos locais de enzimas de restrição apropriados dentro de um plasmídeo de caspase-1 completo (ICE) para um plasmídeo BiFC. Após esta etapa, foi realizada uma validação para verificar a sua função em relação ao recrutamento de inflamassomas (131). As mutações pontuais foram introduzidas usando o Kit *Quick Change Site Directed Mutagenesis* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), e após a clonagem, cada plasmídeo foi verificado por sequenciamento convencional. Os plasmídeos que expressam a molécula ASC foram gentilmente cedidos pelo laboratório do Dr. Seamus Martin (Trinity college, Dublin, Irlanda) para o laboratório da Dr. Bouchier-Hayes (Baylor college of medicine/Texas Children's Hospital, Houston, EUA). O plasmídeo dsRed-mito (Clontech) foi usado como *reporter* para o experimento de transfecção. As sequências de plasmídeos utilizados para este estudo, bem como, a padronização da concentração e a titulação utilizada nos ensaios, podem ser acessadas no apêndice V, VI, VII.

5.20. Ensaios de transfecção

As células HeLa e MCF-7 (1×10^5 células/mL) foram plaqueadas 24 horas antes da transfecção em placas de 12 poços e transfectadas transitoriamente utilizando o reagente de transfecção lipofectamina 2000 (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) e com as combinações de plasmídeos de caspase-1, denominados de C1-Pro VC (5 ng), C1-Pro VN (5 ng) e dsRed-mito (5 ng) (sendo este o repórter desta transfecção). Como controle positivo, algumas células foram transfectadas com C1-Pro VC, C1-Pro VN e dsRed-mito (5 ng), e também com um plasmídeo para codificação de ASC (125 ng). Após 48 horas do início da transfecção, as células foram analisadas.

5.21. Análise de células vênus-positivas em tempo real por microscopia confocal

As células HeLa e MCF-7 (1×10^5 células/mL) foram plaqueadas em placas de 12 poços, contendo lamínulas de vidro revestidas com fibronectina (Mattek Corp, Ashland, MA, EUA) 24 horas antes da transfecção. Após os tratamentos, as células foram visualizadas usando um microscópio confocal de disco giratório (Zeiss, Thornwood, NY, EUA), equipado com uma unidade de disco giratório CSU-X1A500 (Yokogawa electric corporation, Tóquio, Japão), módulo multi-laser com comprimentos de ondas de 458, 488, 514 e 561 nm, e um microscópio invertido motorizado Axio observer Z1 equipado com um estágio XY motorizado de precisão (Carl Zeiss MicroImaging, Thornwood, NY, USA). As imagens foram adquiridas com uma objetiva Zeiss PlanNeofluar 40x1.3 NA ou 64x1.4 NA em uma câmera Orca R2 CCD usando o software Zen 2012 (Zeiss, Thornwood, NY, EUA). Aproximadamente 25-50 Imagens foram obtidas por poço, e a análise foi realizada através do cálculo da porcentagem de células positivas para a proximidade induzida de caspase (nomeadas de células venus-positivas), a partir do número total de células transfectadas.

5.22. Análise Estatística

Os dados são apresentados como médias $\pm$ erro da média (SEM) de N de indivíduos. Os dados foram confirmados como paramétricos ou não-paramétricos e as médias foram comparadas, utilizando os testes; de Kruskal-Wallis e o pós teste de Dunns (teste não-paramétrico e não-pareado para análise de 3 ou mais grupos); Mann-Whitney (teste não-paramétrico e não-pareado para análise entre 2 grupos), Wilcoxon e two-way ANOVA (teste não-paramétrico, para comparação de grupos pareados). Os gráficos e os cálculos foram gerados utilizando o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.). Os valores de p menores ou igual a 0,05 foram considerados como estatisticamente significantes.

6. RESULTADOS

6.1. Subprojeto 1: Investigação da formação de inflamassoma em pacientes com anemia falciforme

6.1.1. População de pacientes AF estudados

Neste estudo investigamos a formação de inflamassomas em leucócitos de pacientes portadores de AF. Indivíduos controles (indivíduos saudáveis HbAA - grupo CTRL, N=120) e indivíduos portadores de AF em estado estável (HbSS, grupo AF, N=95) foram recrutados no setor de doação de sangue e no ambulatório de hematologia do hemocentro da UNICAMP, respectivamente. Dos pacientes, 63 estavam em terapia com HU (15–30 mg/kg/d), como dados posteriores não mostraram diferenças significantes referente a liberação de IL-1 β e a formação de inflamassomas nos leucócitos, entre pacientes tomando ou não HU, os pacientes foram agrupados em um unico grupo. Segue abaixo, os dados clínicos dos pacientes AF utilizados neste estudo (Tabela 1). Os controles foram pareados aos pacientes em sexo ou idade, quando possível.

Tabela 1. Detalhes clínicos dos pacientes participantes deste estudo (população – Hemocentro, UNICAMP, Campinas, Brasil)

Parâmetros Hematológicos	Média (Mediana, Min, Max)
Homem/Mulher	43/52
Idade (anos)	38,5 (37,5; 19; 65)
Nº de paciente sem/com tratamento com HU	32/63
Células vermelhas ($10^{12}/L$)	2,55 (2,49; 1,39; 6,36)
Hematócrito (%)	26, 2 (25,85; 16,5; 47,8)
Hemoglobina (g/L)	8,65 (8,5; 4,9; 16,9)
Vol. Corpuscular médio (fl)	104,05 (102,9; 68,2; 144,1)
Reticulócitos (%)	13,05 (12,95; 2,09; 28)
Contagem leucócitos ($10^9/L$)	8,04 (8,21; 3,32; 14,1)
Contagem plaquetas ($10^9/L$)	372,9 (370,25; 85; 888)
HbF (%)	11,75 (11,85; 2; 28,8)

Com exceção do sexo, todos os dados estão representados como média (mediana; mínimo; máximo) valores para pacientes com AF em estado estável (AF), pacientes AF em terapia com HU (AFHU; 15–30 mg/kg/d). HbF: hemoglobina fetal.

6.1.2. Determinação dos níveis plasmáticos de IL-1 β e IL-18

Os níveis de IL-1 β e IL-18 foram determinados no plasma de indivíduos controle (controles; CTRL, n= 11-12) e indivíduos portadores de anemia falciforme (AF, n=23) pelo método de ELISA. Os níveis plasmáticos de IL-1 β (Figura 4A) e de IL-18 (Figura 4B) foram significativamente maiores ($p<0.001$) em indivíduos AF, quando comparado ao grupo controle. Dados indicam que há um aumento significativo no processamento de IL-1 β e IL-18 em indivíduos

portadores de AF, indicativo de uma maior formação de inflamassoma nesses indivíduos.

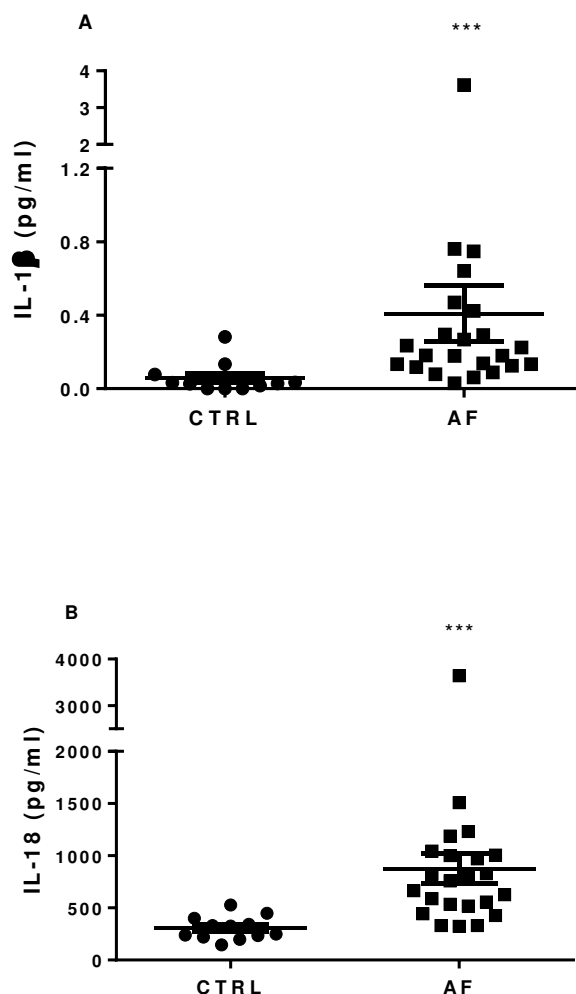


Figura 4. Determinação dos níveis plasmáticos de IL-1 β e IL-18. Níveis de (A) IL-1 β e (B) IL-18 no plasma de indivíduos controles (CTRL, n= 11-12) e indivíduos portadores de AF (AF, n= 23). Os níveis de IL-1 β e IL-18 foram avaliados através de ELISA. Para o teste estatístico usou-se o teste de Mann-Whitney, ***p<0.001; comparado ao grupo controle.

6.1.3. Determinação da liberação de IL-1 β por neutrófilos de indivíduos controles e AF

Os neutrófilos representam cerca de 60 a 70% dos leucócitos da circulação sanguínea humana e são uma fonte importante de citocinas pró-

inflamatórias. Diante disso, avaliamos a liberação de IL-1 β proveniente de neutrófilos isolados (2×10^6 células/ml) do sangue periférico de indivíduos controles e de indivíduos AF, durante 2 horas de incubação (37°C, 5% CO₂), em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após esse período de incubação, o sobrenadante foi coletado e avaliamos as concentrações dessa citocina. Os neutrófilos de indivíduos portadores de AF (AF) liberam uma maior quantidade de IL-1 β ($p < 0.0001$) quando comparado aos neutrófilos de indivíduos controles (CTRL) (Figura 5).

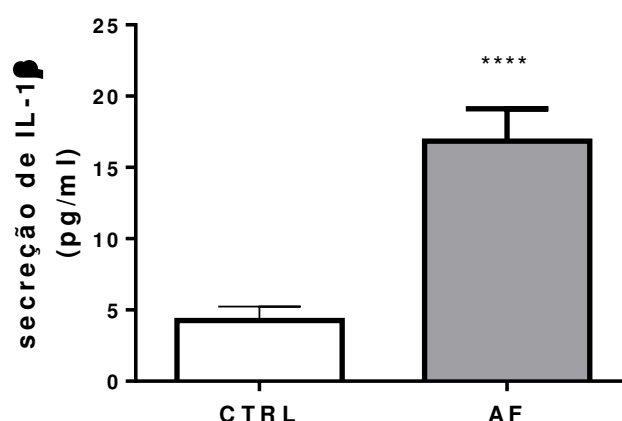


Figura 5. Determinação dos níveis de IL-1 β no sobrenadante de neutrófilos. Liberação de IL-1 β pelos neutrófilos de indivíduos controles (CTRL, n=8) e de indivíduos portadores de AF (AF, n=19). Células isoladas foram incubadas (2h, 37°C, 5% CO₂) e as concentrações de IL-1 β no sobrenadante foram avaliadas através do ensaio de ELISA. Para o teste estatístico usou-se o teste de Mann-Whitney. **** $p < 0.0001$; comparado ao grupo controle.

6.1.4. Avaliação da produção e liberação de Pró-IL-1 β em neutrófilos

Para confirmar que a IL-1 β liberada pelos neutrófilos AF é IL-1 β já processada pelo inflamassoma, determinamos a quantidade de pró-IL-1 β no lisado celular e no sobrenadante de neutrófilos. Incubamos neutrófilos (6×10^6 células/ml) de indivíduos controles (CTRL, N=4) e AF (AF, N=8), durante 2 horas (37°C, 5% CO₂) em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (nas mesmas condições experimentais para dosagem de IL-1 β). A pró-IL-1 β foi determinada por ELISA específico (Tabela 2) no lisado celular e no sobrenadante. Em neutrófilos de indivíduos controles, não foi possível detectar

pró-IL-1 β nos lisados celulares, bem como nos sobrenadantes. Em contraste, em neutrófilos de quatro dos oito indivíduos portadores de AF foi possível detectar pró-IL-1 β apenas nos lisados celulares com uma média $\pm$ SEM aproximada de 42 pg/ml (N=4).

Esses dados nos indicam que os níveis de IL-1 β encontrado no sobrenadante de neutrófilos AF (Secção 6.3), correspondem a IL-1 β processada pelo inflamassoma e não a forma não-clivada da citocina (pró-IL-1 β). Assim sendo, podemos sugerir que os neutrófilos de indivíduos portadores de AF podem formar inflamassomas e liberar IL-1 β processada.

Adicionalmente, aparentemente há uma produção maior da pró-IL-1 β nos neutrófilos de indivíduos AF, que pode ser uma indicação de *priming* celular.

Tabela 2: Avaliação da liberação de pró-IL-1 β em lisado e sobrenadante de neutrófilos provenientes de indivíduos saudáveis e AF

CTRL/Paciente	Lisado celular	Sobrenadante
CTRL1	Não detectável	Não detectável
CTRL2	Não detectável	Não detectável
CTRL3	Não detectável	Não detectável
CTRL4	Não detectável	Não detectável
AF1	Não detectável	Não detectável
AF2	67,932 pg/ml	Não detectável
AF3	67,013 pg/ml	Não detectável
AF4	Não detectável	Não detectável
AF5	Não detectável	Não detectável
AF6	Não detectável	Não detectável
AF7	29,191 pg/ml	Não detectável
AF8	6,055 pg/ml	Não detectável

A pró-IL 1 β foi determinada no lisado e sobrenadante de neutrófilos (6×10^6 células/ml) provenientes de indivíduos controles (CTRL, N= 4) e indivíduos AF (AF, N= 8), através do kit de pró-IL 1 β ELISA (R&D systems ®).

6.1.5. Avaliação da ativação de caspase-1 em neutrófilos através da técnica de citometria de fluxo

Usamos o kit FAM FLICA, em associação com a citometria de fluxo convencional, para identificar células que apresentavam ativação de caspase-1. O sangue periférico foi obtido de indivíduos controles (CTRL) e indivíduos portadores de anemia falciforme (AF); após lise das hemácias, as amostras foram marcadas com anticorpo para a identificação de neutrófilos (CD66b⁺) e com a sonda intracelular para marcação de caspase-1 ativada. A porcentagem de neutrófilos com marcação para caspase-1 ativada foi avaliada através do deslocamento do gate de neutrófilos e a análise da porcentagem de células na população deslocada (FLICA⁺). Um exemplo dessa análise pode ser observado no apêndice II.

Podemos notar que os neutrófilos de indivíduos portadores de AF apresentam uma porcentagem significativamente aumentada de caspase-1 ativada ($p < 0.001$) quando comparado aos neutrófilos de indivíduos CTRL (Figura 6A). Para a avaliação do número circulantes de neutrófilos apresentando caspase-1 ativada na circulação sanguínea, foi feito a contagem diferencial dos leucócitos de amostras de sangue total de cada indivíduo (através de hemograma automatizado) e contabilizamos o número de neutrófilos FLICA⁺ circulantes, através do número total de neutrófilos (Figura 6B). Como pode ser observado, os indivíduos AF demonstraram aumento significativo ($p < 0.001$) na contagem de neutrófilos com atividade de caspase-1, quando comparado ao grupo controle.

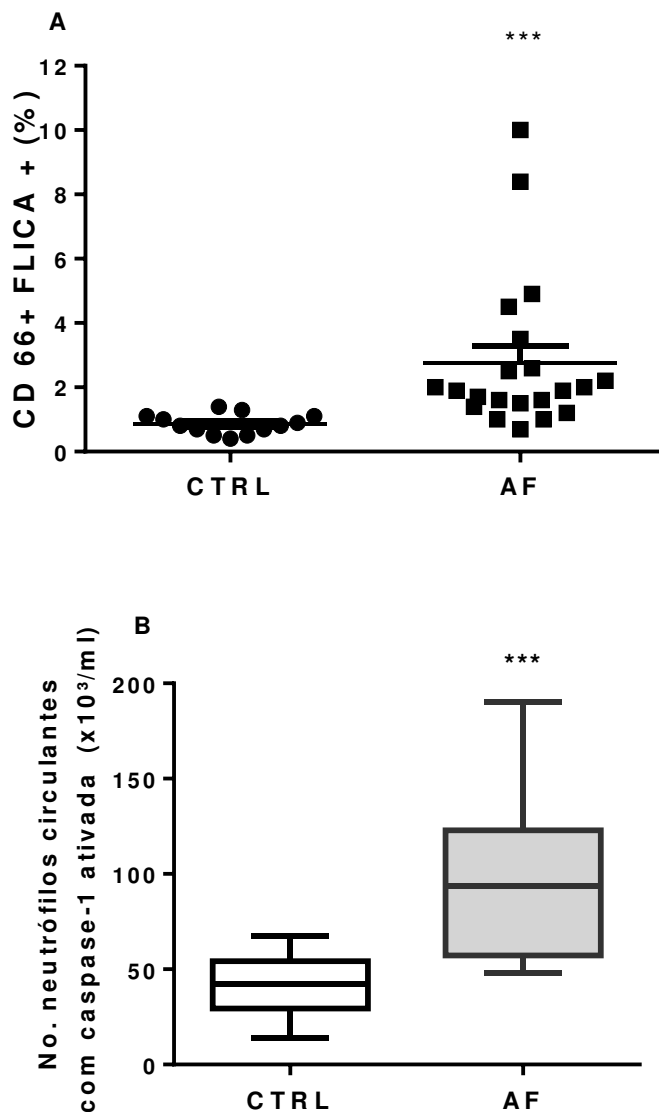


Figura 6. Avaliação da ativação de caspase-1 em neutrófilos em indivíduos controles e AF. Avaliação da ativação de caspase-1 (FLICA⁺) em neutrófilos (CD66b⁺) de indivíduos controles (CTRL, N=9) e indivíduos portadores de AF (AF, N= 21 [A] e 15 [B]. A ativação de caspase-1 foi avaliada através do kit FAM FLICA Caspase 1; (A) Ativação é expressa como porcentagem dos neutrófilos (CD66⁺) positivas para FLICA; (B) avaliação da contagem de neutrófilos com caspase-1 ativada na circulação sanguínea. Para o teste estatístico usou-se o teste de Mann-Whitney. *** p< 0.001; comparado ao grupo controle.

6.1.6. Avaliação da ativação de caspase-1 em neutrófilos através da técnica de citometria de fluxo com imagem

Para melhor caracterizar a ativação de caspase-1 em neutrófilos do sangue periférico, utilizamos a tecnologia da citometria de fluxo com imagem (Amnis ImageStream, Milipore®). Os neutrófilos foram isolados de amostras de sangue periférico (através da técnica de Ficoll-Hypaque) e identificados com o anticorpo CD66b-PE e a atividade de caspase-1 nas células foi avaliada através da sonda intracelular FAM-YVAD-FMK-FLICA.

Os neutrófilos foram primeiramente analisados através da granulosidade e tamanho celular, através dos parâmetros FSC (forward scatter) x SSC (side scatter), posteriormente cada neutrófilo foi avaliado individualmente, através da imagem obtida pela tecnologia do Amnis e a avaliação dos *specks* foi realizada utilizando o software IDEAS. Interessantemente, observamos que a caspase-1, quando ativada, forma múltiplas aglomerações ou “*specks*” (Figura 7A) nos neutrófilos. Visto isso, podemos observar que os indivíduos portadores de AF apresentaram uma maior porcentagem de neutrófilos com ≥ 4 *specks* de caspase-1, quando comparado aos neutrófilos do grupo CTRL (Figura 7B).

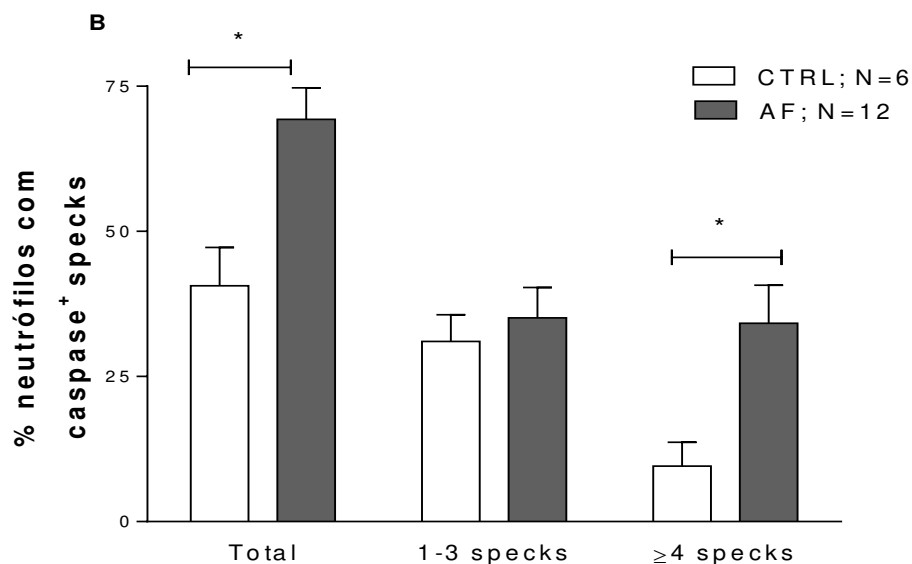
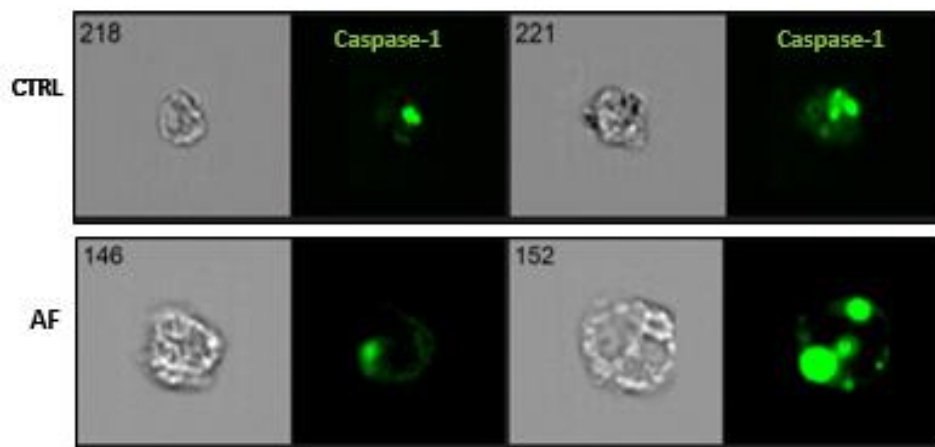


Figura 7. Avaliação da ativação de caspase-1 em neutrófilos. Avaliação da atividade de caspase-1 em neutrófilos de indivíduos controles saudáveis (CTRL) e indivíduos portadores de AF (AF), utilizando citometria de fluxo com imagem. (A) Imagens representativas de neutrófilos CTRL e AF com ≥ 1 speck de caspase-1 (observados como aglomerados puntiformes de caspase-1 ativa). A ativação de caspase-1 pode ser observada em verde (que representa a clivagem peptídica da sonda FAM-YVAD-FMK-FLICA). Neutrófilos foram identificados por citometria de fluxo e as imagens foram obtidas (Amnis ImageStream Mark II) com aumento de 40X para a caracterização dos aglomerados de caspase-1 ativada. (B) Porcentagem de neutrófilos provenientes de indivíduos controles saudáveis (CTRL; N=6) e indivíduos portadores de AF (N=12), com múltiplas *specks* de caspase-1 ativada. Para o teste estatístico usou-se o teste de two-way ANOVA seguido de Bonferroni com Múltiplas comparações, * $p < 0,05$, comparado ao grupo controle.

6.1.7. Avaliação da liberação de IL-1 β dependente de caspase-1 em neutrófilos

Sabe-se que a clivagem da pró-forma de IL-1 β é mediada através da molécula efetora caspase-1. Isolamos neutrófilos provenientes de indivíduos CTRL e de indivíduos portadores de AF e incubamos com o inibidor seletivo de caspase-1, YVAD (40 μ M) (1h, 37°C, 5% CO₂), antes de medir a concentração de IL-1 β no sobrenadante das células. Podemos observar que o uso do inibidor YVAD, diminuiu de forma significativa a secreção de IL-1 β em neutrófilos CTRL estimulados com LPS/ATP, assim como, a liberação de IL-1 β em neutrófilos AF não estimulados (Figura 8), confirmando que a liberação de IL-1 β dos neutrófilos AF (e de neutrófilos controles estimulados) é dependente da ativação de caspase-1.

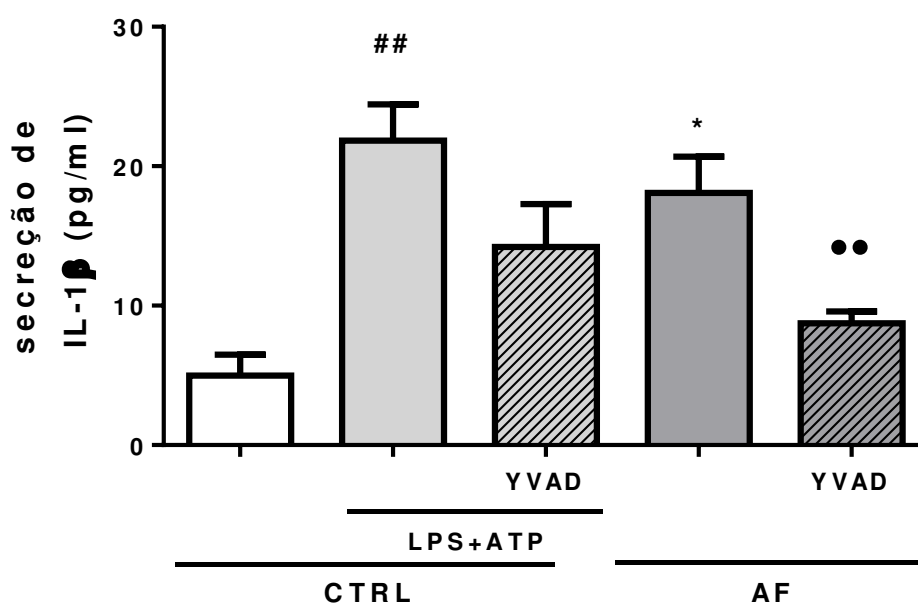


Figura 8. Avaliação da liberação de IL-1 β dependente de caspase-1 em neutrófilos.

Neutrófilos isolados de controles saudáveis (CTRL; N=3) foram ativados ou não com LPS (100 ng/ml) e ATP (2,5 mM) e co-incubados com YVAD (40 μ M); neutrófilos (não estimulados) de indivíduos portadores de AF (AF; N=10) também foram incubados na presença ou ausência de YVAD. Os dados estão representados como média $\pm$ SEM. Para o teste estatístico usou-se o teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunns. ## $p < 0.01$, comparado ao CTRL; * $p < 0.05$; comparado ao grupo CTRL; ** $p < 0.01$, comparado ao grupo AF.

6.1.8. Avaliação da aglomeração da molécula ASC em neutrófilos através de imunofluorescência e microscopia confocal

Os inflamassomas clássicos são geralmente formados através da participação de dois sinais, para que ocorra a expressão do receptor NLRP3 e pró-IL-1 β , há a necessidade do reconhecimento de um primeiro sinal (ex: LPS ou algumas moléculas endógenas) via TLR4 e para a montagem da maquinaria desse complexo multimérico, há a necessidade de um segundo sinal (ex: DAMPs; ATP, HMGB1, heme, HSP70). Esses complexos, em macrófagos e células dendríticas, apresentam a interação do sensor molecular com a molécula adaptadora ASC. A organização de múltiplos dímeros de ASC (as chamadas ASC *specks*, pontos densos de oligomerização de ASC), por sua vez, pode resultar no recrutamento da pró-caspase-1 e a sua clivagem por proximidade induzida. A participação da molécula ASC na formação de inflamassomas tem sido menos caracterizada em neutrófilos e sugere-se que a oligomerização clássica de ASC só ocorra em certas circunstâncias (132). Neste contexto, avaliamos a apresentação de aglomerações de ASC em neutrófilos (formações de vários pontos densos de oligomerização de ASC) de indivíduos controle e de indivíduos AF. Para isto, isolamos neutrófilos de indivíduos CTRL e de indivíduos AF, estimulados ou não com ATP (2,5 mM), e usamos um anticorpo anti-ASC para posterior observação por microscopia confocal (Figura 9).

Os neutrófilos controles não estimulados apresentaram baixa aglomeração de ASC (Figura 9A). Em contraste, após 30 min de estímulo com ATP (sinal 2), há um aumento da aglomeração de ASC nestes neutrófilos ($p < 0.05$) (Figura 9B). Todavia, os neutrófilos de indivíduos portadores de AF apresentaram aglomeração de ASC, mesmo quando não estimulados (Figura 9C e D). Para quantificação da porcentagem de neutrófilos com aglomerados de ASC, contabilizamos as células totais de 5 campos diferentes e dentro de cada campo, identificamos as células que apresentavam aglomerados, essa quantificação pode ser observada na figura 10E, porém, não encontramos diferenças significativas entre os grupos estudados.

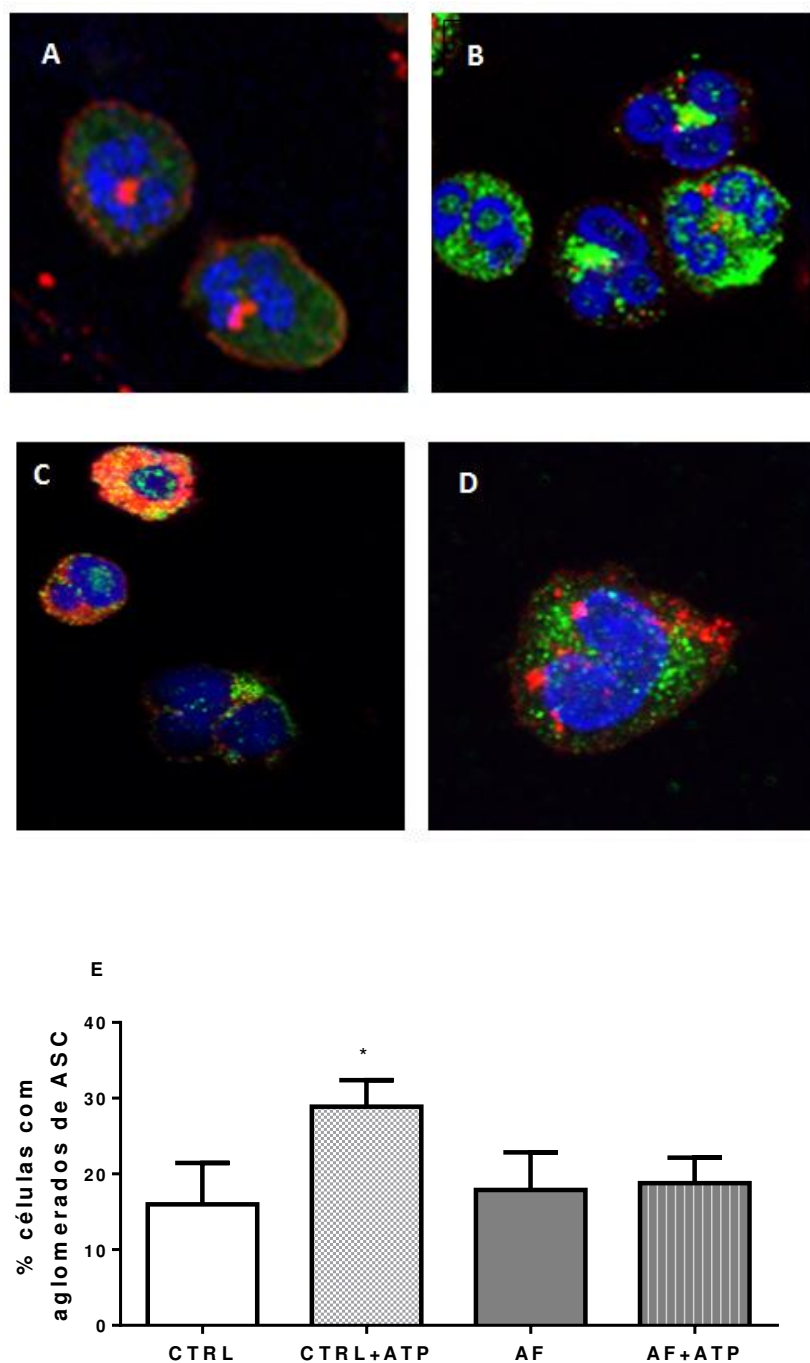


Figura 9. Avaliação da aglomeração da molécula ASC em neutrófilos. Aglomeração da molécula ASC em neutrófilos representativas de (A) indivíduos controles (CTRL) sem estímulo, (B) indivíduos controles, quando estimulados com ATP (2,5 mM) por 30 min; (C) de indivíduo portador de AF sem estímulo e com estímulo com ATP (D). (E) quantificação da porcentagem de neutrófilos de indivíduos CTRL (N=2) e de indivíduos AF (N= 7) com aglomerados de ASC. Para o teste estatístico usou-se o teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunns.* $p < 0.05$, comparado ao grupo CTRL. As imagens foram feitas no microscópio confocal invertido LSM 780 NLO, utilizando os lasers Argon (488) e NLO Mai Tai (DAPI), com aumento de 60 x. Anticorpos: anticorpo primário anti-ASC, anticorpo secundário conjugado ao alexa fluor 488 (verde), Wheat germ Agglutinin, alexa fluor 555 (vermelho) e Prolong® Gold DAPI (azul). Estas imagens são representativas de um N experimental de 4 indivíduos controles e 7 indivíduos portadores de AF.

6.1.9. Observação da oligomerização da molécula ASC em neutrófilos através da técnica de citometria de fluxo com imagem

Dada a escassez da visualização dos ASC *specks* ao observar os neutrófilos provenientes de indivíduos CTRL e de indivíduos AF por microscopia confocal, quantificamos a formação de ASC *specks* nesses neutrófilos por citometria de fluxo com imagem (Amnis ImageStream®).

Visto que não foi possível observar diferença significativa na expressão de ASC entre os neutrófilos CTRL e AF. Confirmamos estes achados através da tecnologia do Amnis. Os dados, obtidos com essa técnica, indicam que a porcentagem de neutrófilos não estimulados de indivíduos controles apresentando ASC *specks* foi significativamente maior ($p < 0.05$) do que em neutrófilos não estimulados de indivíduos AF (Figura 10 A-B).

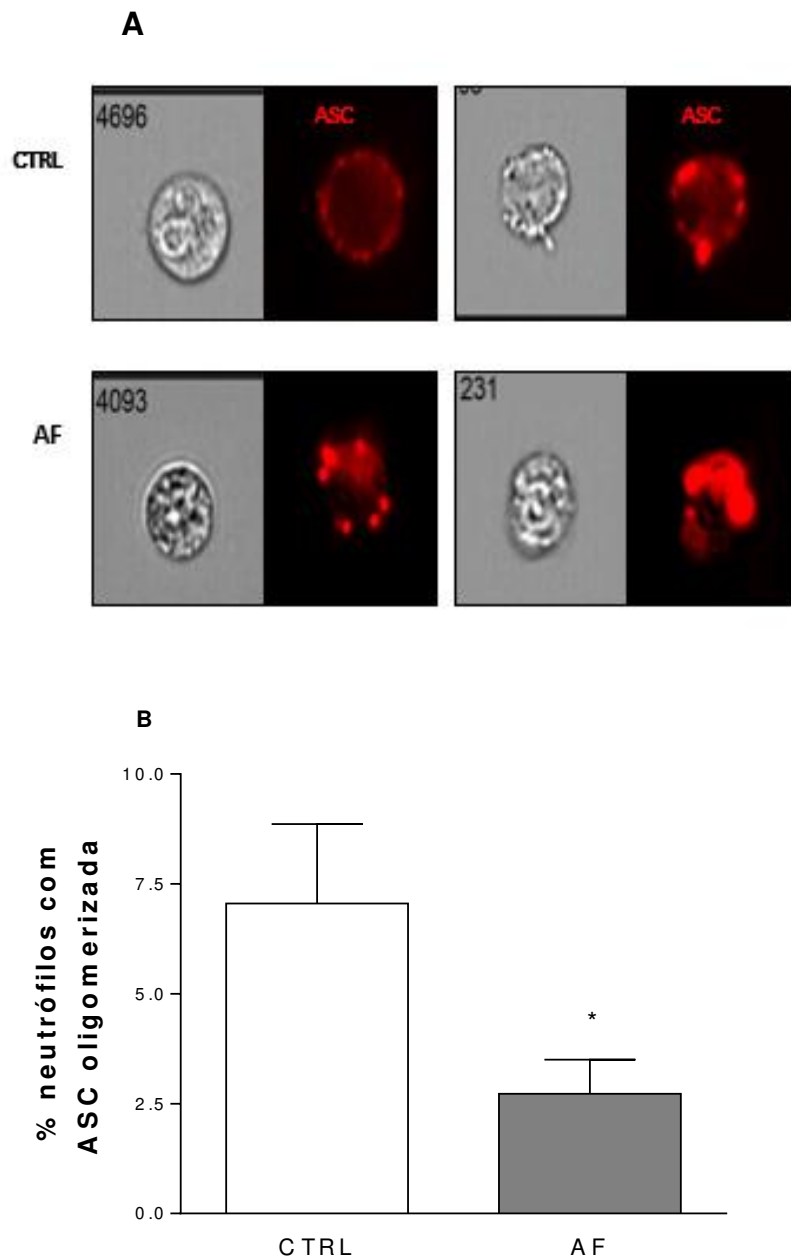


Figura 10. Observação da oligomerização da molécula ASC em neutrófilos. Avaliação da expressão e oligomerização de ASC specks, visualizadas por citometria de fluxo com imagem (Amnis ImageStream®) em neutrófilos indivíduos controles e indivíduos AF. (A) Imagens de neutrófilos de indivíduos saudáveis (CTRL) e indivíduos portadores de AF (AF) com ASC oligomerizada. (B) Porcentagens de neutrófilos de indivíduos controles (CTRL; N=7) e de indivíduos portadores de AF (N=12) que demonstraram *specks* de ASC. Para o teste estatístico usou-se o teste de Mann-Whitney, Valores, media $\pm$ SEM; * $p < 0.05$, comparado ao grupo controle.

6.1.10. Observação da expressão proteica da molécula ASC em neutrófilos através da técnica de Western blotting

Dado os resultados encontrados nos experimentos anteriores, decidimos também avaliar a expressão proteica de ASC em lisados de neutrófilos, através da técnica de *Western blotting* (WB). Para este experimento, isolamos neutrófilos provenientes de indivíduos CTRL (N=2) e indivíduos portadores de AF (N=1) (sem estimulação prévia); o pellet celular foi lisado e a proteína foi dosada através do método de Bradford. Os lisados celulares (100 µg) foram submetidos à eletroforese em gel de 15% de poliacrilamida-SDS e a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose ocorreu como descrito na (secção 5.17). Em seguida a membrana foi incubada com o anticorpo de interesse.

Com estes dados preliminares, podemos observar que os neutrófilos CTRL, bem como os neutrófilos AF, expressam aproximadamente a mesma quantidade de ASC (Figura 11A), não havendo uma diferença nessa expressão proteica nos grupos estudados, quando quantificados através da densidade relativa das bandas do controle endógeno (GAPDH) dividido pela densidade relativa das bandas do anticorpo de interesse ASC (Figura 11B).

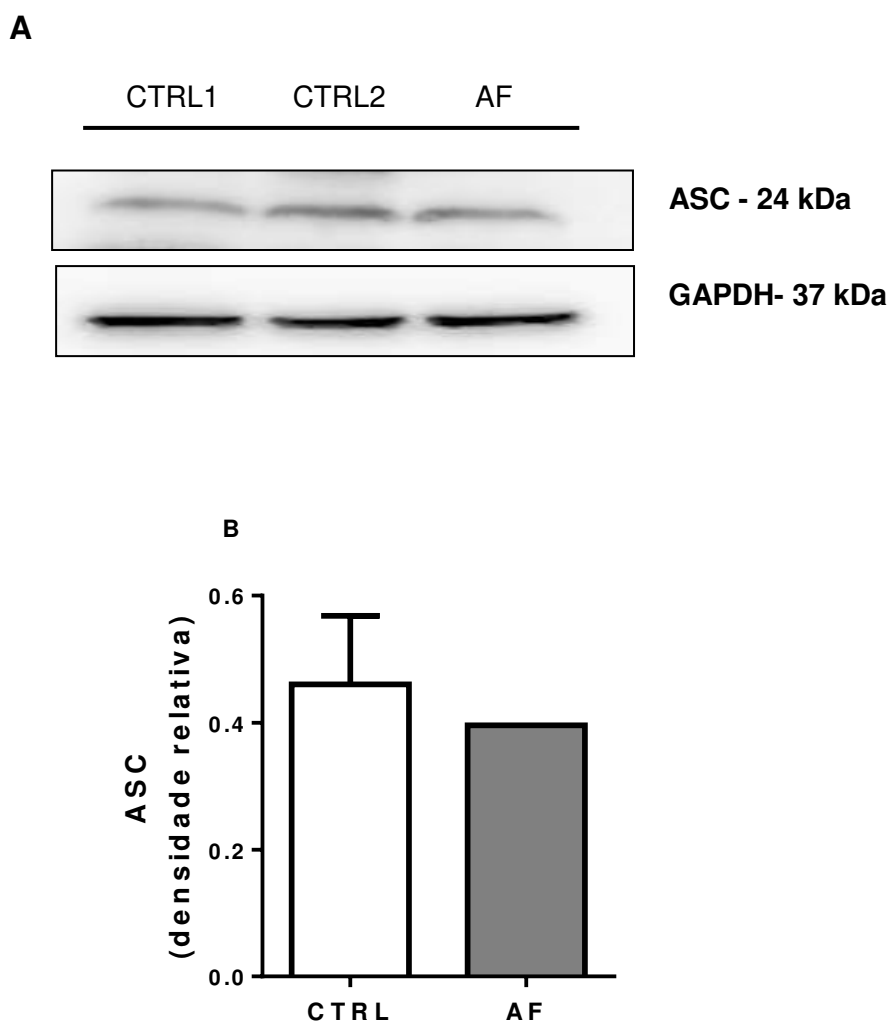


Figura 11. Observação da expressão proteica da molécula ASC em neutrófilos. Neutrófilos foram isolados de indivíduos CTRL (N=2) e de um indivíduo portador de AF (N=1) e a expressão da molécula adaptadora ASC foi detectada por Western blotting. Os lisados celulares (100 µg) foram fracionados em gel de poliacrilamida 15%, transferidos para membrana e esta foi incubada com anticorpo anti-ASC. (A) *Western Blotting* representativo da expressão de ASC em indivíduos controles (CTRL) e indivíduos AF (AF); (B) quantificação da densidade relativa das bandas (triplicatas).

6.1.11. Investigação da interação da ASC e pró-caspase-1 em neutrófilos de indivíduos controles e portadores de anemia falciforme

Para que ocorra a montagem da maquinaria do inflamassoma, os NLRs que possuem o domínio PYD, como o NLRP3 e o AIM2, dependem da oligomerização da proteína ASC, que por sua vez, efetua o recrutamento de pró-caspase-1 para o seu sítio de ligação (domínio CARD-CARD). Em contraste, NLRP1 e NLRC4 possuem um domínio CARD e podem recrutar caspase-1,

independente da participação de ASC (94). Em vista disto, avaliamos a interação entre as proteínas ASC e caspase-1, utilizando a técnica de co-imunoprecipitação (co-IP).

Realizamos a imunoprecipitação de ASC em pools de neutrófilos isolados de indivíduos controles (CTRL; N=6) e de dois grupos distintos de indivíduos portadores de AF (grupo 1; N=6) e (grupo 2; N=6). Após separação das proteínas do imunoprecipitado de ASC e dos extratos totais por eletroforese (SDS-PAGE), e sua transferência para membrana de nitrocelulose, o *blot* foi incubado com anticorpo anti-caspase-1 (Figura 12A, painéis superiores). Posteriormente a membrana foi incubada com tampão de *stripping* (para remoção da marcação anterior) e a presença de ASC na membrana foi confirmada, com o uso do anticorpo anti-ASC (Figura 12 A, painel inferior). No painel inferior, confirmamos a presença de ASC na membrana, tanto no imunoprecipitado quanto no extrato total (Figura 12B). Observamos no painel superior (colunas 1-3) que há uma imunoprecipitação significativa de pró-caspase-1 (50 KDa) junto à uma quantidade de ASC tanto nos neutrófilos controles, quanto nos neutrófilos AF (Figura 12C). Podemos observar que em neutrófilos de indivíduos AF do grupo 2, há uma diminuição na interação entre ASC e pró-caspase 1. Porém, no extrato total, podemos observar que há caspase-1 clivada (tetrâmero p20) nos neutrófilos dos três grupos (Figura 12D). Como esperado, não houve detecção de bandas do anticorpo IgG não específico no imunoprecipitado, sendo o controle negativo neste experimento (colunas 4-6). No extrato total, é possível visualizar a caspase-1 clivada, que não foi ligada a proteína ASC. Dados indicam que, em neutrófilos, há o recrutamento de pró-casase-1 pela ASC, no entanto não foi visualizada diferença aparente neste recrutamento entre os neutrófilos CTRL e AF.

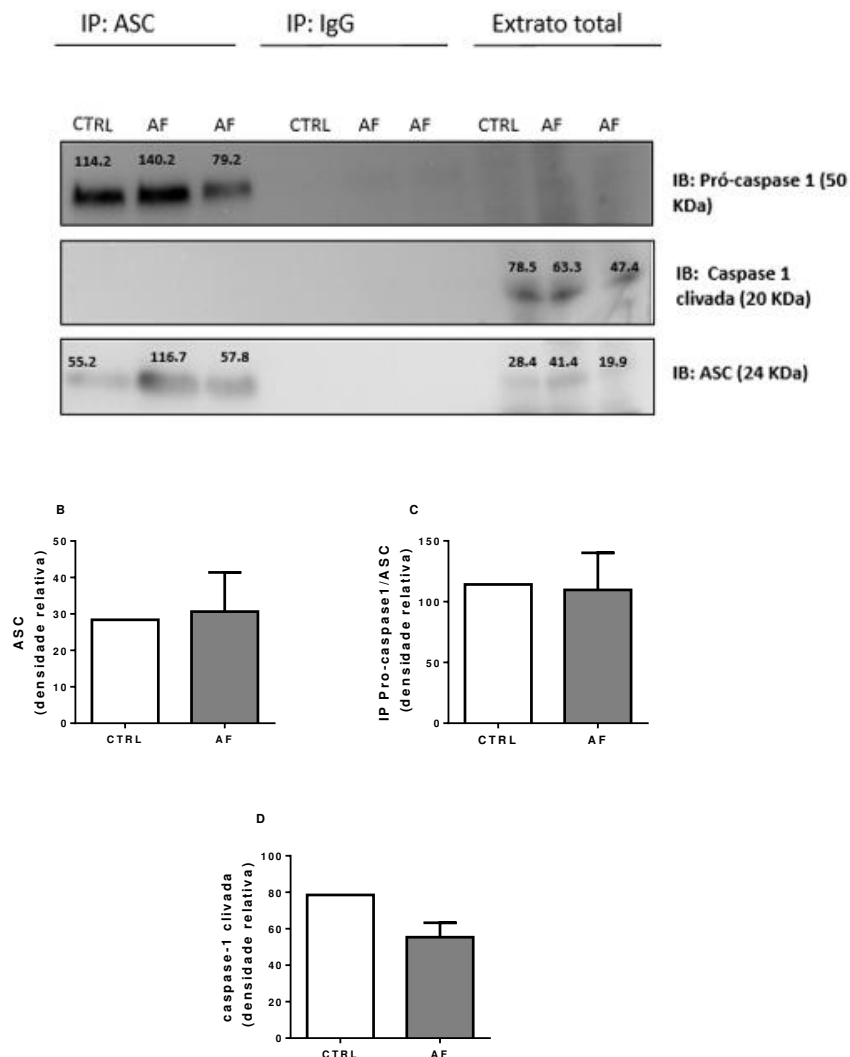


Figura 12. Investigação da interação da ASC e pró-caspase-1 em neutrófilos de indivíduos controles e portadores de AF. (A) Extratos celulares de neutrófilos foram imunoprecipitados com IgG não específico ou anti-ASC de coelho. Os imunoprecipitados (IP) e extratos totais foram fracionados em gel de poliácridamida 15%, transferidos para membrana e esta foi incubada com IgG anti-caspase-1 (painéis superiores). Uma banda de pró-caspase 1 (50-45 kDa) co-imunoprecipitou especificamente com ASC (painel superior). O painel do meio mostra a caspase-1 em sua forma clivada (subunidade p20). Posteriormente, a membrana foi incubada com o anticorpo anti-ASC para confirmação da presença de ASC nas membranas (24 kDa, painel inferior). Todas as bandas foram detectadas com anticorpo secundário conjugada a HRP e as bandas visualizadas com reagente *ECL*. Densidade relativa da expressão de ASC. (B); de pro-caspase-1/ASC (C); e de caspase-1 clivada (D). Dados são referentes aos pools de proteínas; cada pool consiste da extração proteica de neutrófilos provenientes de 6 indivíduos. IP=imunoprecipitação; IgG= imunoglobulina não específico; ET= extrato total; IB=*immunoblotting*; CTRL= indivíduos controles saudáveis; AF= indivíduos portadores de AF. Tetrâmero p20= caspase-1 clivada.

6.1.12. Avaliação da co-localização de caspase-1 ativada e ASC através da citometria de fluxo com imagem

A citometria de fluxo com imagem foi utilizada para identificar neutrófilos (marcados pela expressão CD66b⁺PE), em indivíduos controles e AF, que expressaram tanto a caspase-1 ativada (identificada pela clivagem do peptídeo FAM-YVAD-FMK-FLICA) quanto os aglomerados de *specks* de ASC. Curiosamente, descobrimos que em alguns neutrófilos de indivíduos portadores de AF e também em CTRL, *specks* de caspase-1 ativados podiam ser observados em associação com a presença de múltiplos aglomerados de ASC (Figura 13A), apresentando uma co-localização que se assemelhava a uma formação de roseta. No entanto, a proporção de neutrófilos CTRL e AF com essas formações, foi extremamente baixa (Figura 13B), sendo inferior a 5%. Como a porcentagem de neutrófilos AF que apresentavam ≥ 4 caspase-1 *specks* era de aproximadamente 34%, mas a coapresentação da caspase-1 ativada com *specks* de ASC foi muito menor, podemos sugerir que a clivagem de pró-caspase-1 para caspase-1 ativa, pode ser independente de ASC.

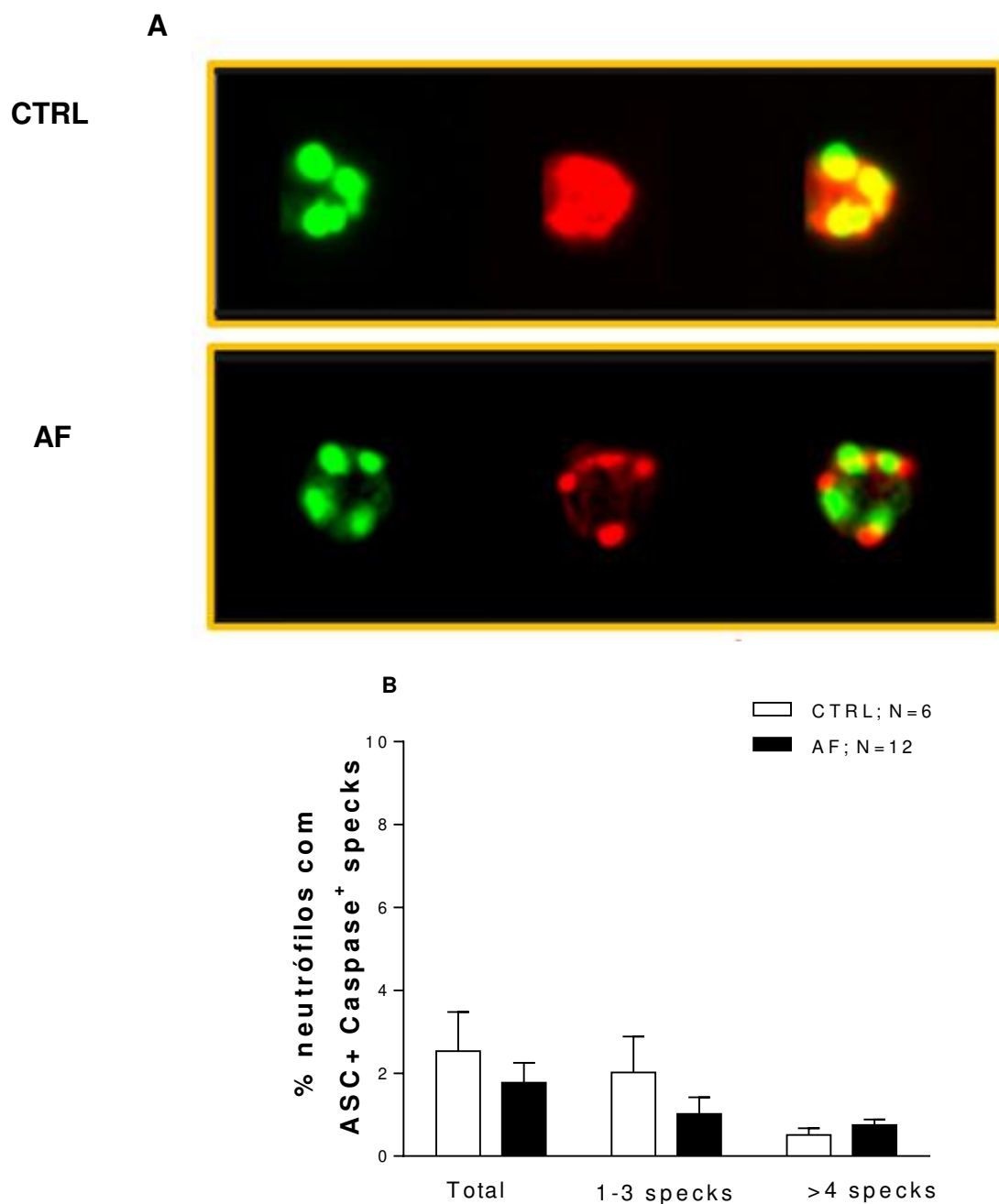


Figura 13. Avaliação da co-localização de caspase-1 ativada e ASC em neutrófilos através da citometria de fluxo com imagem; (A) imagens representativas de neutrófilos de indivíduos controle (CTRL; N=6) e de indivíduos portadores de AF (N=12), após marcação para caspase-1 ativa (Flica; FAM-YVAD-FMK, verde) e com anti- ASC alexa flúor 647(vermelho); ampliação 60x. (B) Porcentagem de neutrófilos que apresentarem co-localização de caspase-1 e ASC. Para o teste estatístico usou-se o teste de two-way ANOVA seguido de Bonferroni com Múltiplas comparações, $P > 0,05$ comparando CTRL com AF para cada parâmetro.

6.1.13. Liberação de IL-1 β em neutrófilos após tratamento com droga inibidora da molécula ASC

A molécula CAPE (éster fenetílico de ácido cafeico) apresenta atividade como inibidor da molécula adaptadora ASC (133). Utilizamos esta molécula para confirmar a participação, ou não, da ASC no processamento de IL-1 β em neutrófilos de indivíduos portadores de AF. Neutrófilos foram isolados de indivíduos portadores de AF (N=8) e tratados durante 1 hora (37°C, 5% CO₂) com a droga CAPE (1, 5 e 10 μ M) antes da coleta do sobrenadante e determinação da concentração de IL-1 β por ELISA. A CAPE não inibiu a liberação de IL-1 β de neutrófilos AF (Figura 14). Em contraste, a mesma droga, nas concentrações mínimas de 1 e 5 μ M, foi capaz de inibir a liberação da citocina IL-1 β em monócitos AF (dados apresentados na secção 6.1.25). Consistente com os outros dados apresentados, este experimento sugere que o inflamassoma formado em neutrófilos de indivíduos AF, e a liberação de IL-1 β , não é dependente de ASC.

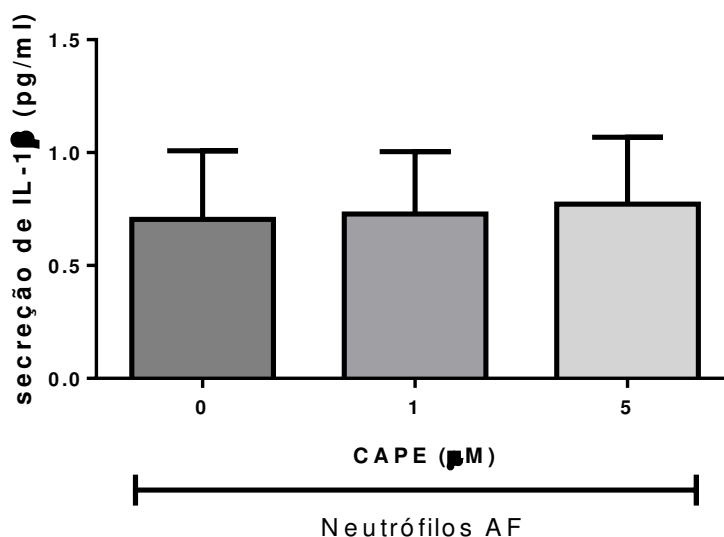


Figura 14. Liberação de IL-1 β por neutrófilos de indivíduos AF após tratamento com droga inibidora da molécula ASC. Neutrófilos isolados de indivíduos portadores de AF (AF, N=8) e co-incubados com o inibidor de ASC, CAPE (1 e 5 μ M, 1 hora). Concentrações de IL-1 β nos sobrenadantes foram determinadas através de ELISA. Os dados estão representados como média $\pm$ SEM. $P > 0,05$.

6.1.14. Avaliação da liberação de IL-1 β dependente do receptor NLRP3 em neutrófilos

Uma vez que a formação do inflamassoma NLRP3 foi previamente reportada em neutrófilos, investigamos um papel para este receptor no inflamassoma que é formado em neutrófilos de indivíduos portadores de AF. Primeiramente, estimulamos neutrófilos de indivíduos controles com LPS (100 ng/ml) durante 2 horas (37°C, 5% CO₂), após essa estimulação, tratamos as células com a droga MCC950 (5 μ M), sendo está um inibidor seletivo do receptor NLRP3, durante 1 hora de incubação, após esse período acrescentamos ATP (2.5 mM) por 30 minutos, devido a sua rápida ação e perda de atividade, para induzir a formação de um inflamassoma clássico do tipo NLRP3 e consequente liberação de IL-1 β (experimento controle positivo).

Embora a pré-incubação com MCC950, revogou com sucesso a liberação de IL-1 β de neutrófilos controles estimulados com LPS/ATP, de forma interessante, este inibidor não foi capaz de reduzir a secreção de IL-1 β proveniente de neutrófilos não estimulados, isolados de indivíduos AF (Figura 15). Os dados indicam que, enquanto a secreção de IL-1 β de neutrófilos CTRL estimulados (LPS/ATP) parece ocorrer via inflamassoma NLRP3, este receptor não parece ser responsável pelo aumento do processamento de IL-1 β observado em neutrófilos AF.

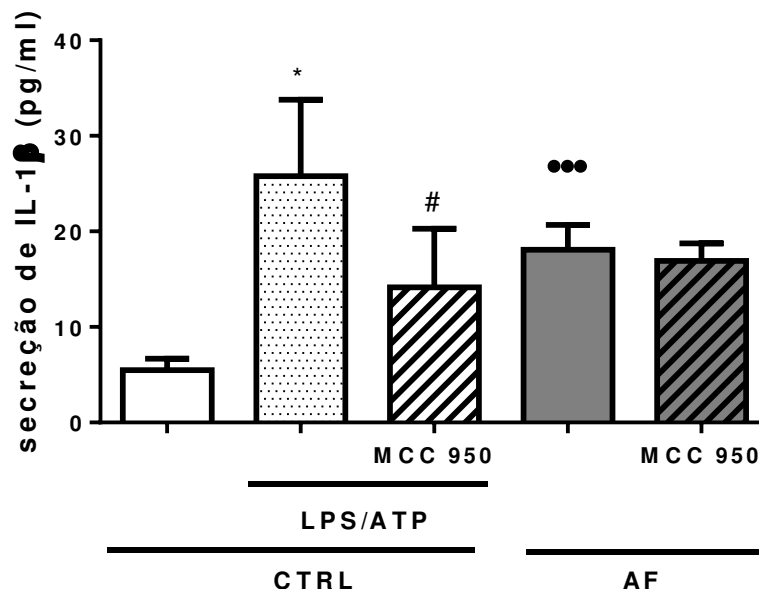


Figura 15. Avaliação da liberação de IL-1 β dependente do receptor NLRP3 em neutrófilos. Neutrófilos isolados de controles saudáveis foram ativados ou não com LPS (100 ng/ml) e ATP (2,5 Mm) (CTRL, N=6) e co-incubados, ou não, com o inibidor de NLRP3, MCC950 (5 μ M). Neutrófilos de indivíduos portadores de AF (AF, N=10), também foram incubados na presença ou ausência de MCC950 (5 μ M). Os sobrenadantes foram retirados e armazenados para detecção da presença de IL-1 β . Os dados estão representados como média $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, comparado ao CTRL basal; # $p < 0.05$, comparado aos neutrófilos ativados com LPS/ATP; ●●● $p < 0.001$ comparado ao grupo CTRL. Para o teste estatístico usou-se o Kruskal-Wallis com pós teste de Dunns.

6.1.15. Avaliação da expressão gênica dos receptores (NOD-like) e componentes do inflamassoma em neutrófilos de indivíduos saudáveis e portadores de AF

Nossos achados indicam que a formação do inflamassoma que ocorre em neutrófilos de indivíduos portadores de AF, não está relacionado com o receptor NLRP3. Com o propósito de investigar os prováveis receptores (NOD-like receptor) e as proteínas envolvidas na formação deste inflamassoma atípico, utilizamos a técnica de PCR em tempo real. Extraímos RNA dos neutrófilos isolados do sangue periférico de indivíduos controles (CTRL; N=6) e indivíduos portadores de AF (N=14). A expressão dos genes de interesse foi comparada com as expressões de *ACTB* e *RPL13* e foi observada a expressão gênica de *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRP6*, *NLRC4*, *NLRP12*, *CASP1* (caspase-1) e

PYCARD (ASC) nos neutrófilos selecionados para este estudo. Como não foi observado um aumento na expressão de nenhum dos genes que codificam os receptores mais conhecidos na formação de inflamassoma em neutrófilos de indivíduos portadores de AF, quando comparado ao grupo CTRL (Figura 16A-E), não foi possível identificar um provável receptor do inflammasoma utilizando esta abordagem.

De fato, quando avaliamos as expressões dos genes *NLRP6* e *NLRP12* (Figura 16C e E), *PYCARD* e *CASP 1* (Figura 16F-G), podemos observar que há uma diminuição significativa da sua expressão gênica ($p < 0.05$) em neutrófilos de indivíduos portadores de AF, quando comparado ao grupo CTRL. Podemos notar que a expressão do gene *NLRP4* também apresentou diminuição significativa ($p < 0.001$) em neutrófilos de indivíduos portadores de AF quando comparado ao grupo CTRL (Figura 16G). Assim sendo, os resultados ressaltam a importância de modificações pós transcricionais no processamento de IL-1 β e não foi possível identificar um gene candidato para compor o complexo inflamassoma que está sendo ativado em neutrófilos AF.

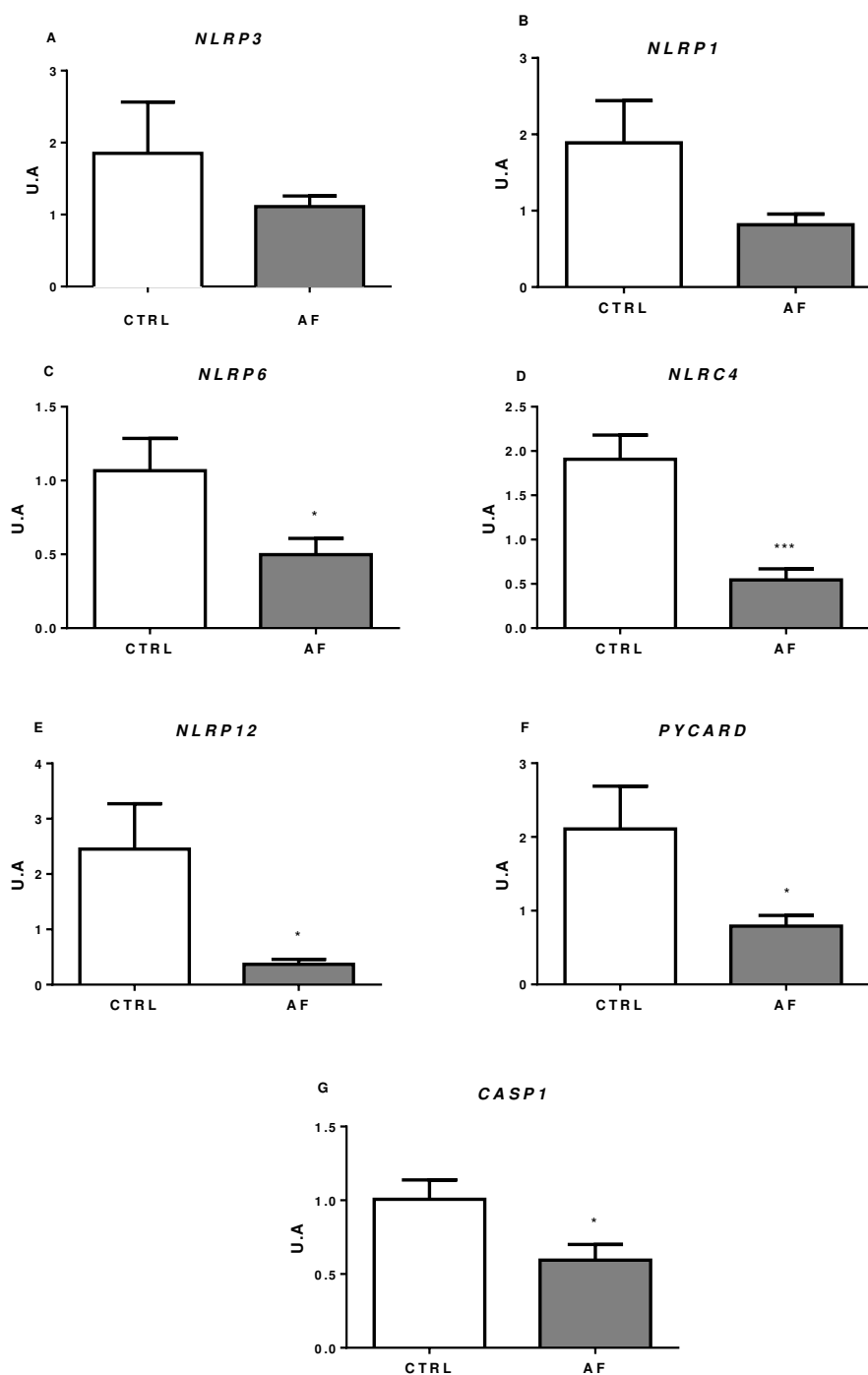


Figura 16. Avaliação da expressão gênica dos receptores (NOD-like) e componentes do inflamassoma em neutrófilos. Expressão dos genes *NLRP3*, *NLRP1*, *NLRP6*, *NLRC4*, *NLRP12*, *ASC* e *Caspase-1* (envolvidos na formação de inflamassomas) em neutrófilos de indivíduos controles (N=6) e de indivíduos portadores de AF (N= 14). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (UA) da expressão gênica quando comparados com os genes de controle endógeno, *ACTB* e *RPL13*. Para o teste estatístico usou-se o teste de Mann-Whitney, Valores, media $\pm$ SEM; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$, comparado ao grupo controle.

6.1.16. Avaliação da liberação de IL-1 β em sobrenadantes de monócitos

Os monócitos representam cerca de 5-10% dos leucócitos; também investigamos se a formação de inflamassomas ocorre em monócitos de indivíduos AF com o intuito de verificar se estas células participam na liberação dessa citocina na AF. Primeiramente, isolamos os monócitos através da técnica de Percoll (conforme descrito em materiais e métodos) de sangue periférico de indivíduos controles e portadores de AF e as incubamos (5×10^5 células/ml) durante 2 horas (37°C, 5% CO₂) em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após esse período de incubação, o sobrenadante foi coletado e avaliamos a presença de IL-1 β (Figura 17A). Surpreendentemente, os monócitos de indivíduos portadores de AF apresentaram uma diminuição na liberação de IL-1 β quando comparados ao grupo CTRL.

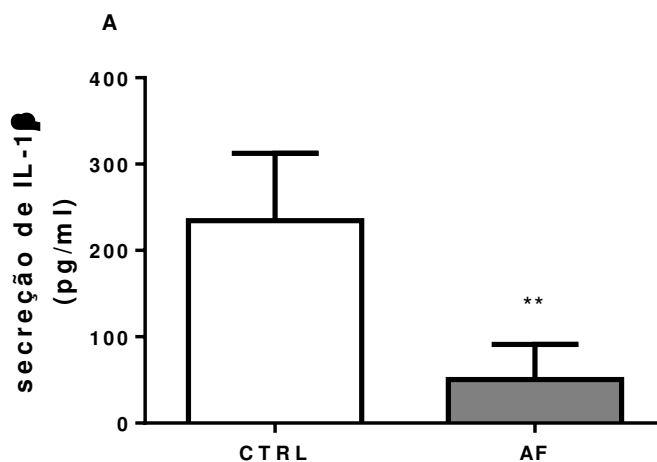


Figura 17. Avaliação da liberação de IL-1 β em sobrenadantes de monócitos. (A) Sobrenadante de monócitos de indivíduos controles (CTRL, N=6) e indivíduos portadores de AF (AF, N=8), após incubação (2h, 37°C, 5% CO₂). Os níveis de IL-1 β foram avaliados através do ensaio de ELISA. Valores, média $\pm$ SEM e para o teste estatístico usou-se o teste não-pareado de Mann-Whitney. **p< 0,01; comparado ao grupo controle.

Porém, conforme continuamos com as investigações da formação de inflamassoma nessas células, decidimos investigar se o método anteriormente utilizado para o isolamento de monócitos (Percoll) realmente era o mais apropriado ou se o

isolamento por beads magnéticas (CD14⁺) nos mostraria outro perfil de liberação de IL-1 β (considerando que com este método, temos uma pureza de aproximadamente 90%). Incubamos (5×10^5 células/ml) de indivíduos controles e AF durante 1, 3, 5 e 12 horas (37°C, 5% CO₂), em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após esse período de incubação, o sobrenadante foi coletado e avaliamos a presença de IL-1 β . Podemos observar que não houve uma diferença significativa na liberação de IL-1 β em ambos os períodos de incubação (1, 3, 5 e 12 horas) entre os grupos CTRL e AF (Figura 18A-D). Porém, podemos sugerir que após 3 horas de incubação, é possível observar uma tendência no aumento da liberação de IL-1 β no sobrenadante de monócitos AF quando comparado ao grupo CTRL (Figura 18B). Neste caso, podemos concluir que os monócitos de indivíduos AF e CTRL liberam concentrações de IL-1 β aproximadamente equivalentes.

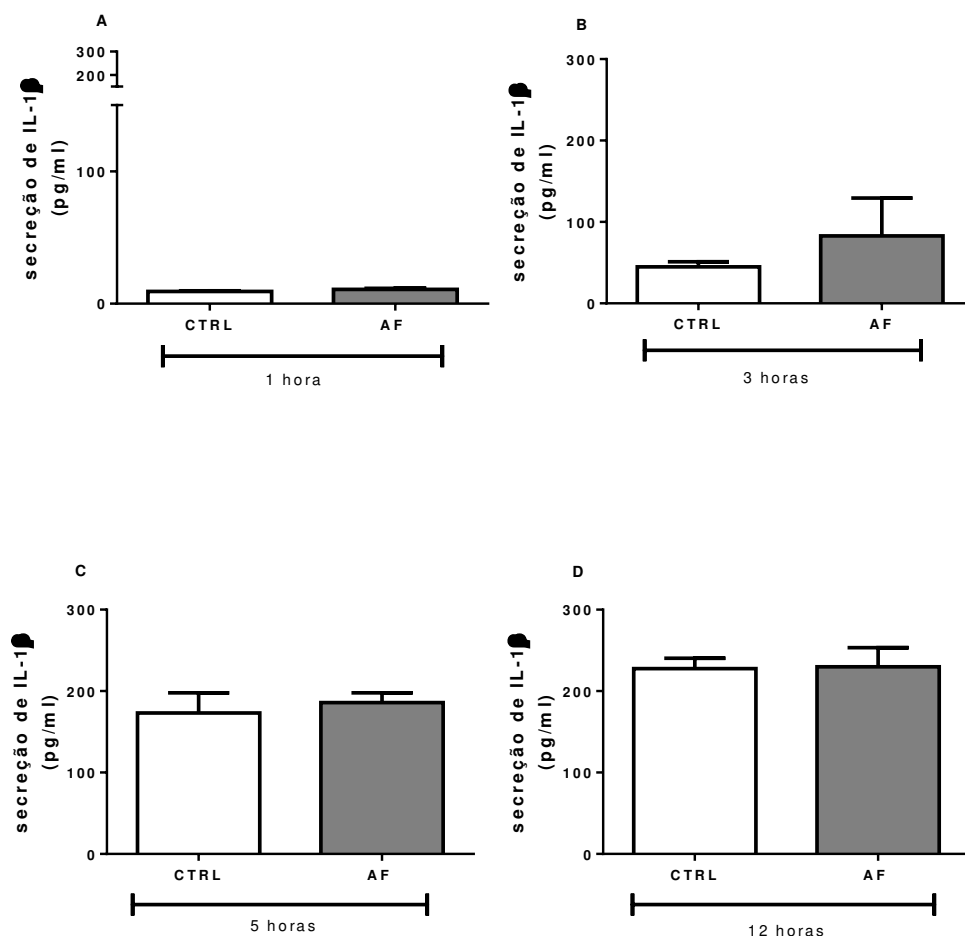


Figura 18. Avaliação da liberação de IL-1 β de monócitos. Liberação de IL-1 β em sobrenadante de monócitos de indivíduos controles (CTRL, N= 3-5) e indivíduos portadores de AF (AF, N= 4-6), após incubação (37°C, 5% CO₂) por 1 hr (A); 3 hrs (B), 5 hrs (C) e 12 hrs (D); os níveis de IL-1 β foram avaliados através do ensaio de ELISA. Valores, media $\pm$ SEM e para o teste estatístico usou-se o teste não-pareado de Mann-Whitney; $p > 0.05$ para todas as comparações.

6.1.17. Avaliação da liberação de IL-18 em sobrenadantes de monócitos

Visto que o processamento de IL-18 também é considerado um *hallmark* da formação de inflamassomas, avaliamos a liberação de IL-18 em sobrenadantes de monócitos. Para isto, isolamos os monócitos através do uso de *beads* magnéticas (CD14⁺) e incubamos (5×10^5 células/ml) de indivíduos controles e AF durante 1, 3 e 5

horas (37°C, 5% CO₂), em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após esse período de incubação, o sobrenadante foi coletado e avaliamos a presença de IL-18. No entanto, não foi possível observar nenhuma diferença significativa na liberação de IL-18 entre monócitos de indivíduos controles e AF nos períodos estudados (Figura 19A-C).

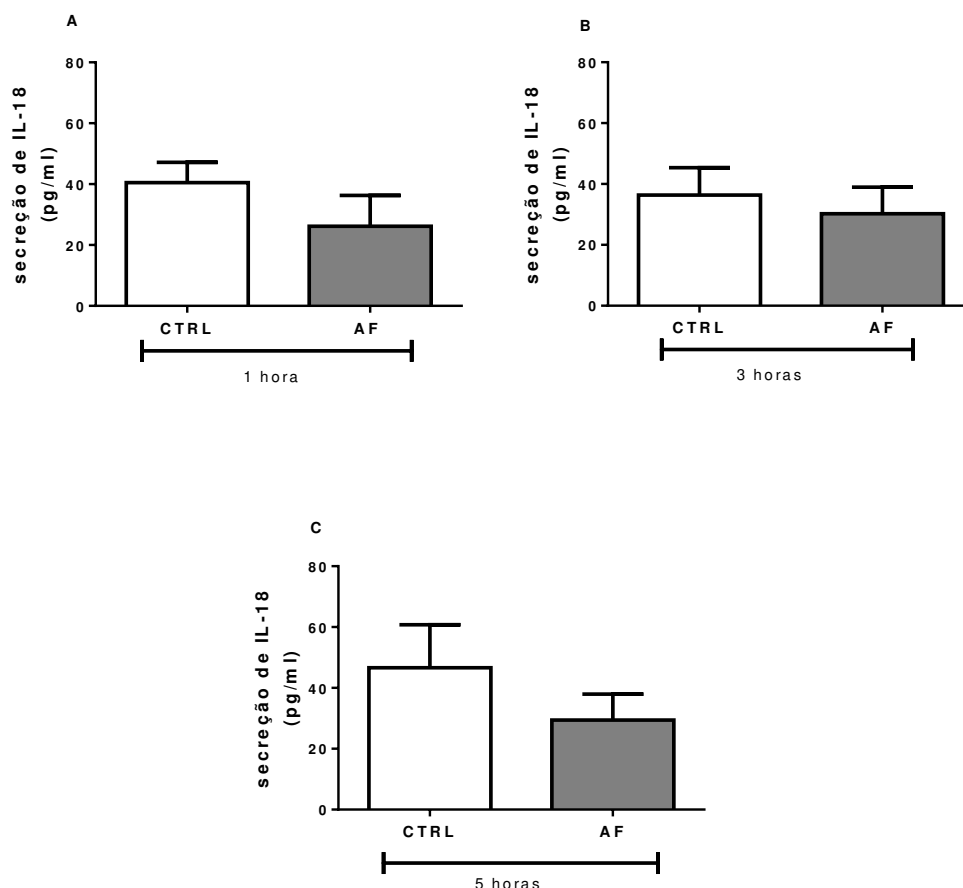


Figura 19. Avaliação da liberação de IL-18 em sobrenadantes de monócitos. (A) Sobrenadante de monócitos de indivíduos controles (CTRL, N=4) e indivíduos portadores de AF (AF, N=6), após incubação (1h, 37°C, 5% CO₂); (B) Sobrenadante de monócitos de indivíduos controles (CTRL, N=5) e indivíduos portadores de AF (AF, N=6), após incubação (3h, 37°C, 5% CO₂); (C) Sobrenadante de monócitos de indivíduos controles (CTRL, N=6) e indivíduos portadores de AF (AF, N=7), após incubação (5h, 37°C, 5% CO₂). Os níveis de IL-18 foram avaliados através do ensaio de ELISA. Valores, média $\pm$ SEM e para o teste estatístico usou-se o teste não-pareado de Mann-Whitney. $P > 0.05$ para todas as comparações.

6.1.18. Determinação da ativação da caspase-1 em monócitos de indivíduos portadores de anemia falciforme

Usamos o kit FAM FLICA, em associação com a citometria de fluxo convencional, para identificar populações de monócitos que apresentavam ativação de caspase-1. Os monócitos clássicos CD14⁺CD16⁻ representam aproximadamente 85-90% do total de monócitos e tem altos níveis de expressão de CD14. Os monócitos CD16⁺ podem ser subdivididos em populações com alta expressão de CD14 e baixa expressão de CD16, denominados de monócitos intermediários (CD14⁺⁺ CD16⁺) e monócitos com baixa expressão de CD14 e alta expressão de CD16, denominados de monócitos não-clássicos (CD14⁺ CD16⁺⁺). Estudos funcionais mostraram que os monócitos CD16⁺ são a principal fonte de TNF e IL-1 quando estimulados através da via de TLR2 e TLR4. Portanto, os monócitos CD16⁺ são potentes indutores de inflamação e são considerados monócitos inflamatórios (134).

O sangue periférico foi obtido de indivíduos controles (CTRL) e de indivíduos portadores de anemia falciforme (AF). Após a lise das hemácias, os leucócitos foram marcados com anticorpos para a identificação dos monócitos clássicos (CD14⁺CD16⁻; Figura 20A) e monócitos não-clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺; Figura 20B). Nota-se que não foi possível observar ativação de caspase-1 nos monócitos clássicos dos indivíduos AF, enquanto que os monócitos não-clássicos AF demonstraram aumento significativo da atividade de caspase-1, quando comparados aos monócitos não-clássicos do grupo CTRL. Para a avaliação da contagem de monócitos não-clássicos positivos para caspase-1 ativada na circulação sanguínea, analisamos os hemogramas das amostras utilizadas neste grupo experimental e contabilizamos o número de monócitos não-clássicos/FLICA⁺ circulantes, através do número total de monócitos. Podemos observar que os indivíduos portadores de AF possuem um número significativamente aumentado ($p < 0.001$) de monócitos não-clássicos com ativação de caspase-1 quando comparado aos monócitos CTRL (Figura 20C).

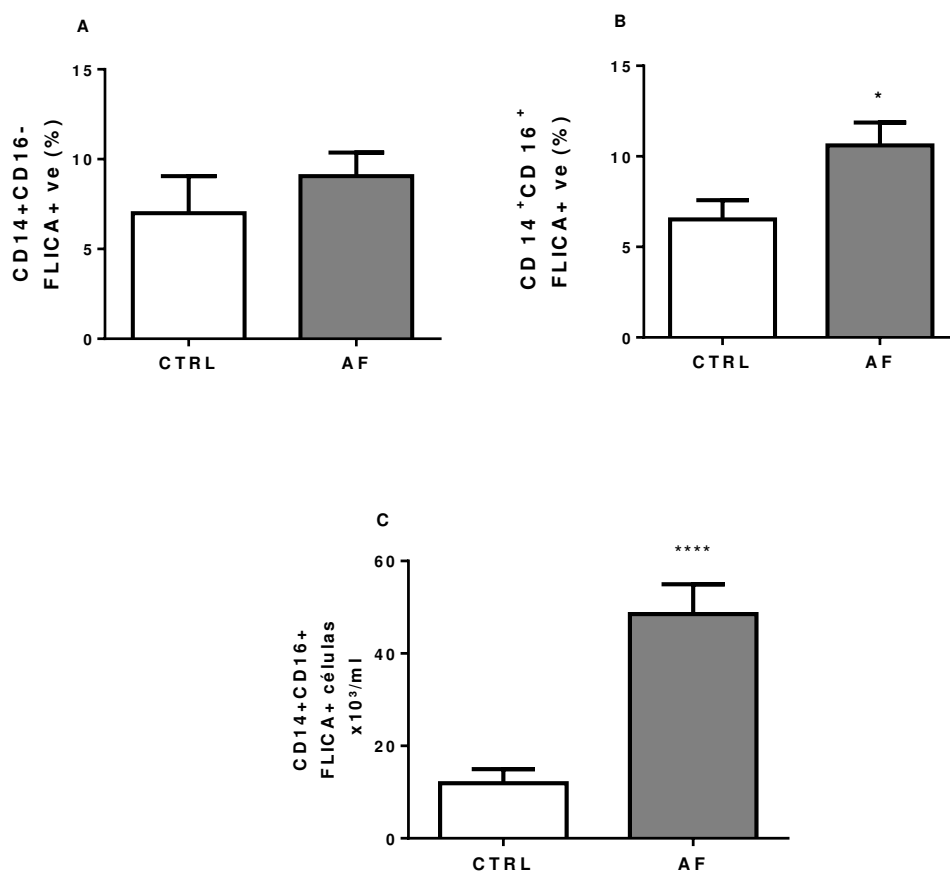


Figura 20. Determinação da ativação da caspase-1 em monócitos de indivíduos portadores de anemia falciforme. Ativação de caspase-1 (FLICA+) em (A) monócitos clássicos (CD14⁺CD16⁻); (B) monócitos não clássicos (CD14⁺CD16⁺); (C) número total de monócitos não clássicos positivos para caspase-1 ativada na circulação sanguínea de indivíduos controles (CTRL, n= 13) e indivíduos portadores de AF (AF, n= 22). O número de monócitos positivos para caspase-1, foi calculado a partir do número total de monócitos obtidos através do hemograma. A ativação de caspase-1 foi avaliada através do kit FAM FLICA Caspase 1. Valores, média $\pm$ SEM e para o teste estatístico usou-se o teste não-pareado de Mann-Whitney; * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$, comparado ao grupo controle.

6.1.19. Caracterização da ativação de caspase-1 em monócitos através da técnica de citometria de fluxo com imagem

Utilizamos a tecnologia da citometria com imagem Amnis ImageStream (Milipore®) para caracterização da ativação de caspase-1 em monócitos. Os monócitos e suas subpopulações foram identificados com os anticorpos: anti- CD14 PercP e anti- CD16 APC, e a atividade de caspase-1 nas células foi avaliada através da sonda intracelular FAM-YVAD-FMK-FLICA. Neste experimento analisamos as subpopulações de monócitos clássicos (CD14⁺ CD16⁻) e os monócitos não-clássicos foram subdivididos em: CD14^{hi} CD16⁺ (monócitos inflamatórios ou intermediários) e CD14^{lo} CD16^{hi} (monócitos patrulheiros).

Os monócitos apresentaram a organização de caspase-1 em múltiplas aglomerações ou “*specks*” (Figura 21A). No entanto, não observamos diferença significativa na porcentagem de caspase-1 *specks* (1-3 *specks*) nos monócitos clássicos e inflamatórios quando avaliamos o grupo CTRL e o grupo AF (Figura 21B-C). Podemos observar uma tendência no aumento da porcentagem de caspase-1 *specks* (1-3 *specks*) nos monócitos não-clássicos do tipo patrulheiros dos indivíduos portadores de AF quando comparado ao grupo CTRL (Figura 21D).

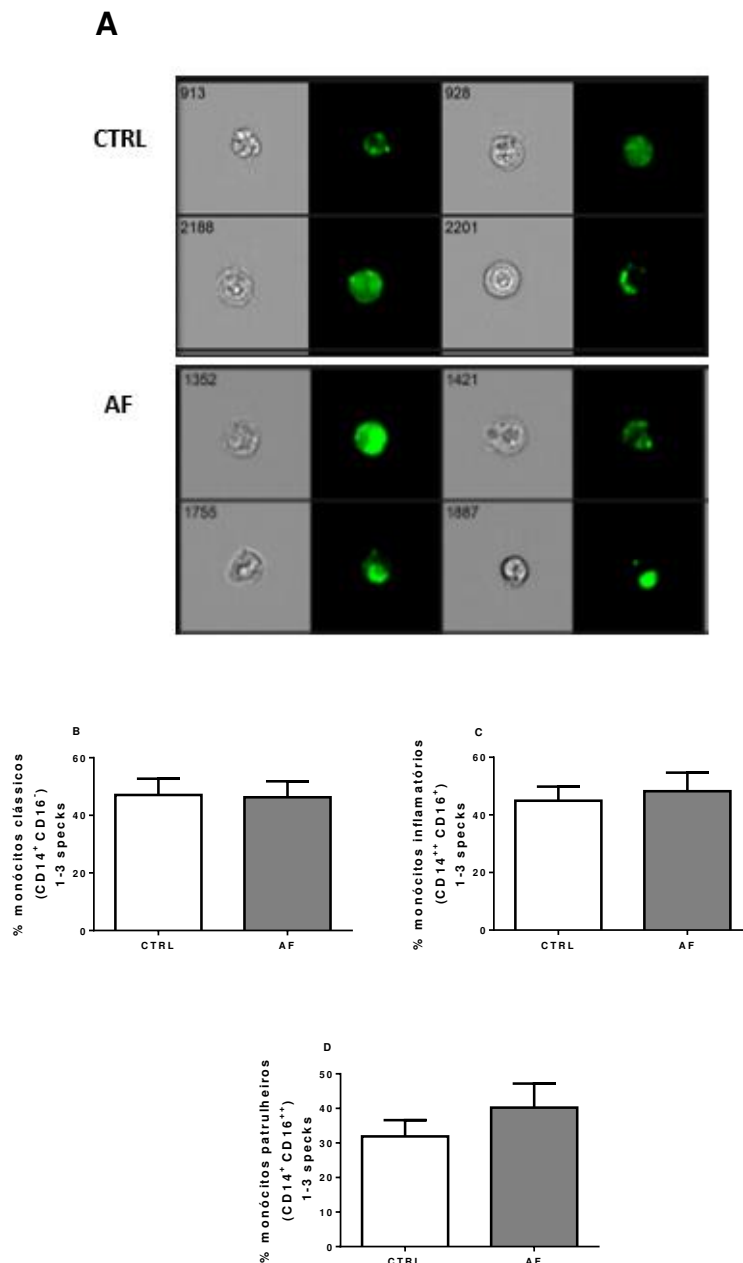


Figura 21. Caracterização da ativação de caspase-1 em monócitos. Avaliação da atividade de caspase-1 em neutrófilos de indivíduos controles saudáveis (CTRL) e indivíduos portadores de AF (AF). (A) Imagens representativas de monócitos não-clássicos CTRL e de monócitos AF com ≥ 1 *speck* de caspase-1 (representado como aglomerados puntiformes de caspase-1 ativa, em verde). As imagens foram obtidas por citometria com imagem (Amnis ImageStream Mark II) com aumento de 40X. (B) Porcentagem de monócitos clássicos (CD14⁺CD16⁻) provenientes de indivíduos controles saudáveis (CTRL; N=7) e indivíduos portadores de AF (N=11); (C) Porcentagem de monócitos inflamatórios (CD14^{hi}CD16⁺) provenientes de indivíduos controles saudáveis (CTRL; N=8) e indivíduos portadores de AF (N=11); (D) Porcentagem de monócitos patrulheiros (CD14^{lo}CD16^{hi}) provenientes de indivíduos controles saudáveis (CTRL; N=7) e indivíduos portadores de AF (N=11) com múltiplas caspase-1 *specks*. Para análise estatística, usou-se o teste não-pareado de Mann-Whitney, $p > 0.05$.

6.1.20. Observação da oligomerização da molécula ASC em monócitos através da técnica de microscopia confocal e imunofluorescência

Como descrito na literatura, sabe-se que os inflamassomas formam os complexos multiméricos de ASC em macrófagos e células dendríticas, que por sua vez, recrutam caspase-1 (132). Observamos a oligomerização de ASC em monócitos totais isolados de indivíduos CTRL e de indivíduos AF, estimulados ou não com ATP (2,5 mM), para isso, utilizamos a técnica de microscopia confocal e imunofluorescência (Figura 22). Os monócitos controles não estimulados, apresentaram baixa oligomerização de ASC (Figura 22A), em contraste após 30 min de estímulo com ATP (sinal 2), a oligomerização de ASC estava visivelmente expressa nestes monócitos (Figura 22B). Ao analisar os monócitos encontramos pequenos focos de oligomerização de ASC, indicativa da formação dos ASC *specks*, porém observamos que, em monócitos AF, esses ASC *specks* aparentam ser mais acentuados e aglomerados quando comparado ao grupo controle (Figura 22C-D).

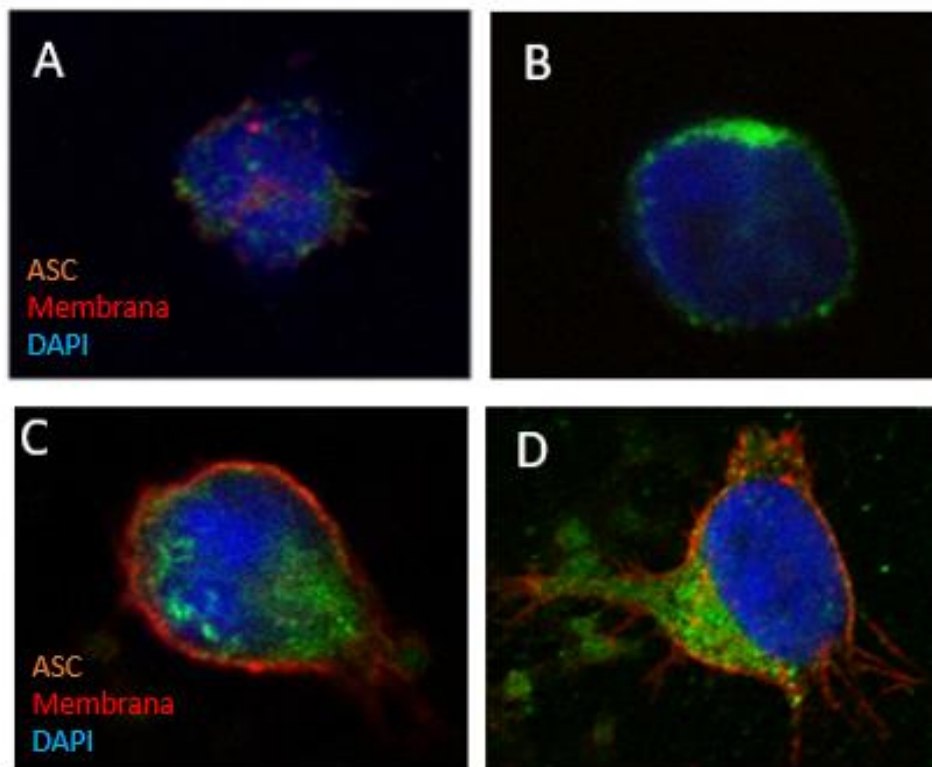


Figura 22. Observação da oligomerização da molécula ASC em monócitos; representativas de (A) indivíduos controles sem estímulo (CTRL), (B) indivíduos controles, estimulados com ATP (2,5 mM) por 30 min (CTRL positivo); de indivíduo portador de AF sem estímulo (C) e com estímulo com ATP (D). As imagens foram feitas no microscópio confocal invertido LSM 780 NLO, utilizando os lasers Argon (488) e NLO Mai Tai (DAPI), com aumento de 60 x (INFABIC-UNICAMP). Anticorpos: anticorpo primário anti-ASC, anticorpo secundário conjugado ao alexa fluor 488 (verde), Wheat germ Agglutinin, alexa fluor 555 (vermelho) e Prolong® Gold DAPI (azul). Estas imagens são representativas de um N experimental de 6 indivíduos controles e 6 indivíduos portadores de AF.

6.1.21. Observação da oligomerização da molécula ASC em subpopulações de monócitos através da técnica de citometria de fluxo com imagem

Há relatos que em monócitos/macrófagos os agregados de ASC parecem aumentar de tamanho conforme o estímulo inflamatório e o tempo de exposição a este estímulo (135). Quantificamos a formação de ASC *specks* em monócitos de indivíduos controles e indivíduos AF por citometria de fluxo com imagem (Amnis ImageStream®). Classificamos esses *specks* (como conjuntos de punctas fluorescentes de ASC) e contabilizamos através da ferramenta “Spot Wizard”, do software IDEAS). Podemos

observar que os monócitos de indivíduos portadores de AF (AF, N=9) apresentaram um aumento significativo ($p > 0.05$) de ASC specks (≥ 6 specks/célula) na subpopulação de monócitos inflamatórios ($CD14^{hi} CD16^{+}$), quando comparado à mesma subpopulação de monócitos nos indivíduos controles (CTRL, N=7) (Figura 23A-B). Porém, quando analisamos os monócitos clássicos ($CD14^{+}CD16^{-}$) não encontramos diferenças significativas na oligomerização de ASC specks entre o grupo AF e o grupo CTRL (Figura 23C).

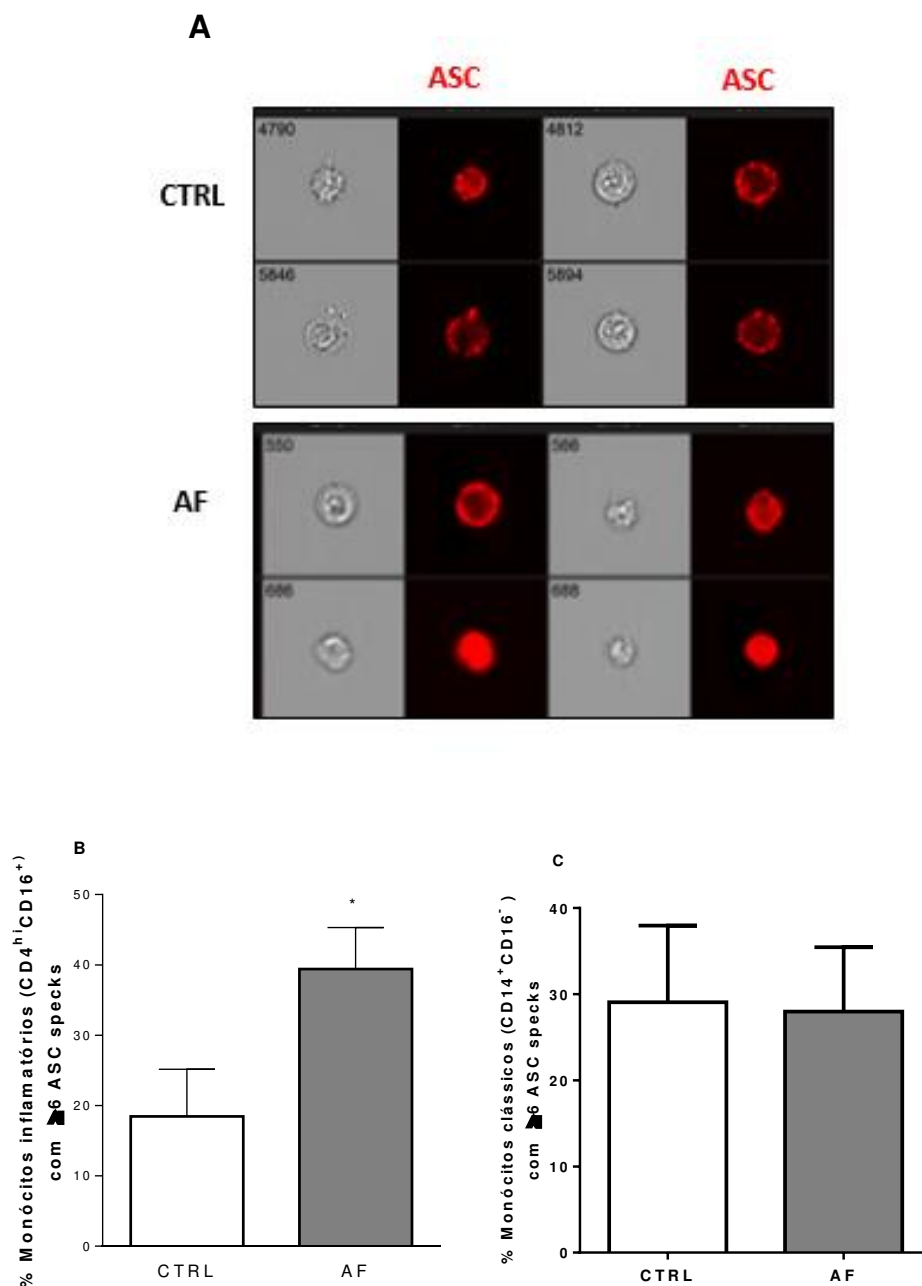


Figura 23. Observação da oligomerização da molécula ASC em subpopulações de monócitos através da técnica de citometria por imagem. Observação da oligomerização de ASC specks, visualizada por citometria de fluxo por imagem (Amnis ImageStream®); (A) Imagens representativas da oligomerização de ASC em monócitos inflamatórios; (B) Porcentagens de monócitos inflamatórios de indivíduos controles (CTRL; N=7) e de indivíduos portadores de AF (N=9) que demonstraram aglomerados de ASC (≥6 specks) (C) Porcentagens de monócitos clássicos de indivíduos controles (CTRL; N=7) e de indivíduos portadores de AF (N=9) que demonstraram aglomerados de ASC (≥6 specks). Para o teste estatístico usou-se o teste de Mann-Whitney, Valores, media ± SEM; * p< 0,05, comparado ao grupo controle.

6.1.22. Avaliação da porcentagem de monócitos apresentando co-localização de ASC *specks* e ativação de caspase-1

A citometria de fluxo com imagem foi utilizada para identificar monócitos (marcados pela expressão de CD14 PercP e CD16 APC), em indivíduos controles e AF, que apresentaram tanto a caspase-1 ativada (identificada pela clivagem do peptídeo FAM-YVAD-FMK-FLICA) quanto os aglomerados de *specks* de ASC (Figura 24A). Neste experimento analisamos as subpopulações de monócitos clássicos (CD14⁺ CD16⁻) e os monócitos não-clássicos, foram subdivididos em: CD14^{hi} CD16⁺ (monócitos inflamatórios ou intermediários) e CD14^{lo} CD16^{hi} (monócitos patrulheiros). Podemos observar que as populações de monócitos inflamatórios e patrulheiros de indivíduos AF, possuem uma tendência no aumento da co-localização de caspase-1 ativada em associação com a presença de múltiplos aglomerados de ASC (Figura 24B-C). No entanto, não foi possível observar esse mesmo fenômeno nos monócitos clássicos de ambos os grupos estudados (Figura 24D).

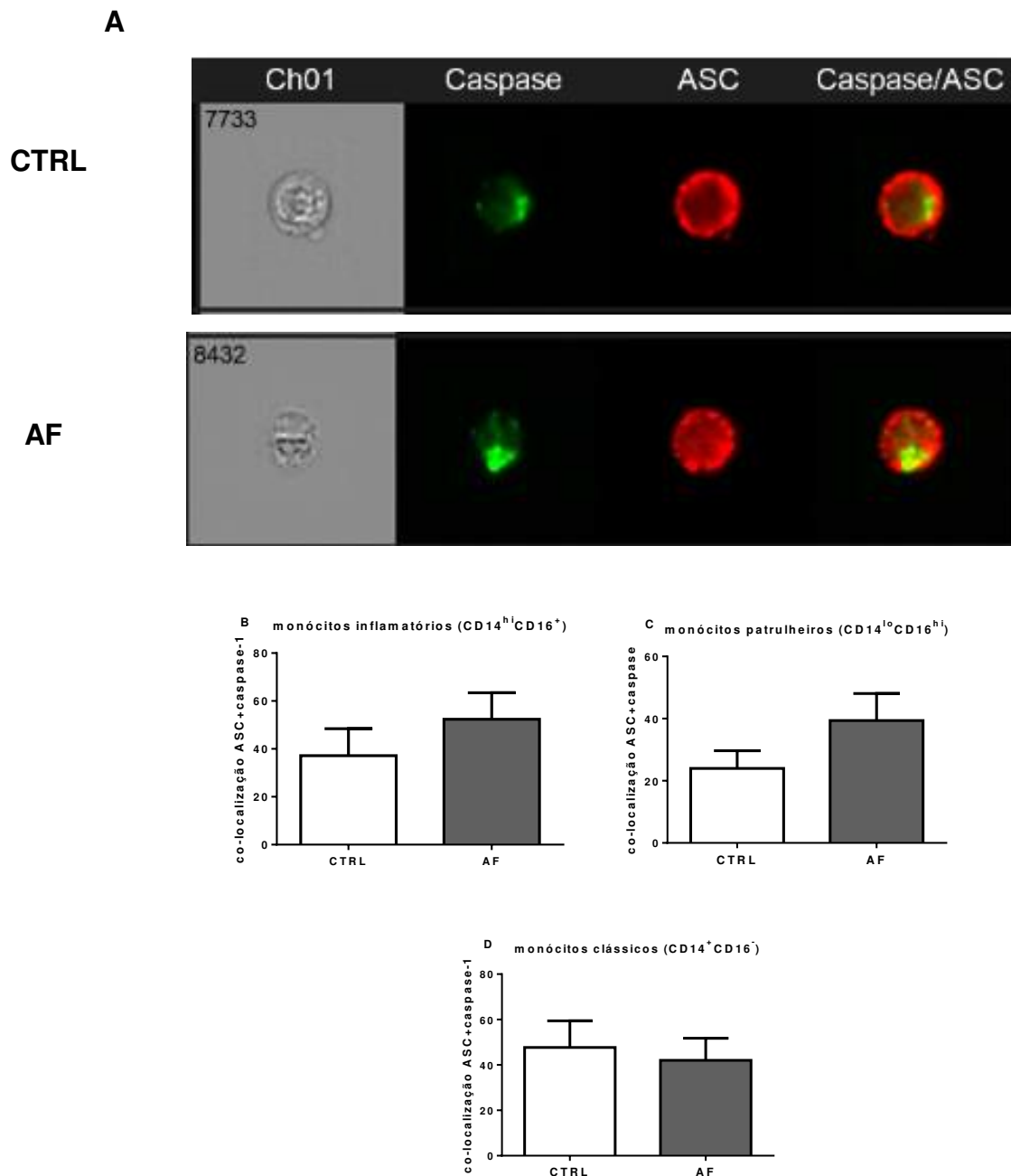


Figura 24. Avaliação da co-localização de caspase-1 ativada e ASC em monócitos por citometria de fluxo com imagem; (A) imagens representativas de monócitos de indivíduos controle (CTRL; N=7) e de indivíduos AF (N=10), apresentando co-localização de caspase-1 ativa (Flica; FAM-YVAD-FMK, verde) e vermelho - ASC (ampliação 60x); (B) Porcentagem de monócitos inflamatórios ($CD14^{hi}CD16^{+}$) co-localizados com caspase-1 e ASC; (C) Porcentagem de monócitos patrulheiros ($CD14^{lo}CD16^{hi}$) co-expressos com caspase-1 e ASC; (D) Porcentagem de monócitos clássicos ($CD14^{+}CD16^{-}$) co-localizados com caspase-1 e ASC. Para o teste estatístico usou-se o teste de Mann-Whitney, $P>0.05$.

6.1.23. A proteína ASC interage com caspase-1 em células mononucleares de indivíduos portadores de anemia falciforme

Dada a dificuldade em conseguir um volume ideal de amostra biológica, proveniente de indivíduos portadores de AF para o isolamento de monócitos para ser imunoprecipitado (400 µg de proteína), optamos por utilizar células mononucleares (PBMC) neste experimento. Realizamos a imunoprecipitação de ASC em pools de PBMC isolados de indivíduos controles (N=6) e de dois grupos distintos de pacientes AF; grupo 1 (N=6) e grupo 2 (N=6). Após separação das proteínas do imunoprecipitado de ASC e dos extratos totais por eletroforese (15% SDS-PAGE), e sua transferência para membrana de nitrocelulose, o blot foi incubado com anticorpo anti-caspase-1 (Figura 25, painéis superiores). Posteriormente a membrana foi incubada com tampão de “stripping” e a presença de ASC na membrana foi confirmada com o uso do anticorpo anti-ASC (Figura 25, painel inferior). No painel inferior, foi confirmada a presença de ASC na membrana, tanto no imunoprecipitado quanto no extrato total. Observamos no painel superior (colunas 1-3) que há uma imunoprecipitação significativa de pró-caspase-1 (50 KDa) junto à ASC nos grupos AF quando, comparado ao grupo controle.

Podemos observar que, em PBMC de indivíduos AF, há um aumento da interação entre ASC e pró-caspase 1. Porém, no extrato total, podemos observar que há caspase-1 clivada (tetrâmero p20) nas PBMC dos indivíduos portadores de AF. Como esperado, não houve detecção de bandas do anticorpo IgG não específico no imunoprecipitado, sendo nosso controle negativo, neste experimento (colunas 4-6). No extrato total é possível visualizar a caspase-1 clivada. Dados indicam que, em PBMC, há o recrutamento de pró-caspase-1 pela ASC, o que pode ser confirmado através deste ensaio, evidenciando que, em células mononucleares de indivíduos portadores de AF, há a interação necessária para que ocorra a maquinaria de ativação do complexo inflamassoma e a clivagem de caspase-1.

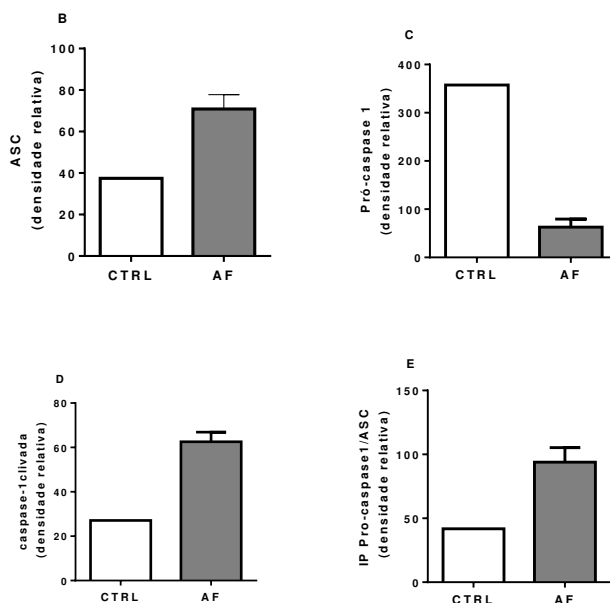
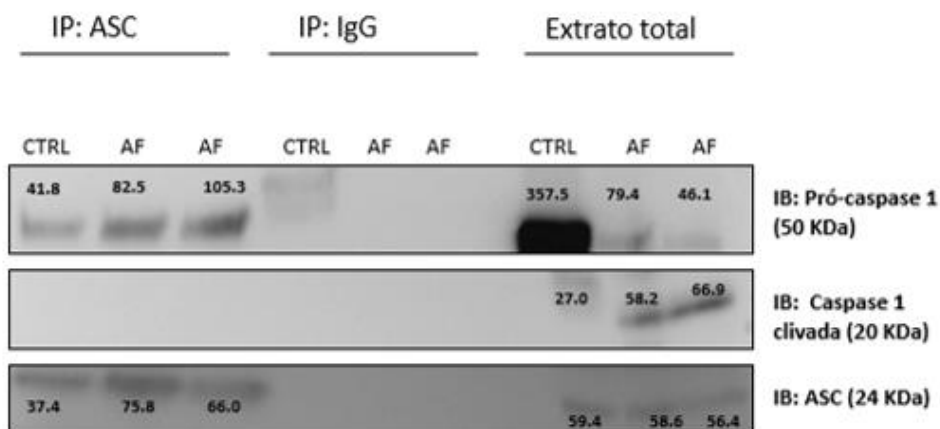
A

Figura 25. Co-imunoprecipitação da proteína ASC com caspase-1 em PBMC. (A) Extratos celulares de PBMC foram imunoprecipitados com IgG controle não específico de coelho ou IgG anti-ASC. Os imunoprecipitados (IP) e extratos totais foram fracionados em gel de poliacrilamida 15%, transferidos para membrana e esta foi incubada com anticorpo anti-caspase-1 (painéis superiores). Uma banda de pró-caspase 1 de peso molecular aproximado de 50-45 kDa co-imunoprecipitou especificamente com ASC (painel superior). No painel do meio, é possível observar a caspase-1 em sua forma clivada (subunidade p20). Posteriormente, a membrana foi incubada com o anticorpo anti-ASC para confirmação da presença de ASC nas membranas (24 kDa, painel inferior). Estes dados são referentes aos pools de proteínas; cada pool consiste da extração proteica de PBMC provenientes de 6 indivíduos. IP=imunoprecipitação; IgG= imunoglobulina controle de coelho; ET= extrato total (controle positivo); IB=imunoblotting; CTRL= indivíduos controles saudáveis; AF= indivíduos portadores de AF. Tetrâmero p20= caspase-1 clivada.

6.1.24. Liberação de IL-1 β em monócitos AF após tratamento com inibidores do inflamassoma

Uma vez que a formação do inflamassoma NLRP3 foi previamente reportada em monócitos, investigamos um papel potencial para este receptor no inflamassoma que é formado em monócitos de indivíduos portadores de AF. Monócitos isolados (através da técnica de Percoll) de indivíduos controles foram estimulados com LPS (100 ng/ml) durante 2 horas (37°C, 5% CO₂); após essa estimulação, tratamos as células com as drogas; MCC950 (5 μ M), sendo está um inibidor seletivo do receptor NLRP3, YVAD-FMK (40 μ M), sendo está um inibidor de caspase-1 e BAY117082 (10 μ M), inibidor específico da fosforilação de I κ B α (via do NF κ B), durante 1 hora de incubação, após esse período, acrescentamos ATP (2.5 mM) por 30 minutos, devido a sua rápida ação e perda de atividade, para induzir a formação de um inflamassoma clássico do tipo NLRP3 e consequente liberação de IL-1 β (experimento controle positivo) (Figura 26 A). Podemos notar que há uma redução significativa ($p < 0.05$) na liberação de IL-1 β quando tratamos os monócitos estimulados (LPS+ATP) com o inibidor específico da fosforilação de I κ B α (via do NF κ B), quando tratamos os monócitos estimulados com as outras drogas, podemos observar uma tendência na revogação da liberação de IL-1 β .

Posteriormente tratamos os monócitos isolados de indivíduos portadores de AF durante 1 hora (37°C, 5% CO₂), com a droga MCC950 (5 μ M), YVAD-FMK (40 μ M) e BAY117082 (10 μ M). A pré-incubação com MCC950, revogou com sucesso a liberação de IL-1 β de monócitos AF, podemos notar que as outras drogas inibidoras de caspase-1 e inibidora de I κ B α , também reduziram os níveis de IL-1 β liberados (Figura 26 B). Estes dados confirmam que o inflamassoma formado em monócitos de indivíduos AF é do tipo NLRP3 e que envolve a ativação de caspase-1 (visto que o inibidor seletivo YVAD reduziu a produção de IL-1 β). Consistente com os nossos achados, outros estudos relatam que o inibidor da fosforilação de I κ B α (via do NF κ B), também inibiu os efeitos da ativação do inflamassoma NLRP3 em macrófagos e que essa inibição pode ser via MyD88.

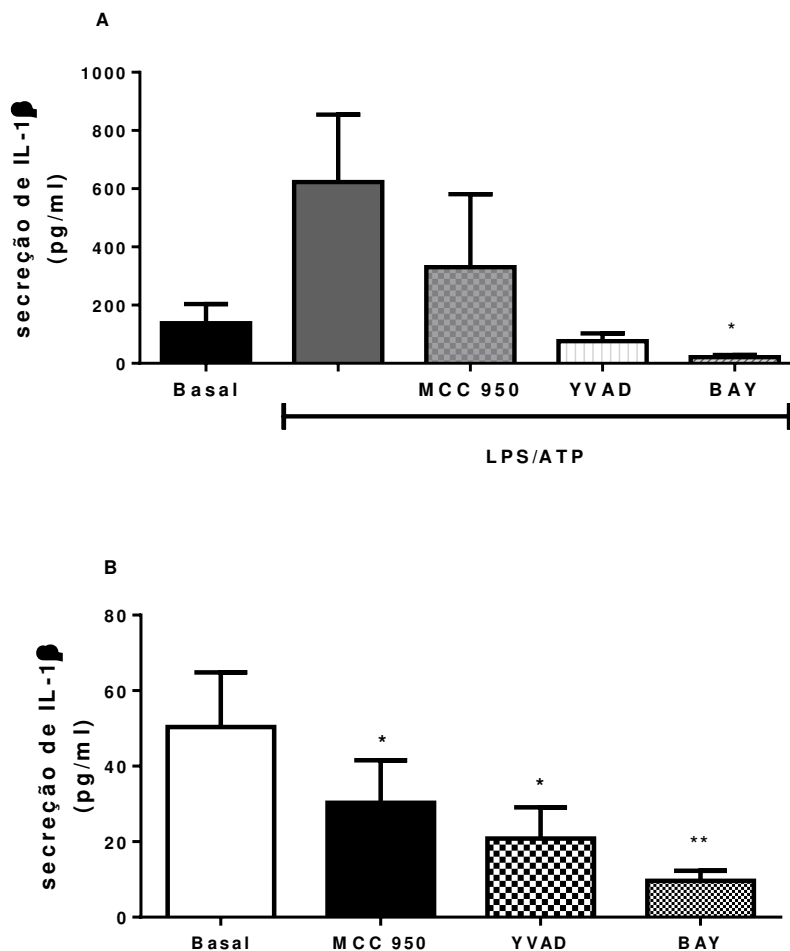


Figura 26. Liberação de IL-1 β em monócitos após tratamento com inibidores do inflamassoma. (A) Monócitos isolados de indivíduos controles foram ativados ou não com LPS (100 ng/ml) e ATP (2,5 mM) (CTRL, N=3) e co-incubados, ou não, com os inibidores de NLRP3, MCC950 (5 μ M), YVAD-FMK (40 μ M) e com BAY117082 (10 μ M); (B) Monócitos isolados de indivíduos AF (N=8) foram co-incubados com MCC950 (5 μ M), YVAD-FMK (40 μ M) e com BAY117082 (10 μ M) durante 1 hora. Os sobrenadantes foram retirados e armazenados para detecção da presença de IL-1 β . Os dados estão representados como média $\pm$ SEM. Para o teste estatístico usou-se o teste não-pareado de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn's. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ comparado ao não tratado.

6.1.25. Liberação de IL-1 β em monócitos após tratamento com droga inibidora da molécula ASC

Para confirmar a participação da molécula ASC na formação do inflamassoma que intermedia o processamento de IL-1 β em monócitos de indivíduos AF, utilizamos o inibidor CAPE, que exerce ação sob a molécula adaptadora ASC. Primeiramente, isolamos monócitos (através da técnica de beads magnéticas) de indivíduos portadores de AF (N=3) e tratamos as células durante 1 hora (37°C, 5% CO₂), com a droga CAPE (1, 5 e 10 μ M), após esse período coletamos o sobrenadante e quantificamos a IL-1 β através do kit de ELISA. Nossos dados mostraram que nas concentrações de 1 a 5 μ M de CAPE, há a inibição da liberação de IL-1 β pelos monócitos AF, confirmando a participação da molécula ASC no inflamassoma formado nestas células (Figura 27).

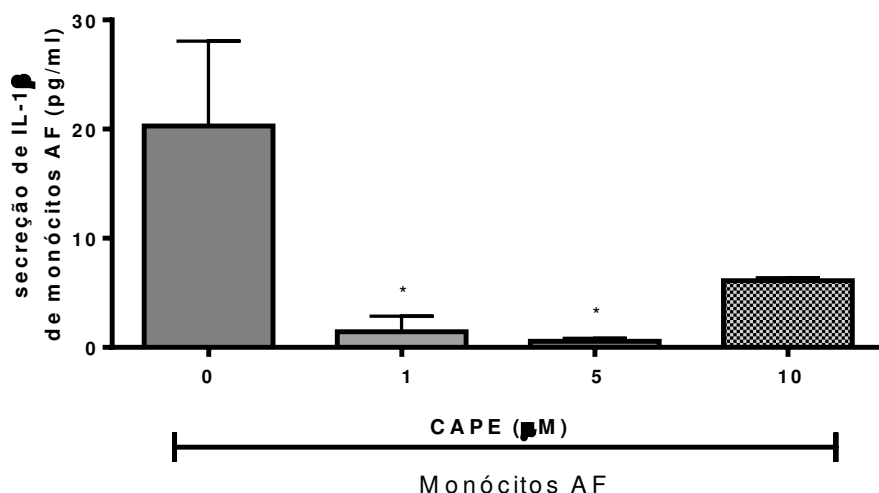


Figura 27. Liberação de IL-1 β em monócitos de indivíduos AF após incubação com inibidor da molécula ASC. Monócitos isolados de indivíduos portadores de AF (AF, N=3) e co-incubados com o inibidor de ASC - CAPE (1, 5 e 10 μ M). A IL-1 β foi determinada através de Kit de ELISA, em sobrenadantes de monócitos AF incubados por 1 hora. Os dados estão representados como média $\pm$ SEM. Para o teste estatístico usou-se o teste não-pareado de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn's. * $p < 0,05$; comparado ao grupo AF.

6.1.26. Confirmação da expressão dos componentes necessários para formação do inflamassoma NLRP3 através da técnica de Western blotting

Avaliamos a expressão proteica dos principais componentes necessários para a formação do inflamassoma em células mononucleares (PBMC) provenientes de indivíduos CTRL e indivíduos portadores de AF. Dentre as proteínas, avaliamos a expressão proteica de: NLRP3, ASC, Pró-caspase-1, caspase-1 e IL-1 β clivada. Como controle positivo, estimulamos as PBMC durante 4 horas (37°C, 5% CO₂) com 1 μ g/ml de LPS (sinal 1) e com ATP (2,5 mM) (30 min; 37°C, 5% CO₂). Na figura 29 analisamos a expressão dos componentes do inflamassoma; e podemos notar um aumento na expressão do receptor NLRP3 em PBMC de indivíduos portadores de AF quando comparado ao grupo CTRL positivo e ao grupo CTRL (Figura 28A). Também avaliamos a expressão proteica da molécula adaptadora ASC e da molécula efetora caspase-1, podemos notar que ambos os grupos expressam a molécula adaptadora ASC, porem o grupo CTRL positivo e o grupo AF, tem uma expressão aumentada dessa molécula (Figura 28B). Nota-se que há uma quantidade menor de pró-caspase-1 no grupo CTRL estimulado, quando comparada ao grupo CTRL não estimulado e ao grupo AF. Em contraste, quando avaliamos a forma clivada de caspase-1, notamos um aumento nítido no grupo AF, quando comparado aos demais grupos (Figura 28C). Por fim, avaliamos a expressão proteica de IL-1 β clivada e só foi possível notar a expressão dessa citocina nos grupos CTRL positivo e no grupo AF (Figura 28D). Nossos resultados comprovam que as PBMCs de indivíduos AF expressam todas as proteínas necessárias para a maquinaria do inflamassoma.

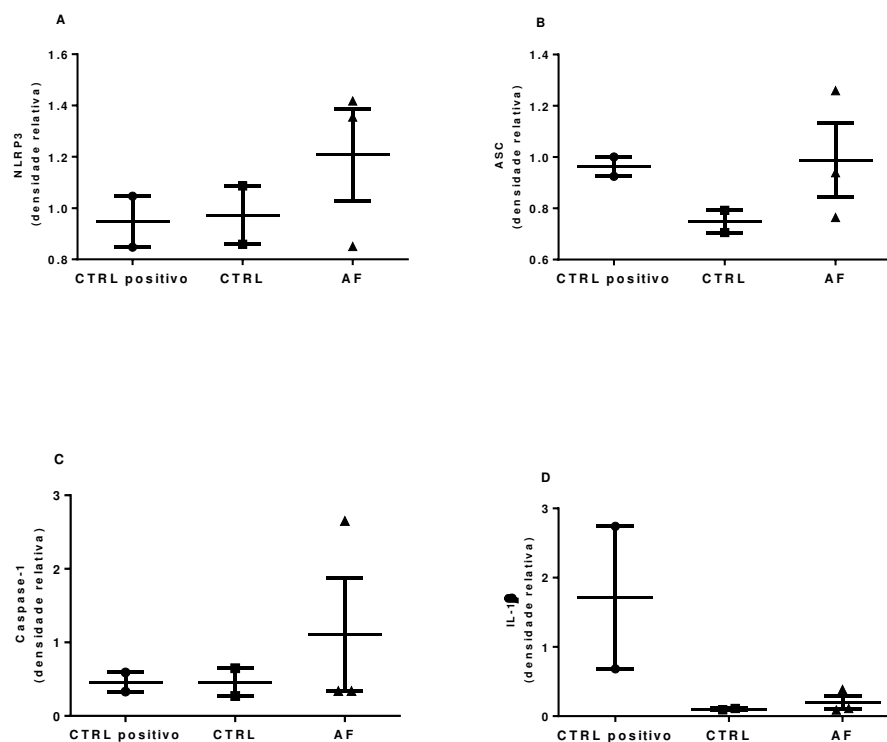
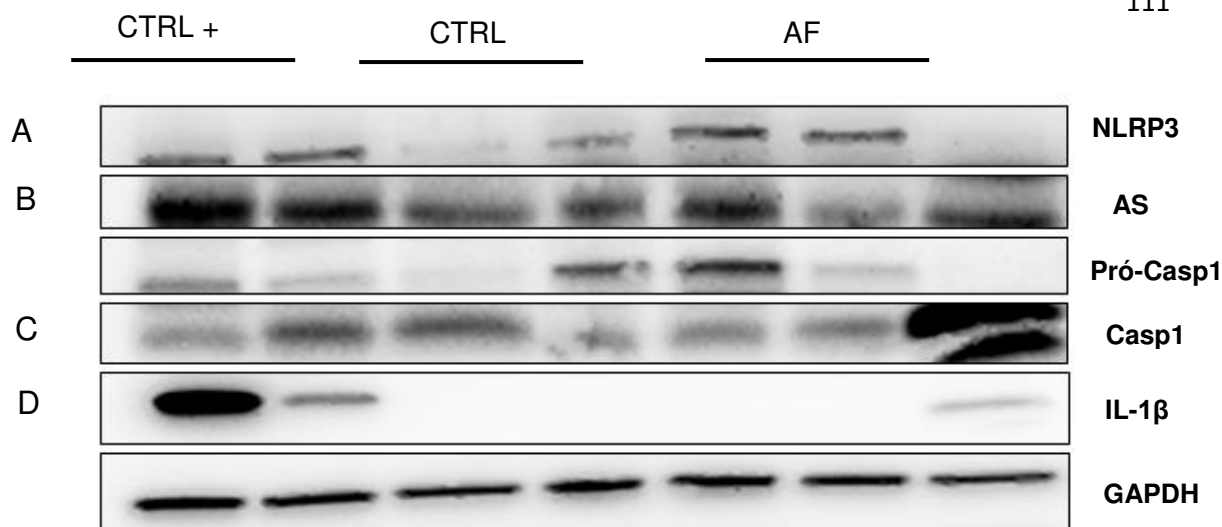


Figura 28. Expressão proteica de NLRP3, ASC, caspase-1, IL-1β em células mononucleares. Células mononucleares (PBMC) foram isolados de indivíduos CTRL e de indivíduos portadores de AF e a expressão dos componentes do inflamassoma foram detectados por Western blotting. Os extratos totais foram fracionados em gel de poliácridamida 15%, transferidos para membrana e esta foi incubada com os anticorpos de interesse (A) *Western Blotting* representativo da densidade relativa de NLRP3; (B) densidade relativa de ASC; (C) densidade relativa de caspase-1 clivada; (D) densidade relativa de IL-1β. Representação da densidade relativa das bandas foi avaliada por densitometria usando o Image Lab software (BioRad).

Subprojeto 2: Ativação de caspases inflamatórias na anemia falciforme: Papel dos leucócitos e do meio circulante



Parte dos resultados expostos deste subprojeto foram realizados em colaboração com o laboratório da Professora Dra. Lisa Bouchier-Hayes – Baylor College of medicine e Texas Children's Hospital – Houston/TX- EUA

Dados preliminares obtidos durante o projeto original (Hemocentro/ Brasil)

6.2.1. Determinação dos níveis plasmáticos de DAMPS em indivíduos saudáveis e pacientes portadores de AF

Dados da literatura sugerem que o inflamassoma pode ser ativado por diferentes tipos de DAMPS. Como há relatos que a lesão celular associada a processos de isquemia e de hemólise podem resultar na liberação de vários DAMPs, incluindo heme livre, HMGB1, HSP70, IL-33 e ATP, avaliamos os níveis destes DAMPs em indivíduos portadores de AF, com vista para avaliar o seu papel na estimulação da formação de inflamassoma na doença. Determinamos os níveis destes DAMPs no plasma de indivíduos controles (CTRL) e indivíduos portadores de anemia falciforme (AF) por métodos de ELISA (HMGB1, HSP70, IL-33) e ensaios colorimétricos (heme e ATP). Conforme esperado, os níveis plasmáticos de heme livre (Figura 29A) foram significativamente maiores em indivíduos AF, quando comparados com os níveis do grupo controle. Os níveis plasmáticos de HSP70 e HMGB1 (Figura 29B e C) foram significativamente maiores em indivíduos AF, quando comparados com o grupo controle, enquanto os níveis de ATP e IL-33 (Figuras 29D e E) não apresentaram alteração significativo quando comparando aos grupos estudados, porem há uma tendência no aumento de ATP em indivíduos AF quando comparados ao grupo controle.

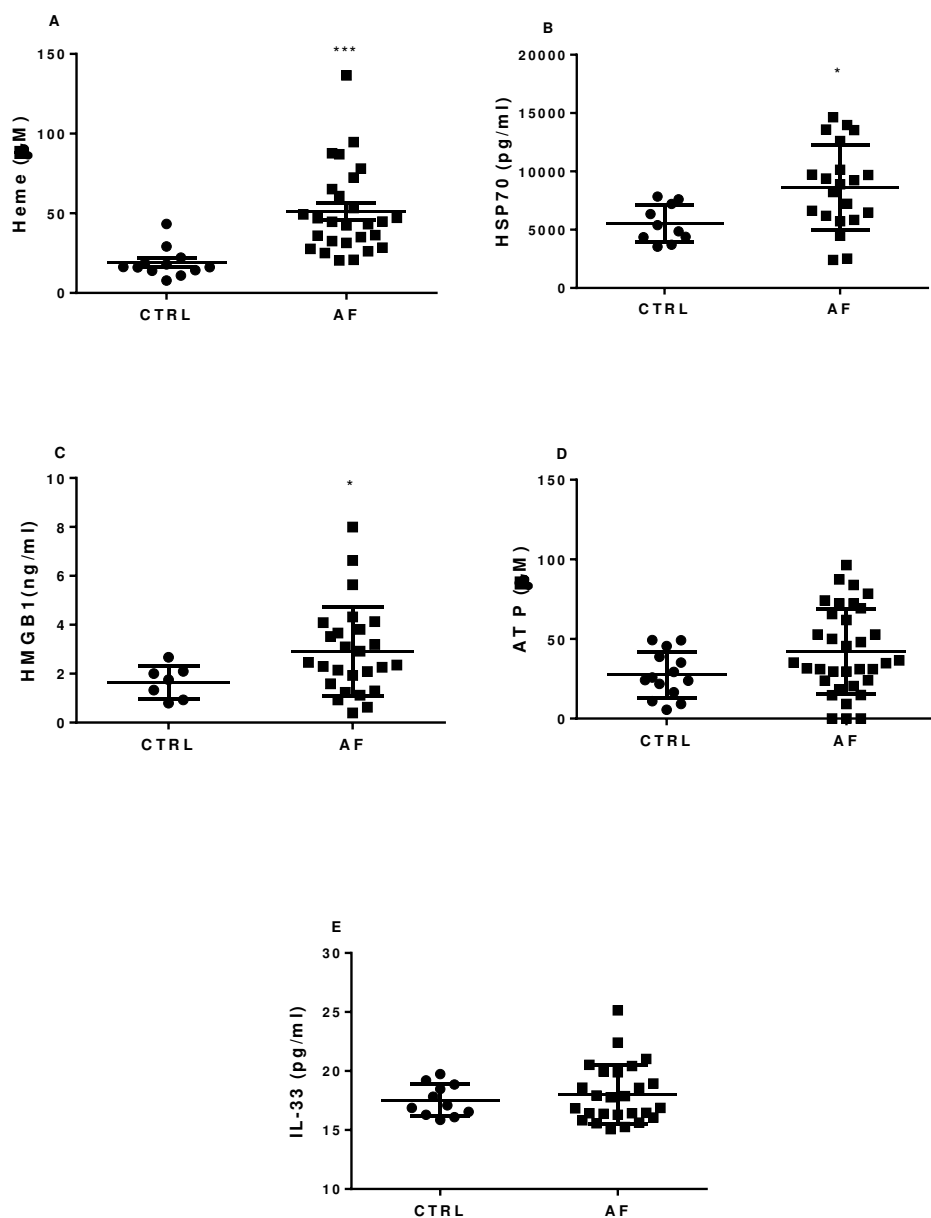


Figura 29. Determinação dos níveis circulantes de determinados DAMPs em indivíduos controles e portadores de anemia falciforme. Determinação dos níveis de (A) heme livre total; (B) HSP70; (C) HMGB1; (D) ATP; (E) IL-33 no plasma de indivíduos controles (CTRL, n=12) e indivíduos portadores de AF (AF, n=24). Os níveis de HSP70, HMGB1, IL-33 e TNF- α foram quantificados através do ensaio de ELISA, heme através do kit Quantichrome heme assay e ATP através do kit Molecular Probes ATP Determination Kit. Para o teste estatístico usou-se o teste de Mann-Whitney. ***p < 0,001; *p < 0,05, comparado ao grupo controle.

6.2.2. Determinação dos níveis plasmáticos de IL-1 α e TNF- α em indivíduos saudáveis e pacientes portadores de AF

A citocina TNF- α , por sua vez, se caracteriza como uma citocina inflamatória que estimula a ativação dos leucócitos pela via NF κ B; há relatos que esta citocina esteja aumentada na circulação de indivíduos AF (16). Para investigar se o TNF- α tem papel potencial na ativação do “*sinai 1*” para o “*priming*” de inflamassoma, determinamos também os níveis desta citocina no plasma dos indivíduos do estudo, através do Kit de ELISA. Os níveis plasmáticos encontrados de TNF- α foram significativamente maiores em indivíduos AF, quando comparado ao grupo controle (Figura 30). Por fim, avaliamos os níveis de IL-1 α , sendo esta uma importante citocina inflamatória, da família das IL-1. Porém, não foram detectáveis os níveis dessa citocina em plasma de indivíduos AF (dados não mostrados).

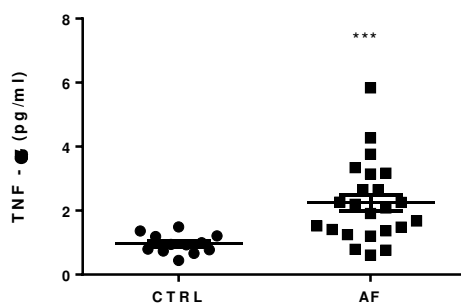


Figura 30. Determinação dos níveis plasmáticos de TNF- α em indivíduos controles e portadores de anemia falciforme. Determinação dos níveis de TNF- α no plasma de indivíduos controles (CTRL, N=12) e indivíduos portadores de AF (AF, N=24). Os níveis de TNF- α foram quantificados através do ensaio de ELISA de alta sensibilidade. Para o teste estatístico usou-se o teste de Mann-Whitney. ***p < 0,001; comparado ao grupo controle.

6.2.3. Avaliação da ativação da caspase-1 em neutrófilos saudáveis estimulados com plasma de indivíduos portadores de AF

Neutrófilos de indivíduos controles (N=6) foram incubados durante 2 horas em meio RPMI na ausência ou na presença de 5-10 % (v/v) de pool de plasma de indivíduos controles ou pool de indivíduos AF. Enquanto que o plasma de indivíduos controles não induz a ativação de caspase-1 nessas células, o plasma de indivíduos AF induziu um aumento significativo na ativação de caspase-1 (Figura 31), indicando que os DAMPs contidos no plasma desses pacientes são capazes de induzir a formação de inflamassoma em neutrófilos saudáveis.

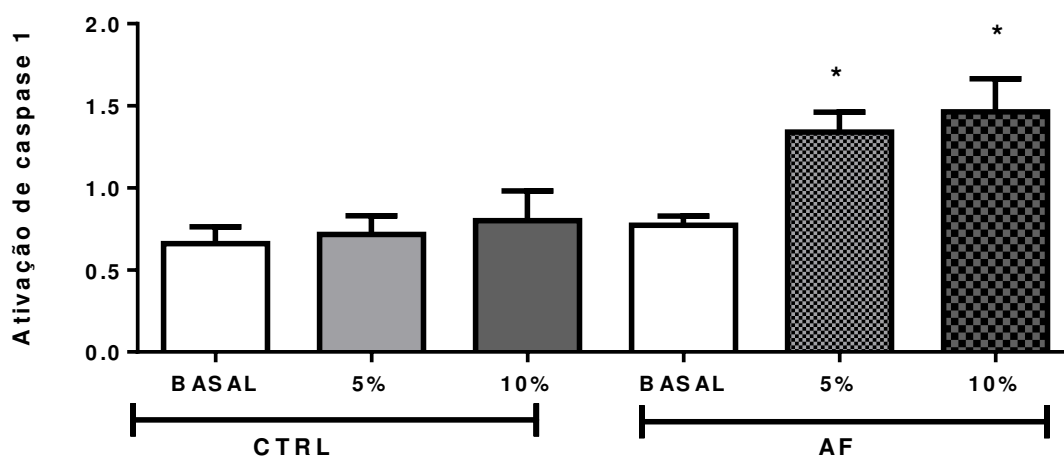


Figura 31. Avaliação da ativação da caspase-1 em neutrófilos saudáveis estimulados com plasma de indivíduos portadores de AF. Ativação de caspase-1 em neutrófilos controles (2×10^6 células/ml) após incubação de 2 horas com 5-10% de pool de plasma de indivíduos controles (CTRL, N=6) e pool de plasma de indivíduos portadores de AF (AF, N=12). A ativação de caspase-1 foi avaliada através do kit FAM-FLICA caspase 1 e citometria de fluxo convencional. Para o teste estatístico usou-se o teste de Kruskal-Wallis; * $p < 0,05$, comparado ao grupo controle.

6.2.4. Avaliação da liberação de IL-1 β em neutrófilos saudáveis estimulados com plasma de indivíduos portadores de AF

Separamos neutrófilos de doadores saudáveis (N=6) e incubamos por 2 horas na ausência ou presença de 5-10 % de plasma de indivíduos portadores de AF e plasma de indivíduos controles (CTRL). Podemos notar que aparentemente o plasma de ambos indivíduos CTRL e portadores de AF (10%) pode induzir o processamento de IL-1 β em neutrófilos saudáveis, porem há uma tendência elevada no aumento desse processamento, quando incubamos com 10% de plasma de AF quando comparado com o grupo CTRL (Figura 32).

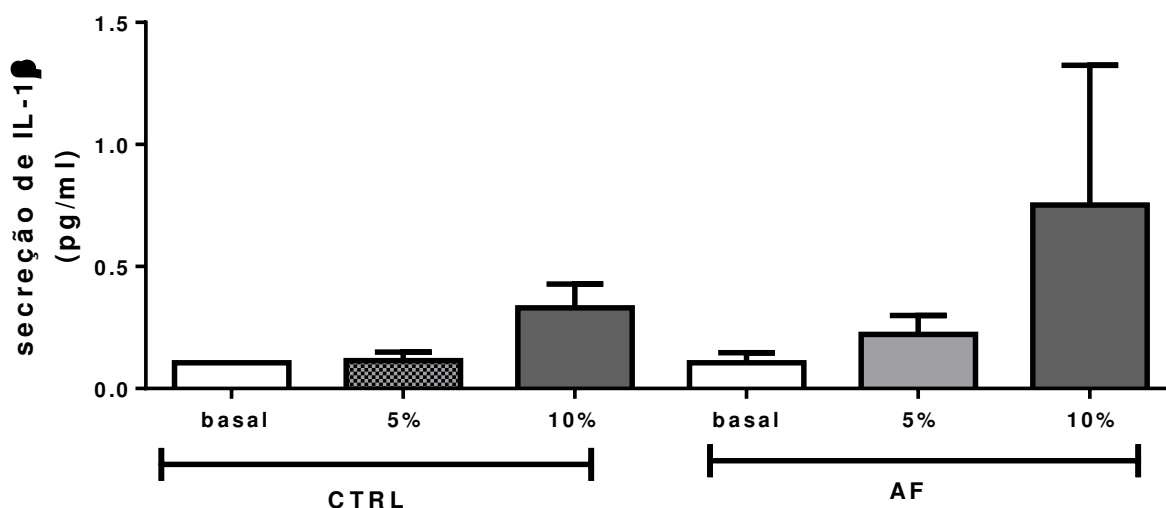


Figura 32. Avaliação da liberação de IL-1 β em neutrófilos saudáveis estimulados com pool de plasma de indivíduos CTRL e portadores de AF. Liberação de IL-1 β por neutrófilos controles (2×10^6 células/ml, n=6) após incubação de 2 horas com 5-10% de plasma de indivíduos controles (CTRL, pool de n=6), e plasma de indivíduos portadores de AF (pool de n=6). A liberação de IL-1 β foi avaliada através do kit de Human IL-1 β DuoSet ELISA.

Dados obtidos exclusivamente em colaboração com grupo no exterior:

Em vista dos dados obtidos em nosso projeto original e em colaboração com o laboratório da Dr. Lisa Bouchier-Hayes (especialista em biologia molecular com ênfase em estudos das vias de sinalização de caspases), e o Dr. Jonathan Flannagan (especialista em biologia molecular com ênfase em estudos de hemoglobinopatias e anemia falciforme), ambos atuantes no Baylor college of Medicine e Texas Children's Hospital, desenvolvemos o subprojeto 2.

6.2.5. Populações de indivíduos controles e pacientes AF estudados

Funcionários do Texas Children's Hospital (indivíduos saudáveis HbAA - grupo CTRL, N=5) e indivíduos pediátricos portadores de AF (2-18 anos) em estado estável (N=2) e/ou em terapia com HU (15–30 mg/kg/d) (N=15) (HbSS, grupo AF, N=17) foram recrutados no setor de coleta e no ambulatório de hematologia do Texas Children's Hospital, respectivamente. Segue abaixo, os dados clínicos dos pacientes AF utilizados neste estudo (Tabela 3).

Tabela 3. Dados clínicos dos pacientes participantes deste estudo (população – Ambulatório de Hematologia Pediátrica – Texas Children’s Hospital – Houston-TX- EUA).

Parâmetros Demográficos/Hematológicos	Média (Mediana, Min, Max)
Masculino/Feminino	7/10
Idade (anos)	9.2 (10.6: 3.4 – 12.8)
Nº de pacientes sem/com tratamento com HU	15/2
HbS (%) (N=9)	77.7 (81.7: 63 – 92.4)
HbF (%) (N=9)	18.7 (15.3: 4.1 – 40.2)
Nº absoluto de reticulócitos (cel/μl) (N=9)	515.5 (740: 80- 910)
Contagem absoluta de neutrófilos (cels/μl) (N=9)	5.12 (3.45: 1.33 -8.77)
Contagem absoluta de glóbulos brancos ($10^3/\mu$l) (N=9)	13.42 (8.85: 4.84 -24.58)

Com exceção do sexo, todos os dados estão representados como média (mediana; mínimo; máximo) valores para pacientes com AF em estado estável (AF), pacientes AF em terapia com HU (AFHU; 15–30 mg/kg/d). HbF: hemoglobina fetal.

6.2.6. Avaliação da indução de caspase-1 BiFC em células HeLa por plasma de indivíduos saudáveis e de portadores de AF

As células HeLa (células imortalizadas provenientes de um câncer cervical) expressam as proteínas necessárias para a formação do inflamassoma (136) e secretam IL-6 em resposta a IL-1 β ativa (137)(138). Analisamos a capacidade do plasma de indivíduos controles (CTRL, N=5) e AF (AF, N=8) em induzir a proximidade de caspase-1 em células HeLa transfectadas com as combinações de plasmídeos de caspase-1.

As células HeLa (1×10^5 células) foram plaqueadas 24 horas antes da transfecção em placas de 12 poços e transfectadas transitoriamente com os plasmídeos de caspase-1 denominados de C1-Pro VC (5 ng), C1-Pro VN (5 ng) e dsRed-mito (5 ng), sendo este usado como o repórter desta transfecção. Como controle positivo, algumas células foram transfectadas com C1-Pro VC, C1-Pro VN e dsRed-mito (5 ng), e também com um plasmídeo para codificação de ASC (125 ng). Todos os poços da placa foram tratados com QVD-OPH ($5 \mu\text{M}$) para prevenir a morte celular. Após 24 horas, 10% (v/v) de plasma proveniente do grupo controle (CTRL; N=5) ou plasma de indivíduos portadores de AF (AF; N=8) foram adicionados às células HeLa. Após 48 horas do início da transfecção, a porcentagem de células transfectadas que eram vênus positivas (células com dimerização de caspase), foram determinadas a partir de um mínimo de 100 células dsRed-mito positivas (contagem manual) por microscopia de fluorescência e as imagens foram obtidas através da microscopia confocal.

O plasma de indivíduos AF foi capaz de induzir significativamente a dimerização de caspase-1 em células HeLa, como demonstrado através da porcentagem de células vênus positivas. Em contraste, o plasma de indivíduos controles não foi capaz de induzir o mesmo mecanismo neste tipo celular (Figura 33 A). As imagens obtidas por microscopia confocal demonstraram que o plasma de indivíduos CTRL induziu níveis muito baixos de dimerização de caspase-1, enquanto que o plasma de AF induziu uma dimerização de caspase-1 muito evidente, como pode ser visualizada por *punctas fluorescentes*, observadas em muitas células (Figura 33B). Como esperado, a transfecção de células HeLa com o plasmídeo ASC, bem como, com os plasmídeos de caspase-1, e na ausência de estimulação com os plasmas, induziu alta dimerização de caspase-1, confirmando o sucesso das transfecções e a capacidade dessas células em formar o inflamassoma (Figura 33A e B).

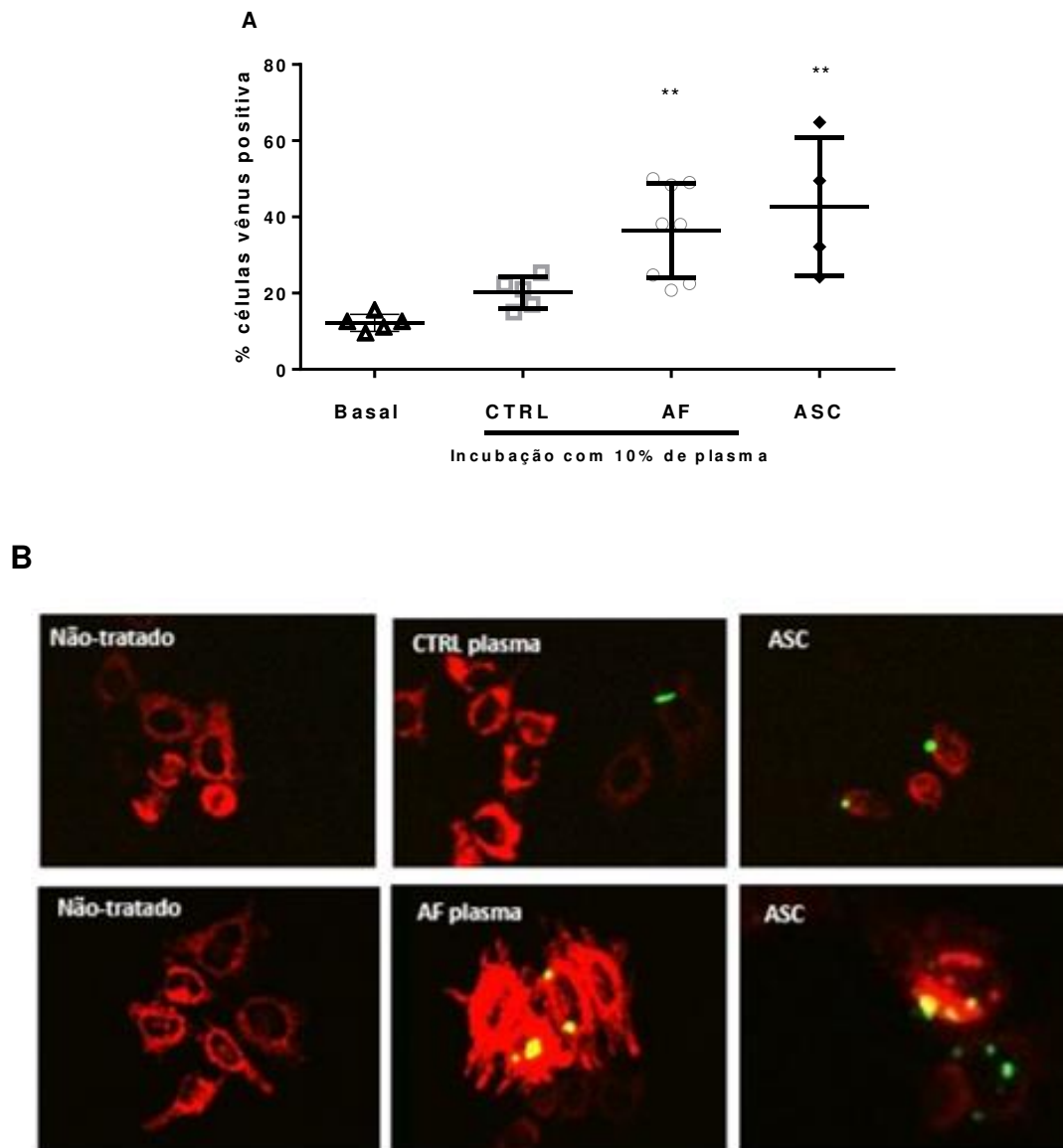


Figura 33. Avaliação do efeito do plasma de indivíduos portadores de AF na indução de caspase-1 BiFC em células HeLa. As células HeLa foram transfectadas transitoriamente com C1-Pro VC (5ng), C1-Pro VN (5ng) e dsRed-mito (5 ng) com/sem um plasmídeo codificando ASC (controle positivo, 125 ng). 24 horas após da transfecção, 10% de plasma de indivíduos portadores de AF (AF, N=8) e/ou plasma de indivíduos CTRL (CTRL, N=5) foram adicionados em seus respectivos poços. Para o teste estatístico usou-se o teste de Kruskal Wallis com pós teste de Dunn's. ** $p < 0.01$, quando comparado as células HeLa basal. As células vênus positivas foram determinadas a partir de um mínimo de 100 células positivas para dsRed-mito (contagem manual). (B) Imagens representativas de caspase-1 BiFC em células HeLa, em vermelho (mitocôndrias), em verde (dimerização de caspase-1 BiFC).

6.2.7. Avaliação da transfecção com o plasmídeo mutante D59R para induzir a dimerização de caspase-1

Com o intuito de eliminar a possibilidade do próprio mecanismo de transfecção induzir a positividade de células vênus positivas, foram utilizados plasmídeos C1-Pro BiFC contendo uma mutação na região do domínio CARD da caspase-1, denominado mutação *D59R*, esta mutação interrompe a ligação entre a caspase-1 e a ASC. Células HeLa (1×10^5 células) foram plaqueadas 24 horas antes da transfecção em placas de 12 poços. As células foram transfectadas transientemente com os plasmídeos: C1-Pro VC (5 ng), C1-Pro VN (5 ng) e com os plasmídeos mutantes C1-Pro D59R (5 ng de cada plasmídeo, VC e VN). Para controle positivo, transfectamos células HeLa com o plasmídeo que codifica ASC (125 ng). Todos os poços da placa receberam o plasmídeo dsRed-mito (5 ng - *repórter*) e as células foram também incubadas com QVD-OPH (5 μ M) para prevenir a morte celular.

Após 24 horas, 10% (v/v) de um pool de plasma de indivíduos controle (CTRL; N=2) ou um pool de plasma de indivíduos AF (AF; N=2) foi adicionado em células HeLa. Após 48 horas do início da transfecção, a porcentagem de células transfectadas que eram vênus positivas foram determinadas a partir de um mínimo de 100 células (contagem manual), obtidas por microscopia de fluorescência e as imagens foram obtidas por microscopia confocal. O plasmídeo mutado (D59R) aboliu quase totalmente a porcentagem de células vênus positivas, quando comparado com aquelas células transfectadas sem a mutação D59R, este experimento foi realizado sob as mesmas condições de incubação do experimento 6.2.6, indicando que o procedimento de transfecção produziu dimerização específica de caspase-1 (Figuras 34A e B).

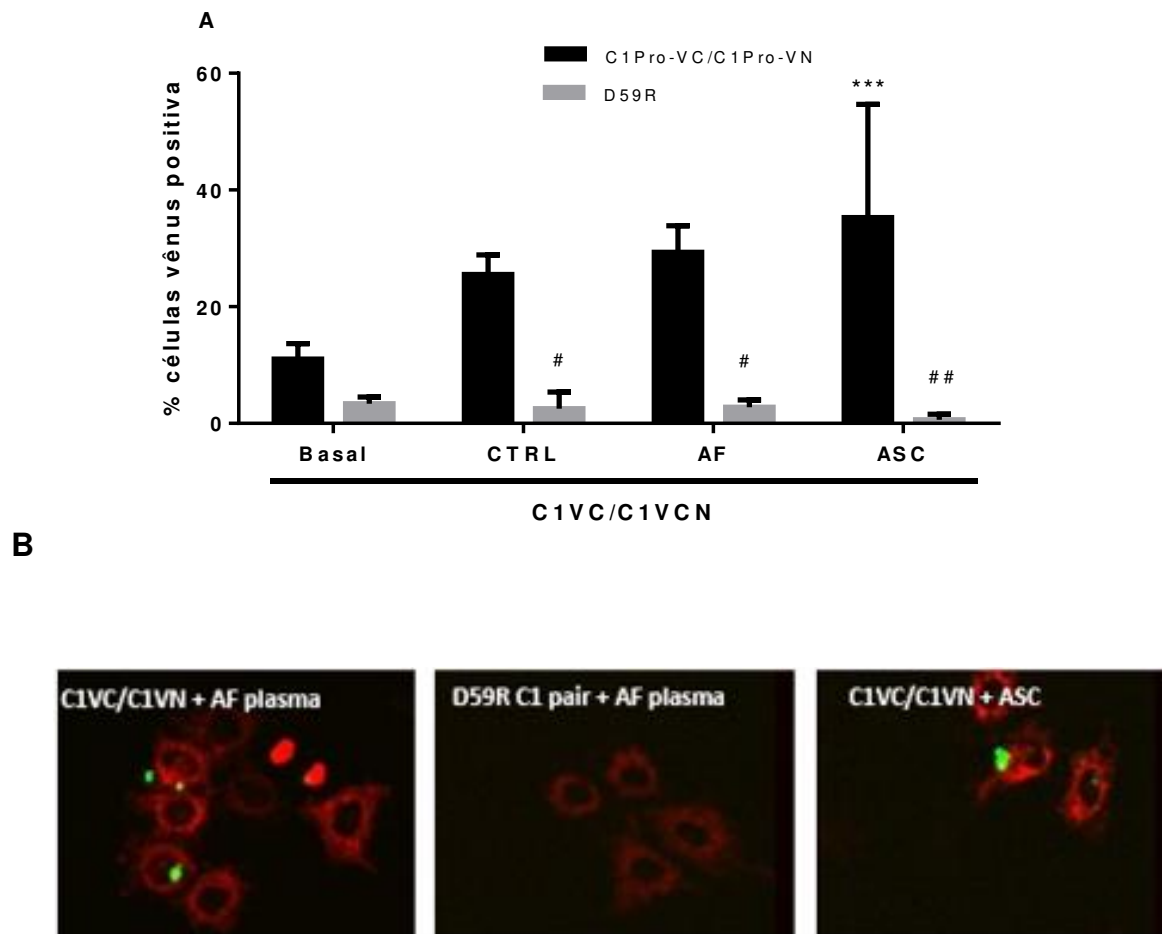


Figura 34. Avaliação da transfecção com o plasmídeo mutante D59R para induzir a dimerização de caspase-1. (A). As células HeLa foram transfectadas transitoriamente com C1-Pro VC (5ng), C1-Pro VN (5ng), par de plasmídeo mutante *D59R C1-Pro venus* (10 ng) e dsRedmito (5ng). (B) Imagens representativas de caspase-1 BiFC em células HeLa, em vermelho (mitocôndrias), em verde (dimerização de caspase-1 BiFC). Para o teste estatístico usou-se o teste de Two-Way ANOVA com múltiplas comparações. *** $p < 0.001$ quando comparado ao grupo não-tratado. # $p < 0.05$ e ## $p < 0.01$ quando comparado com cada não-D59R grupo. Ampliação de x100.

6.2.8. Avaliação do papel do plasma de indivíduos portadores de AF na indução de caspase-1 BiFC em células MCF-7

As células MCF-7 (células provenientes de um câncer de mama) foram selecionadas para este estudo, pois não expressam níveis detectáveis de caspase-1 em seu estado basal, portanto prevenindo a interferência de caspases inflamatórias endógenas (139)(131). Analisamos a capacidade do plasma de indivíduos CTRL e AF em induzir a proximidade de caspase-1 em células MCF-7 transfectadas com as combinações de plasmídeos de caspase-1.

As células MCF-7 (1×10^5 células) foram plaqueadas 24 horas antes da transfecção em placas de 12 poços e foram transfectadas transitoriamente com os plasmídeos de caspase-1 denominados de C1-Pro VC (5 ng), C1-Pro VN (5 ng) e com o repórter (dsRed-mito (5 ng)). Como controle positivo, algumas células foram transfectadas com C1-Pro VC, C1-Pro VN, dsRed-mito (5 ng), e também com um plasmídeo codificando ASC (125 ng). Todos os poços também foram incubados com QVD-OPH (5 μ M) para prevenir a morte celular. Após 24 horas, 10% (v/v) de plasma de controle saudável (CTRL; N=5) ou plasma de pacientes com AF (AF; N=10) foram adicionados às células MCF-7. Após 48 horas do início da transfecção, a porcentagem de células transfectadas que eram vênus positivas foram determinadas a partir de um mínimo de 100 células dsRed-mito positivas (contagem manual) por microscopia de fluorescência, e as imagens foram obtidas através da microscopia confocal. O plasma de indivíduos AF foi capaz de induzir a dimerização significativa de caspase-1, como demonstrado através da porcentagem de células vênus positivas. O plasma controle não induziu a dimerização de caspase-1 em células MCF-7 (Figuras 35A e B), em comparação com as células não tratadas, embora não tenha sido encontrada diferença significativa entre os efeitos dos plasmas CTRL e AF na dimerização de caspase-1. Como esperado, a transfecção de células MCF-7 com o plasmídeo ASC, bem como com os plasmídeos de caspase-1, na ausência de estimulação com plasma, induziu alta dimerização de caspase-1, confirmando o sucesso das transfecções e a capacidade dessas células em formar o inflamassoma. Para observar o exato momento em que a dimerização de caspase-1 ocorre em células MCF-7 estimuladas com plasma, foi realizada a transfecção com

filmagem *time-lapse*. As células MCF-7 (1×10^5 células) foram plaqueadas 24 horas antes da transfecção em uma *chamber* (*placa com um único poço*) e transfectadas transitoriamente com os plasmídeos de caspase-1 denominados de C1-Pro VC (5 ng), C1-Pro VN (5 ng) e com o repórter (dsRed-mito (5 ng). As células foram tratadas com QVD-OPH (5 μ M) para prevenir a morte celular. Após 24 horas, 10% (v/v) de plasma de controle saudável (CTRL; N=1) ou plasma de pacientes com AF (AF; N=1) foram adicionados às células MCF-7. O experimento de *time-lapse* foi automatizado para executar mais de 16 horas de incubação (durante a noite). A dimerização de caspase-1 pode ser observada em células MCF-7 estimuladas com o plasma de AF (visualizadas com o aparecimento de *punctas* verdes fluorescentes nas células), enquanto que nas células MCF-7 estimuladas com o plasma CTRL, não foi possível observar tal dimerização de caspase-1 (estes dados serão mostrados na aula expositiva).

Com estes achados, podemos sugerir que o plasma de pacientes AF é capaz de induzir a dimerização de caspase-1 em linhagens celulares não-imunes, sugerindo que a indução da atividade de caspase-1 e a montagem do inflamassoma pode ocorrer em qualquer tipo celular e pode ser dependente do sinal inflamatório extracelular.

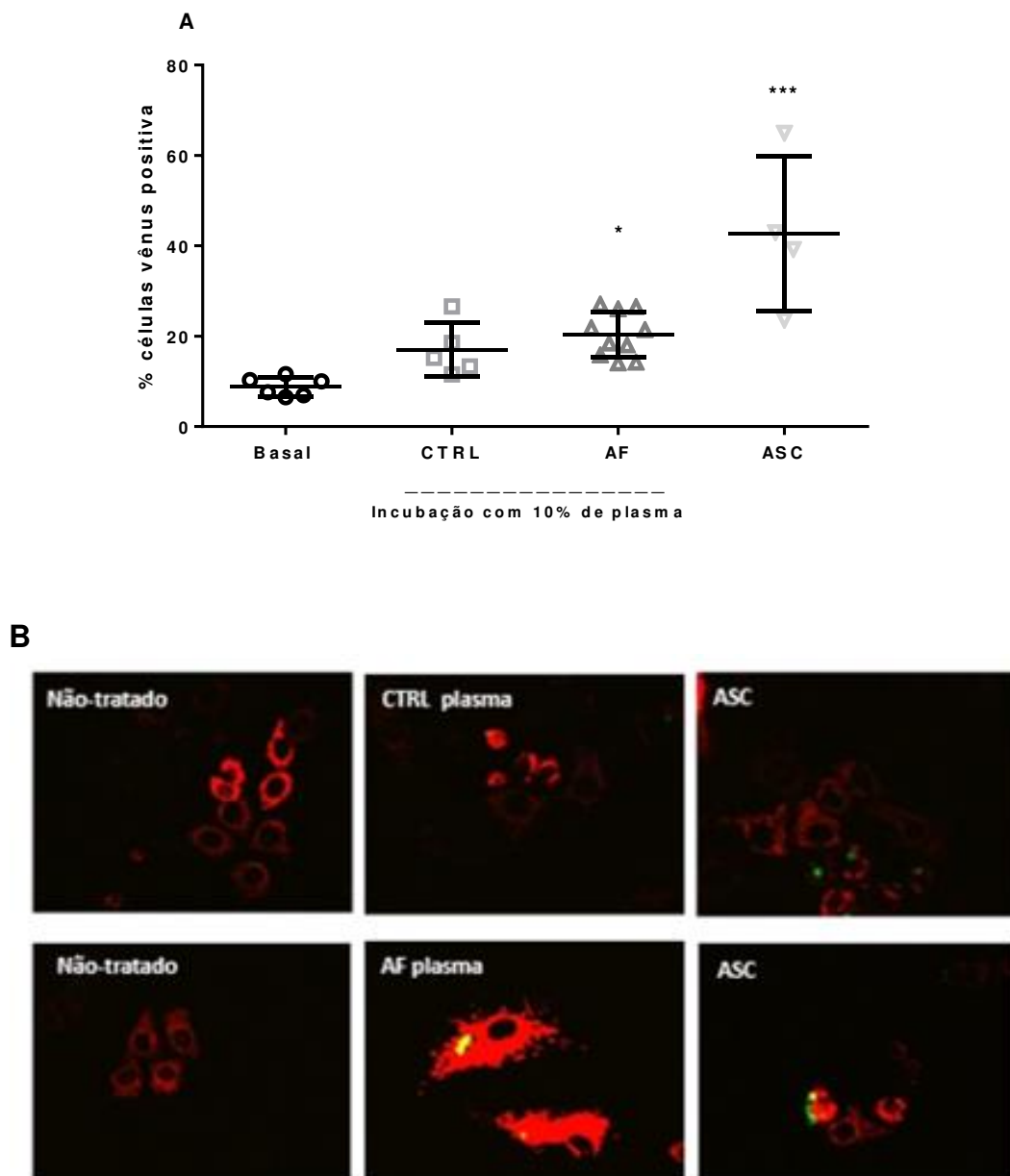


Figura 35. Avaliação do papel do plasma de indivíduos portadores de AF na indução de caspase-1 BiFC em células MCF-7. As células MCF-7 foram transfectadas transitoriamente com C1-Pro VC (5ng), C1-Pro VN (5ng) e dsRed-mito (5 ng) com/sem um plasmídeo codificando ASC (controle positivo, 125 ng). Após 24 hrs da transfecção, 10% de plasma AF (AF, N=10) e/ou plasma CTRL (CTRL, N=5) foram adicionados em seus respectivos poços. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$, quando comparado as células MCF-7 não tratadas, Kruskal Wallis com pós teste de Dunn's. As células venus positivas foram determinadas a partir de um mínimo de 100 células positivas para dsRed-mito (contagem manual). (B) Imagens representativas de caspase-1 BiFC em células MCF-7, em vermelho (mitocôndrias), em verde (dimerização de caspase-1 BiFC). Ampliação de x100.

6.2.9. Associações entre a capacidade do plasma de indivíduos portadores de AF em induzir a dimerização de caspase-1 e o uso de HU e a porcentagem de HbF

Tanto os níveis elevados de hemoglobina fetal (HbF) quanto a terapia com hidroxiureia (que tem como função aumentar a HbF e efeitos anti-inflamatórios) melhoram o curso clínico da AF. Usando os dados hematológicos obtidos para pacientes, realizamos estudos de associações para verificar como a terapia com hidroxiureia (HU) e os níveis de HbF em indivíduos portadores de AF podem modular a capacidade do plasma de induzir a proximidade de caspase-1.

Com relação a terapia com HU, cujo início é decidido por médicos assistentes e de acordo com protocolos rigorosos, apenas dois indivíduos portadores de AF não estavam em terapia com HU (porem, apenas 1 individuo estava apto para ser usado neste estudo de associação, dos quais foram utilizados os plasmas nas linhagens celulares). Nos indivíduos portadores que estavam em uso ou não da terapia com HU (Figura 36A), não observamos diferença significativa entre a capacidade de induzir a dimerização de caspase-1 nas células estudadas. Dados preliminares indicam que o plasma de indivíduos portadores de AF em terapia com HU poderia estimular a dimerização de caspase-1 em células HeLa mais eficientemente do que o plasma de indivíduos AF em estado estável. Embora este achado possa ter sido um reflexo do pequeno número de amostras que não fizeram o uso de terapia com HU, os resultados são muito preliminares para se tirar conclusões, mas se confirmados, este achado pode refletir no “viés de tratamento”, no qual os pacientes com a doença mais grave são atualmente tratados com HU. Com relação a % de HbF expressa pelos pacientes em seus glóbulos vermelhos, infelizmente a disponibilidade deste parâmetro foi muito limitada para os indivíduos incluídos no estudo. Os níveis de HbF estavam disponíveis para 6 dos indivíduos com AF avaliados e houve uma variação de cerca de 11 a 40% de HbF (de Hb total), demonstrando que modificações impressionantes na HbF podem ser alcançadas com o uso de terapia com HU em crianças portadoras de AF. Dividimos os níveis de HbF em “baixo HbF” (<16% de HbF) e “alto HbF” (≥16%) e observamos os efeitos que o plasma desses pacientes empregaram na dimerização de caspase-1 (Figura 37B); no entanto, não foi observada associação significativa entre a % de baixa

HbF e a dimerização de caspase-1 em células HeLa ou MCF-7, embora seja possível que o baixo número de parâmetros avaliados possa ter contribuído para essa falta de associação. A dimerização de caspase-1 (BiFC) também foi correlacionada com parâmetros hematológicos (disponível para 5 dos indivíduos AF cujos plasmas foram empregados nos estudos de transfecção); no entanto, não foram encontradas correlações significativas entre BiFC e contagem de células brancas, contagem de plaquetas ou parâmetros de eritrócitos ($p>0.05$; correlação de Spearman) (Figura 36 A e B).

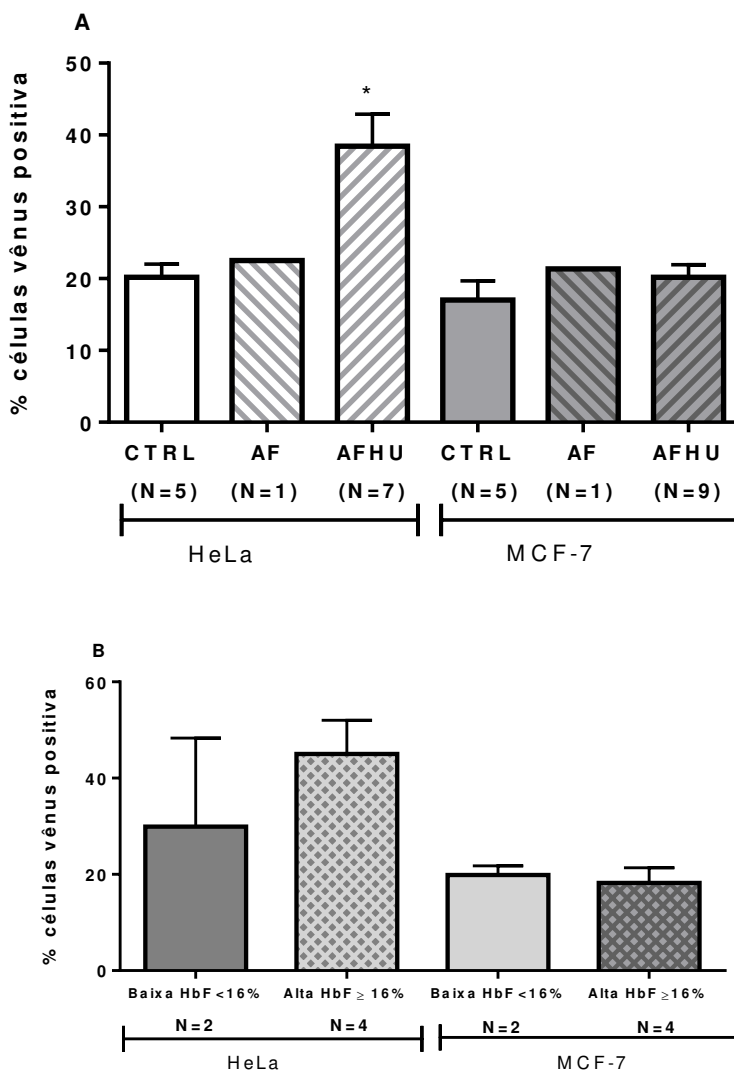


Figura 36. Associações entre a capacidade dos plasmas de indivíduos AF a induzir a dimerização de caspae-1 e o uso de terapia com HU e níveis de hemoglobina fetal. Associações entre o uso de terapia com hidroxiureia (HU) ou não (A) e níveis de hemoglobina fetal (% HbF) (B) com a capacidade do plasma de pacientes AF em induzir a dimerização de caspase-1 BiFC em células HeLa e MCF-7. * $p < 0,05$, ANOVA com múltiplas comparações, comparado ao efeito do plasma de controle (CTRL).

6.2.10. O efeito da hemopexina na dimerização de caspase-1 induzida por plasma AF em células MCF-7

Afim de verificar se o DAMP, heme, seja um dos componentes do plasma de indivíduos AF que induz a atividade de caspase-1 nas células MCF-7, observamos o efeito da co-incubação dessas células com a hemopexina (um “sequestrador” de heme) ao estimular a dimerização de caspase-1 com amostras de plasmas AF.

Células MCF-7 foram tratadas concomitantemente com o plasma AF e hemopexina nas concentrações de: 50, 100 e 250 nM. As células MCF-7 (1×10^5 células) foram plaqueadas 24 horas antes da transfecção em placas de 12 poços e foram transfectadas transitoriamente com os plasmídeos de caspase-1 denominados de C1-Pro VC (5 ng), C1-Pro VN (5 ng) e com o repórter (dsRed-mito (5 ng). Como controle positivo, algumas células foram transfectadas com C1-Pro VC, C1-Pro VN, dsRed-mito (5 ng), e também com um plasmídeo codificando ASC (125 ng). Todos os poços também foram incubados com QVD-OPH (5 μ M) para prevenir a morte celular. Após 24 horas, 10% (v/v) de pool de plasma de pacientes com AF (AF; N=2) e 50, 100 ou 250 nM de hemopexina foram adicionados às células MCF-7. Após 48 horas do início da transfecção, a porcentagem de células transfectadas que eram vênus positivas foram determinadas a partir de um mínimo de 100 células dsRed-mito positivas (contagem manual) por microscopia de fluorescência, e as imagens foram obtidas através da microscopia confocal. Como observado anteriormente, o plasma AF foi capaz de induzir a dimerização de caspase-1 nestas células, refletido pela porcentagem de células vênus positivas, enquanto a adição de hemopexina nas concentrações de 50 e 250 nM foi capaz de reduzir a porcentagem de células MCF-7 positivas para BiFC, embora não significativamente (Figura 37).

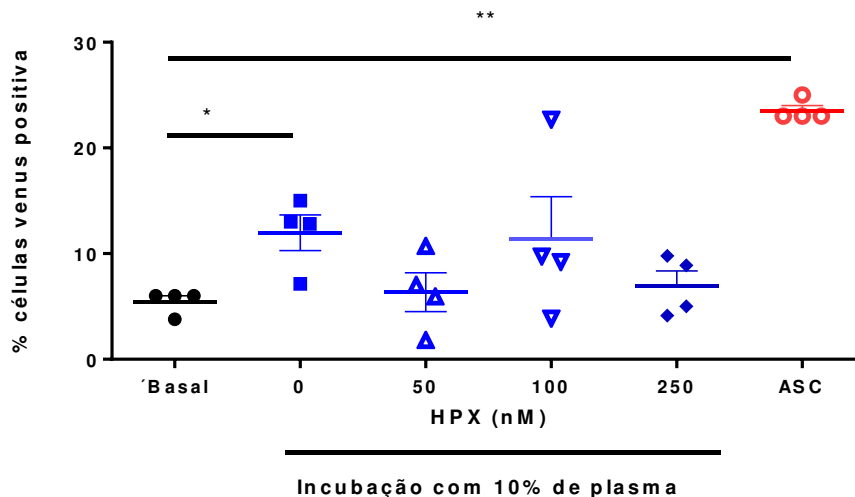


Figura 37. O efeito da hemopexina na dimerização de caspase-1 induzida por plasma AF em células MCF-7. As células MCF-7 foram transfectadas transitoriamente com C1-Pro VC (5ng), C1-Pro VN (5ng) e dsRed-mito (5 ng) com/sem um plasmídeo codificando ASC (controle positivo, 125 ng). Após 24 hrs da transfecção, 10% de plasma AF (AF, N=2) e/ou (50, 100 e 250 nM) de hemopexina (HPX), foram adicionados nas células, 24 horas depois, as células venus positivas foram determinadas a partir de um mínimo de 100 células positivas para dsRed-mito (contagem manual). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, quando comparado as células MCF-7 não tratadas, Kruskal Wallis com pós teste de Dunn's.

6.2.11. Avaliação da estimulação da dimerização de caspase-1 induzida por sobrenadante de neutrófilos em células HeLa

Para determinar se o conteúdo liberado no sobrenadante de neutrófilos, provenientes de indivíduos controles e AF, podem induzir a dimerização de caspase-1 em células HeLa transfectadas, os neutrófilos foram obtidos através da camada leucoplaquetária de controles saudáveis (CTRL; N=2) e de indivíduos AF (AF; N=2). Neutrófilos isolados (1×10^6 células/ml) foram estimulados (ou não) com LPS (sinal 1, 100 ng/ml), por 1,5 hr (37°C) e estimulados, ou não, com nigericina ($5 \mu\text{M}$) por mais 1,5 h (37°C , sinal 2). Os sobrenadantes celulares foram coletados para os ensaios. As células HeLa foram transitoriamente transfectadas com os plasmídeos de caspase-1, C1-Pro VC (5 ng) e C1-Pro VN (5 ng), e com o repórter (dsRed-mito (5 ng)). Como controle positivo, algumas células foram transfectadas com C1-Pro VC, C1-Pro VN, dsRed-mito (5 ng), e também com um plasmídeo codificando ASC (125 ng). Todos os poços também foram

incubados com QVD-OPH (5 μ M) para prevenir a morte celular. Após 24 horas, os sobrenadantes de neutrófilos controles (com/sem estímulo) foram adicionados aos poços com células HeLa (1:100). Após 48 horas do início da transfecção, a porcentagem de células transfectadas que eram vênus positivas foram determinadas a partir de um mínimo de 100 células dsRed-mito positivas (contagem manual) por microscopia de fluorescência, e as imagens foram obtidas através da microscopia confocal.

Os sobrenadantes de neutrófilos de controle (estimulados e/ou não estimulados) não induziram a liberação de IL-6 (dados não mostrados; a produção de IL-6 é estimulada pelo processamento de IL-1 β , via receptores de IL-1R) em células HeLa transfectadas com caspase-1. Sobrenadantes de neutrófilos controles estimulados com LPS, LPS + heme e LPS+ nigericina (estes capazes de agir como sinal 1 e/ou sinal 2 para a formação do inflamassoma), não induziram alterações significativas nas porcentagens de células HeLa positivas para caspase-1 (dados não mostrados). Em contraste, quando os sobrenadantes de neutrófilos AF (com/sem estímulo) foram adicionados aos poços com células HeLa (1:100), foi observada alguma modulação da ativação de caspase-1 (dados não mostrados), embora o N experimental tenha sido muito baixo para esta avaliação. Ao comparar diretamente os efeitos do sobrenadantes de neutrófilos CTRL e AF não tratados sobre a dimerização de caspase-1 em células HeLa transfectadas (Figura 38A), não foram encontradas diferenças significativas. No entanto, ao comparar diretamente os efeitos dos sobrenadantes de neutrófilos controles tratados com nigericina (sem LPS) com sobrenadantes de neutrófilos AF tratados com nigericina (Figura 38B), um aumento significativo na porcentagem de células vênus positivas foi observado para as células HeLa tratadas com sobrenadantes de neutrófilos AF estimulados com nigericina. Esses achados sugerem que os neutrófilos AF incubados com um estímulo inflamatório leva a liberação de moléculas capazes de induzir a dimerização de caspase-1.

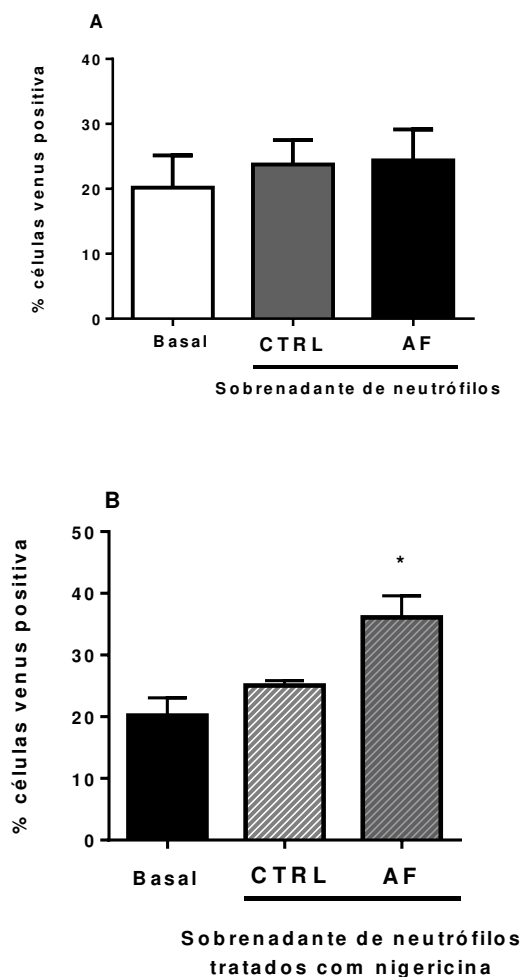


Figura 38. Avaliação da estimulação da dimerização de caspase-1 induzida por sobrenadante de neutrófilos em células HeLa. Neutrófilos (1×10^6 células/ml) provenientes de indivíduos controles (N=2) e de AF (N=2) foram estimulados com nigericina ($5 \mu\text{M}$) durante 1,5 hrs. Células HeLa foram transfectadas transitoriamente com C1-Pro VC (5ng), C1-Pro VN (5ng) e dsRed-mito (5 ng) com/sem plasmídeo codificando ASC (controle positivo, 125 ng). Após 24 horas, sobrenadantes de neutrófilos controles e/ou AF foram adicionados. Após 24 horas, as células vênus positivas foram determinadas a partir de um mínimo de 100 células positivas para dsRed-mito (contagem manual). Comparações entre os efeitos do sobrenadante de neutrófilos não tratados (A) ou tratados com nigericina (B). * $p < 0.05$, comparado com o grupo não-tratado (Kruskal Wallis com pós teste de Dunn's múltiplas comparações).

7. DISCUSSÃO

Os leucócitos são protagonistas chave em processos inflamatórios na doença falciforme por via de eventos que são controlados por uma gama de reguladores moleculares extracelulares que medeiam o recrutamento celular e mecanismos do controle inflamatório intracelular (140). A leucocitose é uma característica comum da anemia falciforme, em que o aumento da contagem de leucócitos tem sido associado a aumento da mortalidade, síndrome torácica aguda e acidente vascular cerebral (141), provavelmente devido ao papel que essas células desempenham nos processos vaso-oclusivos e a sua capacidade inata de contribuir para processos de estresse oxidativo e mecanismos inflamatórios, como a liberação de IL-1 β .

Nossos dados mostram um aumento significativo da IL-1 β e IL-18 na corrente sanguínea de indivíduos AF, indicativo de uma maior formação e ativação de complexos de inflamassomas nas células inflamatórias destes indivíduos. Assim sendo, investigamos a liberação dessas citocinas e a formação do complexo inflamassoma em neutrófilos e monócitos desses indivíduos. Os neutrófilos são células imunes inatas que rapidamente, e em grande número, podem alcançar tecidos infectados por patógenos. Como resultado, eles são considerados a primeira linha de defesa contra bactérias, fungos e vírus. Os neutrófilos têm muitas armas para erradicar agentes infecciosos incluindo a ativação da NADPH oxidase para produzir espécies de oxigênio (ROS) e liberação de proteínas antimicrobianas incluindo as serinas proteases. Além disso, os neutrófilos podem promover inflamação e a secreção de citocinas e quimiocinas. Em particular, devido ao seu grande número em comparação aos monócitos/macrófagos, os neutrófilos podem ser uma fonte relevante de IL-1 β (142). Muitos estudos indicam que os neutrófilos têm um papel importante na vaso-oclusão da AF; os neutrófilos aderem ao endotélio e formam agregados heterocelulares na circulação, reduzindo o fluxo sanguíneo e promovendo a vaso-oclusão. Adicionalmente, os neutrófilos estão em um estado ativado na AF e demonstram aumento da expressão da integrina $\alpha M\beta 2$ com propriedades adesivas aumentadas (143)(144)(145).

Nossos dados indicam que neutrófilos de indivíduos AF apresentam uma maior liberação de IL-1 β clivada do que neutrófilos de indivíduos saudáveis. Em seguida, técnicas de citometria de fluxo (com e sem imagens) demonstraram uma maior ativação da molécula efetora caspase-1, que intermedia o processamento e clivagem de IL-1 β em neutrófilos AF. Sabe-se que o inflamassoma melhor elucidado, até o momento, é o inflamassoma do tipo NLRP3 e que para a sua organização clássica é necessária a participação de uma molécula adaptadora, denominada ASC. Nos últimos anos, surgiu a descrição de dois mecanismos não mutuamente exclusivos, responsáveis pelo processamento e secreção de IL-1 β pelos neutrófilos. Greten et al (146) propôs pela primeira vez a maturação e secreção dessa citocina, através das serinas proteases e estudos subsequentes reconheceram o papel do inflamassoma nesse processo. No entanto, alguns estudos mais recentes sugerem que essa formação possa ocorrer por diferentes vias de sinalização, como por exemplo: através da ativação do inflamassoma pela via canônica (via clássica) ou através do inflamassoma pela via não-canônica (147). Sabe-se que para formação do inflamassoma não-canônico ocorrer é necessário a invasão do citosol das células por bactérias gram-negativas, que tem como função a ativação de caspase-4, que por sua vez, consegue ativar pró-caspase 1 para sua forma ativa. Assim, a caspase-1 quando ativa, cliva proteolicamente pró-IL 1 β (150).

Com o intuito de entender o mecanismo de ativação de caspase-1 em neutrófilos AF, utilizamos a microscopia confocal e citometria com imagem para avaliar a presença da oligomerização de ASC nestas células. Não foi possível observar a presença de ASC na forma oligomerizada em neutrófilos AF, adicionalmente, apesar de encontrar uma interação entre ASC e a pró-caspase-1 em neutrófilos provenientes de indivíduos AF, utilizando a técnica de imunoprecipitação, não encontramos um aumento no número de células apresentando uma co-localização de ASC com caspase-1 clivada. Para confirmação dos dados, utilizamos o inibidor da oligomerização de ASC, CAPE, o qual não inibiu a liberação de IL-1 β em neutrófilos AF (mas inibiu a liberação em monócitos AF). Assim sendo, nossos dados sugerem que o inflamassoma que ocorre em neutrófilos AF, é um tipo de inflamassoma atípico, o qual não depende do recrutamento da molécula ASC para a clivagem de caspase-1. Concomitantemente com os dados encontrados no nosso trabalho, estudos recentes mostraram que, em neutrófilos de murino estimulados

com LPS e nigericina, o adaptador ASC é expresso em níveis mais baixos nos neutrófilos em comparação com os macrófagos, indicando que os neutrófilos ativados formam níveis menores do complexo multiproteico do inflamassoma (132)(148). Outro estudo realizado por Bakele et al, (149) demonstrou que em neutrófilos humanos, a molécula adaptadora ASC pode ser armazenada em vesículas e que os neutrófilos podem expressar todos os componentes necessários para formação do inflamassoma, sendo capazes de regular dinamicamente a formação do inflamassoma entre as vesículas secretoras e a fusão dessas vesículas com a membrana plasmática. Porém, o mecanismo subcelular pelos quais os componentes do inflamassoma em vesículas secretoras e grânulos terciários poderiam interagir e processar IL-1 β , permanecem indescritíveis.

Os neutrófilos expressam uma ampla variedade de PRRs (150). No entanto, a expressão e função potencial da maioria dos NLRs em neutrófilos ainda não está bem elucidada (150). Um estudo (151), avaliou a expressão gênica de todos os 22 membros da família NLR em neutrófilos e foi possível encontrar um aumento na expressão gênica dos genes *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRP6*, *NLRP12* e *NLRC4* em comparação a macrófagos. Os sensores NLRs medeiam o reconhecimento de PAMPs (durante infecções bacterianas, virais, fúngicas e protozoárias) e/ou DAMPs (liberados durante dano celular). Cada sensor identifica ligantes específicos para iniciar a montagem da maquinaria do inflamassoma, por exemplo, o inflamassoma NLRP3 responde a uma ampla gama de PAMPs e DAMPs, incluindo os produtos da hemólise (74); o sensor NLRP1 identifica a toxina letal do antraz produzida por *Bacillus anthracis* e o inflamassoma NLRC4 é ativado por flagelina, *S. Typhimurium*, *B. pseudomallei* e *E. coli* (109)(86).

Dado os processos de inflamação estéril que caracterizam a AF, avaliamos a participação do receptor NLRP3 na formação de inflamassoma em neutrófilos AF. Para isso, incubamos neutrófilos de indivíduos AF com um inibidor seletivo de NLRP3 e observamos que não houve redução na liberação da IL-1 β , comprovando que o inflamassoma que ocorre em neutrófilos AF não depende desse receptor. Ao longo do nosso estudo tentamos identificar um possível candidato para o receptor envolvido nesse inflamassoma, utilizamos a técnica de PCR real time, mas não encontramos aumento na

expressão gênica de nenhum dos NLRs em neutrófilos AF, assim não conseguimos identificar um possível candidato para um PRR que possa estar intermediando a formação do inflamassoma em neutrófilos AF. No entanto, é possível que a caracterização da expressão proteica de múltiplos PRRs, por Western Blotting ou técnica similar, poderá identificar um possível candidato a um PRR e a participação da formação do inflamassoma no processamento de IL-1 β em neutrófilos AF.

Assim, com os dados apresentados neste estudo, formamos a hipótese que, em neutrófilos de indivíduos portadores de AF, existe a formação de um inflamassoma atípico (o qual não requer ASC) e não depende do receptor NLRP3 (Figura 39). Sabe-se que grande parte dos indivíduos acometidos com AF apresentam infecções secundárias, e alterações no microbiota intestinal (165), bem como o aumento de outras moléculas inflamatórias como a S100A8 (158) o que poderia desencadear um sinal de priming para a formação de inflamassomas alternativos em neutrófilos. Podemos também sugerir que o processamento de IL-1 β que acontece em neutrófilos de indivíduos AF, pode ser regulado pela via não-canônica (provavelmente sem a necessidade de um sensor PRR específico e possivelmente com o envolvimento de caspase-4). Trabalhos futuros nos indicaram qual a via de ativação que está sendo modulada nestas células.

Em monócitos, a secreção de IL-1 β depende da ativação do inflamassoma (152). O NOD-like receptor (NLRP3), a proteína adaptadora ASC e a proteína efetora caspase-1, constituem assim o complexo melhor estudado e caracterizado até o momento em monócitos. Em monócitos humanos, três vias de ativação do inflamassoma NLRP3 foram relatadas, a via canônica, via não-canônica e estudos recentes mostraram que o LPS sozinho, pode desencadear a ativação de uma via alternativa de formação do inflamassoma NLRP3 em monócitos humanos. Este inflamassoma alternativo envolve a proteína RIPK1- FADD e caspase-8, ocorrendo a sinalização e a formação do inflamassoma NLRP3, porém essa via de ativação não leva a morte celular por *pyroptosis* (153)(154)(155). Assim, os mecanismos que levam a secreção de IL-1 β por monócitos vem sendo extensivamente estudados por diferentes grupos com foco em inflamassomas. Nosso estudo demonstrou o aumento de diferentes DAMPs na circulação de indivíduos AF e que estes podem ser reconhecidos pelos receptores

envolvidos na formação do inflamassoma e também notamos o aumento da citocina TNF- α , que tem efeito conhecido na via de sinalização de NF κ B, indicando que esta via de sinalização pode ter um papel na organização dos inflamassomas (156).

Avaliamos a ativação de caspase-1 em monócitos AF e encontramos um aumento significativo dessa ativação em monócitos não-clássicos (também denominados de monócitos inflamatórios) de indivíduos portadores de AF quando comparados aos monócitos do grupo CTRL. Também identificamos um aumento significativo da oligomerização da molécula adaptadora ASC na subpopulação de monócitos não-clássicos AF quando comparado aos CTRL. Os dados encontrados em monócitos AF indicam que há a formação do inflamassoma NLRP3 pela via canônica. Para comprovar estes achados, incubamos os monócitos AF com o inibidor de NLRP3 (MCC950) e dosamos a liberação de IL-1 β no sobrenadante e foi possível visualizar uma diminuição na liberação dessa citocina, também utilizamos um inibidor de caspase-1 (YVAD) e com este, também conseguimos detectar baixos níveis de IL-1 β . Por fim, utilizamos o inibidor BAY-117082, pois vários estudos demonstram que esse inibidor age na formação do inflamassoma NLRP3 através da via de MYD88 (157), e comprovamos com o uso desse inibidor uma redução drástica na liberação de IL-1 β nestas células. Para ocorrência da formação de inflamassomas NLRP3 pela via canônica, é necessário o reconhecimento de dois sinais. O sinal 1 para o processamento de pró-IL-1 β , que pode ser através de moléculas estéreis (como por exemplo a alarmina S100A8). Trabalhos recentes do nosso grupo, comprovam que indivíduos portadores de AF possuem um aumento dessa alarmina na corrente sanguínea (158); esta molécula pode ser reconhecida via TLR4, regulando positivamente a expressão gênica (NLRP3 e pró-IL-1 β) (159). O sinal 2 pode ocorrer através da sinalização de DAMPs, que são liberados quando temos o processo de hemólise e isquemia-reperfusão nos indivíduos AF. Os DAMPs, por sua vez são reconhecidos pelo receptor NLRP3 e assim temos a formação do inflamassoma em monócitos (Figura 40). Assim mostramos com este trabalho, que leucócitos de indivíduos portadores de AF formam inflamassomas distintos

Nossos dados indicam que apesar de encontrar a formação da inflamassoma em monócitos AF (particularmente do tipo clássico) a liberação de IL-1 β por monócitos em

indivíduos portadores de AF provavelmente não tem grande influência no aumento nas concentrações de IL-1 β e IL-18 encontradas na corrente sanguínea dos mesmos. Esta conclusão se deve ao fato de não ter encontrado mudanças significativas na liberação de IL- β e IL-18 em populações misturadas de monócitos de indivíduos AF, no entanto mudanças nos números de monócitos não clássicos em pacientes AF podem contribuir para concentrações circulantes destas citocinas. Estudos recentes mostraram que monócitos de indivíduos portadores de gota também não apresentaram aumento significativo na secreção de IL-1 β , quando comparado com monócitos de indivíduos saudáveis, e que uma ativação de processamento só foi possível quando estes monócitos foram estimulados com Pam3 (agonista de TLR1/2), sugerindo que estes monócitos possuem uma pré-sensibilização para caspase-1 ativa e que por isso apenas após estímulo do Pam3 foi possível observar a secreção de IL-1 β (160).

Dado que o plasma de indivíduos AF se caracteriza como extremamente inflamatório, devido aos inúmeros DAMPs presentes nesse meio circulante. Avaliamos a capacidade do plasma de indivíduos AF em ativar a formação de inflamassomas em células saudáveis. Primeiramente, realizamos este experimento em células imunes (neutrófilos) de indivíduos CTRL e observamos que este plasma foi capaz de aumentar a ativação de caspase-1 e a produção de IL-1 β . Porém como as técnicas para avaliação da ativação de caspase-1 ainda são pouco tecnológicas, empregamos a técnica BiFC, desenvolvida pelo laboratório da Dr. Bouchier-Hayes (Houston-TX), para investigar a capacidade do meio circulante e neutrófilos de indivíduos portadores de AF para ativar caspases inflamatórias através da dimerização por proximidade induzida. Dado que a técnica BiFC poderia ser usada para facilitar a análise específica de interações de caspases no nível da plataforma de ativação para fornecer informações sobre a organização estrutural e a localização de plataformas de ativação em células vivas (131)(161), este ensaio foi utilizado para investigar a dimerização da caspase-1 em células não-imunes HeLa e células MCF-7 na presença/ausência de plasma e sobrenadantes de neutrófilos (estimulados ou não) de indivíduos controles e indivíduos portadores de AF. Nossos dados ilustram, pela primeira vez, que o plasma proveniente de indivíduos portadores de AF aumenta a dimerização de caspase-1 nestas células (células HeLa e MCF-7) quando transfectadas com plasmídeo específico para caspase-

1. Em contraste, o plasma de indivíduos controles não induziu a dimerização de caspase-1 em células HeLa transfectadas. Assim, nosso trabalho demonstrou que numerosos DAMPs são encontrados na corrente sanguínea de indivíduos AF e que estes DAMPs são capazes de estimular a dimerização da caspase-1 em células que expressam essas caspases inflamatórias.

Essa dimerização da caspase-1 permite que as células que expressam IL-1 β imatura processem essa citocina, com importantes efeitos inflamatórios. Curiosamente, a dimerização da caspase-1 em resposta ao plasma de indivíduos AF pode ser ligeiramente mais eficiente nas células HeLa - pelo menos um efeito mais aparente do plasma AF foi observado quando comparado ao plasma controle. Estes resultados indicam que a presença da expressão de proteínas necessárias para a maquinaria do inflamassoma incluindo a proteína ASC e receptores NLR, tais como NLRP3 (expressos em células HeLa (136), mas não em células MCF-7 (139)(162), podem ser importantes para promover a eficiente dimerização da caspase-1.

Embora não tenha sido possível identificar o componente (ou componentes) presentes no plasma AF que induz a dimerização da casase-1, dados preliminares mostram que a proteína de ligação ao heme, a hemopexina (12), conseguiu inibir parcialmente os efeitos do plasma AF na dimerização de caspase-1 em células MCF-7 transfectadas. Esses dados sugerem que o heme livre elevado, um produto da hemólise, conhecido por estar elevado no plasma de indivíduos portadores de AF (163)(158), pode contribuir particularmente para as propriedades inflamatórias do meio circulante AF.

Embora estes achados sejam preliminares, descobrimos que enquanto sobrenadantes de neutrófilos CTRL (estimulados e não estimulados) não induzem a dimerização de caspase-1 em células HeLa, o sobrenadante de neutrófilos AF estimulados com nigericina (uma molécula de sinal 2) parece apresentar a capacidade de aumentar a dimerização da caspase-1 em células HeLa. Os dados podem indicar que os neutrófilos de indivíduos AF circulam em um estado inicial e que sua estimulação com uma segunda molécula de sinalização pode induzir a produção e a secreção de moléculas que são capazes de induzir a dimerização da caspase-1 nas células vizinhas. Os neutrófilos de pacientes AF utilizados no presente estudo foram obtidos de pacientes

submetidos a aférese regular, um processo que pode modular o estado clínico e inflamatório dos pacientes.

Assim, este estudo empregou um novo ensaio molecular para determinar a capacidade indutora de dimerização de caspase-1 do meio circulante de indivíduos AF em células não imunes transfectadas. Dados preliminares indicam que o plasma e as liberações de neutrófilos de indivíduos AF são de fato extremamente inflamatórias e capazes de induzir a dimerização e ativação desta enzima proteolítica em células vizinhas que expressam esta caspase.

Em resumo, apresentamos dados inéditos que comprovam que neutrófilos de indivíduos AF apresentam um processamento acelerado de IL-1 β e isto pode ter uma importância muito grande na fisiopatologia da AF. Interessantemente, o processamento dessa citocina parece não ser mediado pela formação clássica do inflamassoma NLRP3 e também não há a necessidade do recrutamento de ASC neste processamento. Portanto, uma via não clássica parece modular a formação deste inflamassoma em neutrófilos AF e que surpreendentemente, essas células são capazes de organizar um determinado tipo de inflamassoma dependendo do ligante, o que pode estar totalmente relacionado com a patologia em questão. Observamos também a formação do inflamassoma em monócitos AF, porém podemos notar que neste tipo celular temos o processamento de IL-1 β , mas não encontramos diferenças significativas na sua liberação para o meio extracelular. Este inflamassoma parecer ser mediado pela forma clássica do NLRP3 e que neste caso há a necessidade do recrutamento da molécula ASC para ativação de caspase-1. Neste trabalho, também foi possível observar que o meio circulante destes pacientes foi capaz de ativar a maquinaria de inflamassomas em células não-imunes. Os produtos da hemólise, incluindo o heme, podem contribuir para os componentes inflamatórios do plasma na AF. A identificação dos principais alvos moleculares poderia fornecer novas perspectivas para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para reduzir o estado inflamatório na AF e, portanto, limitar a inflamação vascular e os processos vaso-oclusivos que causam muitas das complicações da doença. O processamento e aumento de IL-1 β na AF pode contribuir de forma muito significativa para a amplificação da resposta inflamatória nestes pacientes

(2)(49)(51). Estudos *in vivo* com os inibidores de IL-1 β e inibidores dos componentes do inflamassoma seria uma opção para o descobrimento de novos tratamentos para essa doença.

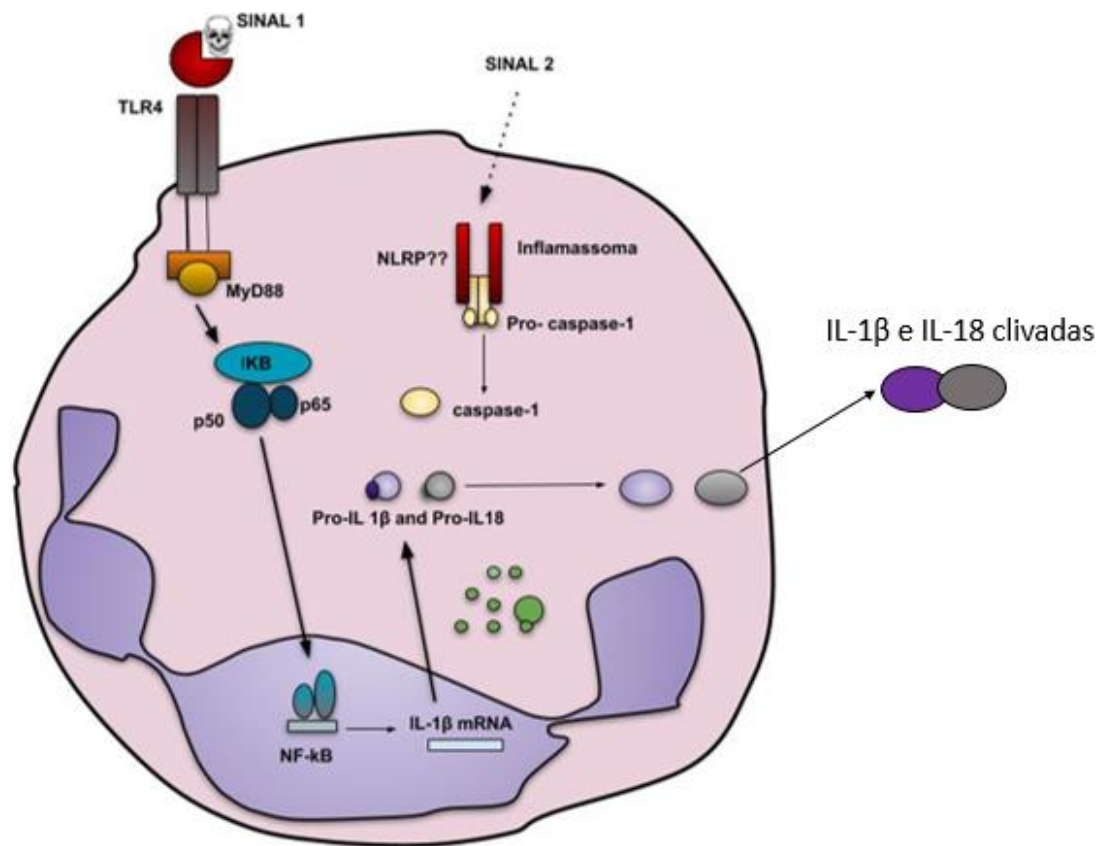


Figura 39. Modelo proposto para ativação de inflamassoma atípico e liberação de IL-1 β em neutrófilos AF. O sinal 1 induz a expressão gênica de pró-IL1 β , através de moléculas não estéreis (PAMPs) ou moléculas estereis que podem ser reconhecidas via TLR4, regulando positivamente a expressão gênica (do sensor e pró-IL-1 β). O sinal 2 pode ocorrer através dos DAMPs. Os DAMPs, por sua vez são reconhecidos pelo receptor NLR que recruta diretamente pró-caspase-1, sem a necessidade do recrutamento da molécula adaptadora ASC. ASC por sua vez, se encontra em vesículas no citosol da célula (em verde), sem necessidade de oligomerização. A dimerização e ativação da caspase-1 leva a clivagem proteolítica de pró-IL-1 β para sua forma ativa IL-1 β e liberação para o meio extracelular.

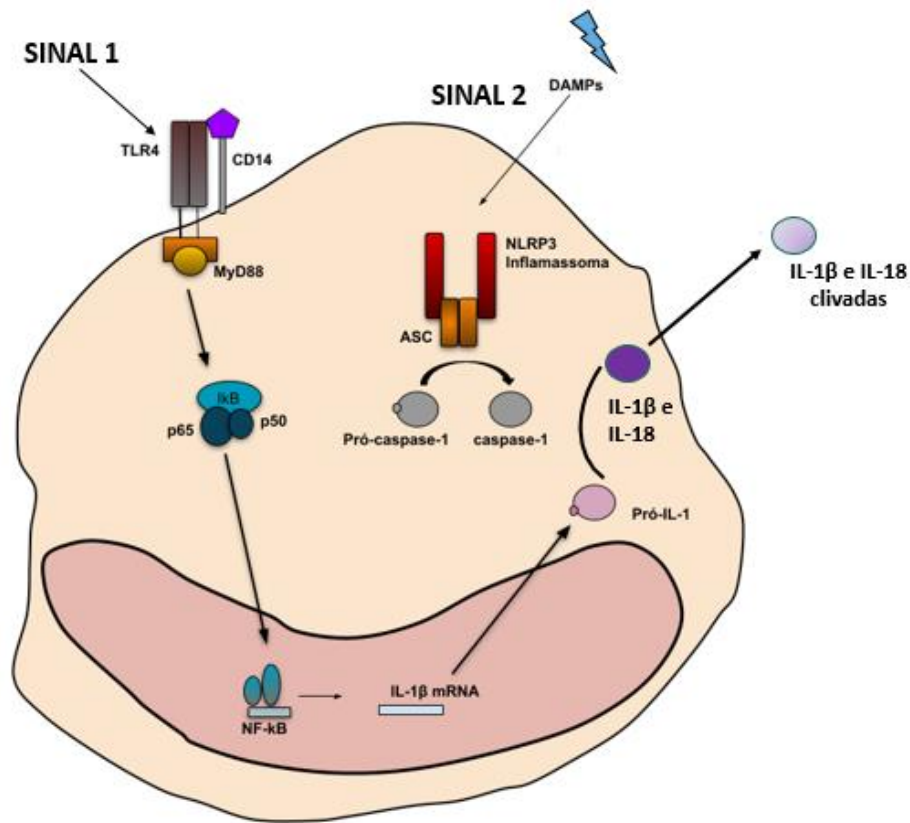


Figura 40. Modelo proposto para ativação clássica de inflamassoma NLRP3 e processamento de IL-1 β em monócitos AF. Para formação do inflamassoma NLRP3 pela via canônica, é necessário o reconhecimento de dois sinais. O sinal 1 para o processamento de pró-IL-1 β , pode ser através de moléculas estéreis (como por exemplo a alarmina S100A8) que pode ser reconhecida via TLR4, regulando positivamente a expressão gênica (NLRP3 e pró-IL-1 β). O sinal 2 pode ser através dos DAMPs, que são liberados quando temos o processo de hemólise e isquemia/reperfusão nos indivíduos AF. Os DAMPs, por sua vez são reconhecidos pelo receptor NLRP3 que recruta a molécula adaptadora ASC para o complexo e assim a ativação de caspase-1 e a clivagem proteolítica de pró-IL-1 β em sua forma bioativa IL-1 β .

8. CONCLUSÕES

- Neutrófilos AF apresentam um processamento acelerado de IL-1 β ;
- Dado o número aumentado de neutrófilos na circulação sanguínea de indivíduos AF, o processamento de IL-1 β pode ter uma importância clínica significativa na fisiopatologia da AF;
- Este processamento de IL-1 β nos neutrófilos AF parece não ser mediado pela formação clássica do inflamassoma NLRP3;
- Adicionalmente, dados indicam que também não há a participação da molécula adaptadora ASC neste processamento nos neutrófilos AF;
- Portanto, uma via não-clássica de inflamassoma ou ativação de caspase-1 aparenta ser ativada em neutrófilos AF;
- Surpreendentemente, essas células são capazes de organizar diferentes tipos de inflamassoma, que pode depender dos DAMPs (ou até PAMPs) presentes e que pode estar totalmente relacionado com a patologia em questão;
- Existe a formação da forma clássica do inflamassoma NLRP3, com envolvimento da molécula ASC, em monócitos AF. No entanto estas células não demonstram alterações significativas na sua liberação de IL-1 β e IL-18 para o meio extracelular;
- Alterações no número circulantes de monócitos (especialmente do tipo não clássicos) podem contribuir para o aumento de IL-1 β e IL-18 em pacientes portadores de AF;
- O meio circulante de pacientes AF contém vários DAMPs potentes e demonstra a capacidade de ativar a maquinaria do inflamassoma em neutrófilos e em células não-imunes.

9. REFERÊNCIAS

1. Bunn HF. Pathogenesis and Treatment of Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*. 1997;
2. Kato, Gregory J., Piel Frederic B., Reid, Clarice, D., Gaston, Marilyn H., Ohene-Frempong, Kwaku., Krishnamurti, Lakshmanan., Smith R, Wally., Panepinto, Julie A., Weatherall, David J., Costa, Fernando F., Vichinsky EP. Sickle cell disease. *Nat Rev Dis Prim*. 2018;4:18010.
3. Eaton WA, Hofrichter J. Hemoglobin S gelation and sickle cell disease. *Blood*. 1987;
4. Brittenham GM, Schechter AN, Noguchi CT. Hemoglobin S polymerization: primary determinant of the hemolytic and clinical severity of the sickling syndromes. *Blood*. 1985;
5. Stuart, M.J.; Nagel R. Sickle-cell disease. *Lancet*. 2004;364(9442):1343–60.
6. Costa, Fernando Ferreira., Conran N., Fertrin KY. Anemia Falciforme. In: *Tratado de hematologia*. 2013. p. 205–23.
7. Steinberg MH. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. *TheScientificWorldJournal*. 2009.
8. Nagel RL, Fabry ME, Steinberg MH. The paradox of hemoglobin SC disease. *Blood Reviews*. 2003.
9. Lervolino LG, Baldin PEA, Picado SM, Calil KB, Viel AA, Campos LAF. Prevalence of sickle cell disease and sickle cell trait in national neonatal screening studies. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2011;
10. Steinberg MH. Overview of Sickle Cell Anemia Pathophysiology. In: *Sickle cell anemia*. 2016. p. 49–73.
11. 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;
12. 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;
13. Almeida CB, Souza LEB, Leonardo FC, Costa FTM, 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;
14. Reiter CD, Gladwin MT. An emerging role for nitric oxide in sickle cell disease vascular homeostasis and therapy. *Current Opinion in Hematology*. 2003.
15. Gladwin MT, Kato GJ, Weiner D, Onyekwere OC, Dampier C, Hsu L, et al. Nitric oxide for inhalation in the acute treatment of sickle cell pain crisis: A randomized controlled trial. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2011;
16. Lanaro C, Franco-Penteado CF, Albuquerque DM, Saad STO, Conran N, Costa FF. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. *J Leukoc Biol*. 2009;

17. Wood KC, Hsu LL, Gladwin MT. Sick cell disease vasculopathy: A state of nitric oxide resistance. *Free Radic Biol Med*. 2008;44(8):1506–28.
18. Turhan A, Weiss LA, Mohandas N, Collier BS, Frenette PS. Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: A new paradigm. *Proc Natl Acad Sci*. 2002;
19. Assis A, Conran N, Canalli AA, Lorand-Metze I, Saad STO, Costa FF. Effect of cytokines and chemokines on sickle neutrophil adhesion to fibronectin. *Acta Haematol*. 2005;
20. Dominical VM, Samse L, Nichols JS, Costa FF, McCoy JP, Conran N, et al. Prominent role of platelets in the formation of circulating neutrophil-red cell heterocellular aggregates in sickle cell anemia. *Haematologica*. 2014.
21. Hyacinth HI, Adams RJ, Voeks JH, Hibbert JM, Gee BE. Frequent red cell transfusions reduced vascular endothelial activation and thrombogenicity in children with sickle cell anemia and high stroke risk. *Am J Hematol*. 2014;
22. Hyacinth HI, Adams RJ, Greenberg CS, Voeks JH, Hill A, Hibbert JM, et al. Effect of chronic blood transfusion on biomarkers of coagulation activation and thrombin generation in sickle cell patients at risk for stroke. *PLoS One*. 2015;
23. Kelly S, Quirolo K, Marsh A, Neumayr L, Garcia A, Custer B. Erythrocytapheresis for chronic transfusion therapy in sickle cell disease: survey of current practices and review of the literature. *Transfusion*. 2016.
24. Romero Z, Urbinati F, Geiger S, Cooper AR, Wherley J, Kaufman ML, et al. β -globin gene transfer to human bone marrow for sickle cell disease. *J Clin Invest*. 2013;
25. Yawn BP, Buchanan GR, Afenyi-Annan AN, Ballas SK, Hassell KL, James AH, et al. Management of sickle cell disease: Summary of the 2014 evidence-based report by expert panel members. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2014.
26. Wang WC, Ware RE, Miller ST, Iyer R V., Casella JF, Minniti CP, et al. Hydroxycarbamide in very young children with sickle-cell anaemia: A multicentre, randomised, controlled trial (BABY HUG). *Lancet*. 2011;
27. Opoka RO, Ndugwa CM, Latham TS, Lane A, Hume HA, Kasirye P, et al. Novel use Of Hydroxyurea in an African Region with Malaria (NOHARM): a trial for children with sickle cell anemia. *Blood*. 2017;130(24):2585–93.
28. Torres L, Conran N. Emerging pharmacotherapeutic approaches for the management of sickle cell disease. *Expert Opin Pharmacother* [Internet]. Taylor & Francis; 2018;00(00):1–14. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14656566.2018.1548610>
29. Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, Barton FB, Eckert S V, et al. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *N Engl J Med*. 1995;
30. Steinberg MH, Brugnara C. Pathophysiological-Based Approaches to Treatment of Sickle Cell Disease. *Annu Rev Med*. 2003;
31. Nevitt SJ, Jones AP, Howard J. Hydroxyurea (hydroxycarbamide) for sickle cell disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2017.
32. Yarbo JW. Mechanism of Action of Hydroxyurea. *Semin Oncol*. 1992;

33. King SB. Nitric oxide production from hydroxyurea. *Free Radical Biology and Medicine*. 2004.
34. 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;
35. Wilmore DW. Food and Drug Administration Approval of Glutamine for Sickle Cell Disease: Success and Precautions in Glutamine Research. *J Parenter Enter Nutr* [Internet]. 2017;41(6):912–7. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0148607117727271>
36. Niihara Y, Miller ST, Kanter J, Lanzkron S, Smith WR, Hsu LL, et al. A Phase 3 Trial of <sc>l</sc>-Glutamine in Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*. 2018;
37. Piccin A., Murphy C., Eakins E., Rondinelli M., Daves M., Vecchiato C., Wolf D., Mc Mahon C. SO. Insight into the complex pathophysiology of sickle cell anemia and possible treatment. *Eur J Haematol*. 2019;
38. Metcalf B, Chuang C, Dufu K, Patel MP, Silva-Garcia A, Johnson C, et al. Discovery of GBT440, an Orally Bioavailable R-State Stabilizer of Sickle Cell Hemoglobin. *ACS Med Chem Lett*. 2017;8(3):321–6.
39. Okpala I. Investigational selectin-targeted therapy of sickle cell disease. *Expert Opin Investig Drugs* [Internet]. 2015;24(2):229–38. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/13543784.2015.963552>
40. Ataga KI, Kutlar A, Kanter J, Liles D, Cancado R, Friedrisch J, et al. Crizanlizumab for the Prevention of Pain Crises in Sickle Cell Disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2017;376(5):429–39. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1611770>
41. Shen H, Kreisel D, Goldstein DR. Processes of Sterile Inflammation. *J Immunol* [Internet]. 2013;191(6):2857–63. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1301539>
42. Medzhitov R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell*. 2010.
43. Ginhoux F, Jung S. Monocytes and macrophages: Developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature Reviews Immunology*. 2014.
44. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*. 2006;
45. Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: Sensing and reacting to damage. *Nature Reviews Immunology*. 2010.
46. Land W. Chronic allograft dysfunction: A model disorder of innate immunity. *Biomed J* [Internet]. 2013;36(5):209. Available from: http://biomedj.cgu.edu.tw/pdfs/2013/36/5/images/BiomedJ_2013_36_5_209_117622.pdf
47. Manwani D, Frenette PS. Vaso-occlusion in sickle cell disease: pathophysiology and novel targeted therapies. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology*. American Society of Hematology. Education Program. 2013.
48. Kato GJ, Steinberg MH, Gladwin MT. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. *Journal of Clinical Investigation*. 2017.

49. Hebbel RP. Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. *Journal of Clinical Investigation*. 1997.
50. Zhang D, Xu C, Manwani D, Frenette PS. Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. *Blood*. 2016.
51. Setty BN, Stuart MJ. Vascular cell adhesion molecule-1 is involved in mediating hypoxia-induced sickle red blood cell adherence to endothelium: potential role in sickle cell disease. *Blood*. 1996;
52. Kaul DK, Hebbel RP. Hypoxia/reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice. *J Clin Invest*. 2000;106(3):411–20.
53. Sundd P, Gladwin MT, Novelli EM. Pathophysiology of Sickle Cell Disease - Elsevier Medical Artwork. 2018;(October):261–90. Available from: <http://www.elsevierimages.com/image/60325.htm>
54. Eltzschig K.H. ET. Ischemia and Reperfusion From Mechanism to Translation. 2014;3(1):3235–44.
55. Polanowska-Grabowska R, Wallace K, Field JJ, Chen L, Marshall MA, Figler R, et al. P-selectin-mediated platelet-neutrophil aggregate formation activates neutrophils in mouse and human sickle cell disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;
56. Belcher JD. Critical role of endothelial cell activation in hypoxia-induced vasoocclusion in transgenic sickle mice. *AJP Hear Circ Physiol*. 2005;
57. Belcher JD, Bryant CJ, Nguyen J, Bowlin PR, Kielbik MC, Bischof JC, et al. Transgenic sickle mice have vascular inflammation. *Blood*. 2003;
58. Wagner MC, Eckman JR, Wick TM. Sickle cell adhesion depends on hemodynamics and endothelial activation. *J Lab Clin Med*. 2004;
59. Ballas SK, Lusardi M. Hospital readmission for adult acute sickle cell painful episodes: Frequency, etiology, and prognostic significance. *Am J Hematol*. 2005;
60. Brousse V, Buffet P, Rees D. The spleen and sickle cell disease: The sick(led) spleen. *British Journal of Haematology*. 2014.
61. Ataga KI, Brittain JE, Moore D, Jones SK, Hulkower B, Strayhorn D, et al. Urinary albumin excretion is associated with pulmonary hypertension in sickle cell disease: Potential role of soluble fms-like tyrosine kinase-1. *Eur J Haematol*. 2010;
62. Hebbel RP. Ischemia-reperfusion injury in sickle cell anemia: Relationship to acute chest syndrome, endothelial dysfunction, arterial vasculopathy, and inflammatory pain. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 2014.
63. Minniti CP, Delaney KMH, Gorbach AM, Xu D, Lee CCR, Malik N, et al. Vasculopathy, inflammation, and blood flow in leg ulcers of patients with sickle cell anemia. *Am J Hematol*. 2014;
64. Nath KA, Hebbel RP. Sickle cell disease: Renal manifestations and mechanisms. *Nat Rev Nephrol*. 2015;
65. Andreotti C, King AA, Macy E, Compas BE, DeBaun MR. The Association of Cytokine Levels with Cognitive Function in Children with Sickle Cell Disease and Normal MRI Studies of the Brain. *J Child Neurol*. 2015;

66. De Montalembert M, Wang W. Cerebrovascular complications in children with sickle cell disease. *Handb Clin Neurol*. 2013;
67. Van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2018.
68. Quinn CT, Smith EP, Arbabi S, Khera PK, Lindsell CJ, Niss O, et al. Biochemical surrogate markers of hemolysis do not correlate with directly measured erythrocyte survival in sickle cell anemia. *Am J Hematol*. 2016;
69. Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, Hogg N, Cannon RO, Schechter AN, et al. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med*. 2002;
70. Schaer DJ, Buehler PW. Cell-free hemoglobin and its scavenger proteins: New disease models leading the way to targeted therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(6):1–18.
71. Camus SM, De Moraes JA, Bonnin P, Abbyad P, Le Jeune S, Lionnet F, et al. Circulating cell membrane microparticles transfer heme to endothelial cells and trigger vasoocclusions in sickle cell disease. *Blood*. 2015;
72. Figueiredo RT, Fernandez PL, Mourao-Sa DS, Porto BN, Dutra FF, Alves LS, et al. Characterization of heme as activator of toll-like receptor 4. *J Biol Chem*. 2007;282(28):20221–9.
73. 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 [Internet]*. 2014;111(39):E4110–8. Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1405023111>
74. Mendonça R, Silveira AAA, Conran N. Red cell DAMPs and inflammation. *Inflamm Res*. 2016;65(9):665–78.
75. 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;
76. Alemán OR, Mora N, Cortes-Vieyra R, Uribe-Querol E, Rosales C. Differential Use of Human Neutrophil Fc γ Receptors for Inducing Neutrophil Extracellular Trap Formation. *J Immunol Res*. 2016;
77. Zhong H, Yazdanbakhsh K. Hemolysis and immune regulation. *Current Opinion in Hematology*. 2018.
78. Idzko M, Ferrari D, Riegel AK, Eltzschig HK. Extracellular nucleotide and nucleoside signaling in vascular and blood disease. *Blood*. 2014.
79. Idzko M, Ferrari D, Eltzschig HK. Nucleotide signalling during inflammation. *Nature*. 2014.
80. Field JJ, Nathan DG, Linden J. The role of adenosine signaling in sickle cell therapeutics. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 2014.
81. Zhang Y, Dai Y, Wen J, Zhang W, Grenz A, Sun H, et al. Detrimental effects of adenosine signaling in sickle cell disease. *Nat Med*. 2011;
82. Van Golen RF, Reiniers MJ, Olthof PB, van Gulik TM, Heger M. Sterile inflammation in hepatic ischemia/reperfusion injury: Present concepts and potential therapeutics. *J*

- Gastroenterol Hepatol. 2013;28(3):394–400.
83. Moreth K, Iozzo R V., Schaefer L. Small leucine-rich proteoglycans orchestrate receptor crosstalk during inflammation. *Cell Cycle*. 2012.
 84. Sachet M, Liang YY, Oehler R. The immune response to secondary necrotic cells. *Apoptosis* [Internet]. Springer US; 2017;22(10):1189–204. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10495-017-1413-z>
 85. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010;140(6):805–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>
 86. Amarante-Mendes GP, Adjemian S, Branco LM, Zanetti LC, Weinlich R, Bortoluci KR. Pattern recognition receptors and the host cell death molecular machinery. *Front Immunol*. 2018;9(OCT):1–19.
 87. Ma C, Li Y, Li M, Deng G, Wu X, Zeng J, et al. microRNA-124 negatively regulates TLR signaling in alveolar macrophages in response to mycobacterial infection. *Mol Immunol*. 2014;
 88. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006.
 89. Farrugia M, Baron B. The Role of Toll-Like Receptors in Autoimmune Diseases through Failure of the Self-Recognition Mechanism. *Int J Inflam*. Hindawi; 2017;2017.
 90. Akira S, Yamamoto M, Takeda K. Toll-like receptors: role of adapters in Toll-like receptor signalling. *Biochem Soc Trans*. 2003;
 91. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004;
 92. Ting JPY, Willingham SB, Bergstralh DT. NLRs at the intersection of cell death and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(5):372–9.
 93. Barbé F, Douglas T, Saleh M. Advances in Nod-like receptors (NLR) biology. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014;25(6):681–97.
 94. Karasawa T, Takahashi M. Role of NLRP3 Inflammasomes in Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* [Internet]. 2017;24(5):443–51. Available from: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jat/24/5/24_RV17001/_article
 95. Martinon F, Burns K, Boveresses C, Epalinges C-. Disvalues.Pdf. 2002;10:417–26.
 96. Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(6):397–411.
 97. Sharma D, Kanneganti TD. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. *Journal of Cell Biology*. 2016.
 98. Broz P, Monack DM. Measuring inflammasome activation in response to bacterial infection. *Methods Mol Biol*. 2013;
 99. Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 2006;
 100. Shaw PJ, McDermott MF, Kanneganti TD. Inflammasomes and autoimmunity. *Trends in Molecular Medicine*. 2011.

101. Karasawa T, Takahashi M. The crystal-induced activation of NLRP3 inflammasomes in atherosclerosis. *Inflamm Regen*. 2017;
102. Tsapras P, Nezis IP. Caspase involvement in autophagy. *Cell Death and Differentiation*. 2017.
103. Man SM, Kanneganti TD. Converging roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2016.
104. Broz P, Von Moltke J, Jones JW, Vance RE, Monack DM. Differential requirement for caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing. *Cell Host Microbe*. 2010;
105. Krishnan SM, Sobey CG, Latz E, Mansell A, Drummond GR. IL-1 β and IL-18: Inflammatory markers or mediators of hypertension? *British Journal of Pharmacology*. 2014.
106. Karmakar M, Katsnelson M, Malak HA, Greene NG, Scott J, Hise AG, et al. HHS Public Access. 2016;194(4):1763–75.
107. Johnson JL, Ramadass M, Haimovich A, McGeough MD, Zhang J, Hoffman HM, et al. Increased Neutrophil Secretion Induced by NLRP3 Mutation Links the Inflammasome to Azurophilic Granule Exocytosis. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2017;7(December):1–11. Available from:<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2017.00507/full>
108. Dunne A, Marshall NA, Mills KHG. TLR based therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;11(4):404–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2011.03.004>
109. Man SM, Kanneganti TD. Regulation of inflammasome activation. *Immunological Reviews*. 2015.
110. Muñoz-Planillo R, Kuffa P, Martínez-Colón G, Smith B, Rajendiran T, Núñez G. K⁺ Efflux Is the Common Trigger of NLRP3 Inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter. *Immunity*. 2013;
111. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*. 2011;
112. Harijith A, Ebenezer DL, Natarajan V. Reactive oxygen species at the crossroads of inflammasome and inflammation. *Front Physiol*. 2014;
113. Zhong Z, Zhai Y, Liang S, Mori Y, Han R, Sutterwala FS, et al. TRPM2 links oxidative stress to NLRP3 inflammasome activation. *Nat Commun*. 2013;
114. Franklin BS, Bossaller L, De Nardo D, Ratter JM, Stutz A, Engels G, et al. The adaptor ASC has extracellular and “prionoid” activities that propagate inflammation. *Nat Immunol*. 2014;
115. Ozaki E, Campbell M, Doyle SL. Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: Current perspectives. *Journal of Inflammation Research*. 2015.
116. Guo H, Callaway JB, Ting JP-Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med* [Internet]. 2015;21(7):677–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26121197%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/arti>

clerender.fcgi?artid=PMC4519035

117. Mariathasan S, Monack DM. Inflammasome adaptors and sensors: Intracellular regulators of infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology*. 2007.
118. Patel MN, Carroll RG, Galván-Peña S, Mills EL, Olden R, Triantafilou M, et al. Inflammasome Priming in Sterile Inflammatory Disease. *Trends in Molecular Medicine*. 2017.
119. Gao L, Dong Q, Song Z, Shen F, Shi J, Li Y. NLRP3 inflammasome: a promising target in ischemic stroke. *Inflamm Res*. Springer International Publishing; 2017;66(1):17–24.
120. Coll RC, Robertson AAB, Chae JJ, Higgins SC, Muñoz-Planillo R, Inerra MC, et al. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat Med*. 2015;
121. Qari MH, Dier U, Mousa SA. Biomarkers of inflammation, growth factor, and coagulation activation in patients with sickle cell disease. *Clin Appl Thromb*. 2012;
122. Cerqueira BAV, Boas W V., Zanette AD, Reis MG, Goncalves MS. Increased concentrations of IL-18 and uric acid in sickle cell anemia: Contribution of hemolysis, endothelial activation and the inflammasome. *Cytokine*. 2011;
123. MULLER-EBERHARD U, JAVID J, LIEM HH, HANSTEIN A, HANNA M. Brief Report: Plasma Concentrations of Hemopexin, Haptoglobin and Heme in Patients with Various Hemolytic Diseases. *Blood*. 1968;
124. Gorman MW, Feigl EO, Buffington CW. Human plasma ATP concentration. *Clin Chem*. 2007;53(2):318–25.
125. Adewoye AH, Klings ES, Farber HW, Palaima E, Bausero MA, McMahon L, et al. Sickle cell vaso-occlusive crisis induces the release of circulating serum heat shock protein-70. *Am J Hematol*. 2005;
126. Wei J, Zhao J, Schrott V, Zhang Y, Gladwin M, Bullock G, et al. Red blood cells store and release interleukin-33. *J Investig Med*. 2015;
127. JS W, JS G, MV B, TW J, HC F. Is Percoll innocuous to cells? *Biochem J*. 1982;202(3):795–7.
128. Barcellos KSA, Bigarella CL, Wagner M V., Vieira KP, Lazarini M, Langford PR, et al. ARHGAP21 protein, a new partner of α -tubulin involved in cell-cell adhesion formation and essential for epithelial-mesenchymal transition. *J Biol Chem*. 2013;288(4):2179–89.
129. Dominical VM, Bértolo MB, Almeida CB, Garrido VT, Miguel LI, Costa FF, et al. Neutrophils of Rheumatoid Arthritis Patients on Anti-TNF- α Therapy and in Disease Remission Present Reduced Adhesive Functions in Association with Decreased Circulating Neutrophil-Attractant Chemokine Levels. *Scand J Immunol*. 2011;
130. Bigarella CL, Borges L, Costa FF, Saad STO. ARHGAP21 modulates FAK activity and impairs glioblastoma cell migration. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2009;
131. Sanders MG, Parsons MJ, Howard AGA, Liu J, Fassio SR, Martinez JA, et al. Single-cell imaging of inflammatory caspase dimerization reveals differential recruitment to inflammasomes. *Cell Death Dis*. 2015;
132. Boucher D, Monteleone M, Coll RC, Chen KW, Ross CM, Teo JL, et al. Caspase-1 self-

- cleavage is an intrinsic mechanism to terminate inflammasome activity. *J Exp Med* [Internet]. 2018;jem.20172222. Available from: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20172222>
133. Lee HE, Yang G, Kim ND, Jeong S, Jung Y, Choi JY, et al. Targeting ASC in NLRP3 inflammasome by caffeic acid phenethyl ester: A novel strategy to treat acute gout. *Sci Rep*. 2016;
 134. Aguilar-Ruiz SR, Torres-Aguilar H, Gonzalez-Dominguez E, Narvaez J, Gonzalez-Perez G, Vargas-Ayala G, et al. Human CD16+ and CD16- monocyte subsets display unique effector properties in inflammatory conditions in vivo. *J Leukoc Biol*. 2011;
 135. Bryan NB, Dorfleutner A, Rojanasakul Y, Stehlik C. Activation of Inflammasomes Requires Intracellular Redistribution of the Apoptotic Speck-Like Protein Containing a Caspase Recruitment Domain. *J Immunol* [Internet]. 2009;182(5):3173–82. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.0802367>
 136. Abdul-Sater AA, Koo E, Häcker G, Ojcius DM. Inflammasome-dependent caspase-1 activation in cervical epithelial cells stimulates growth of the intracellular pathogen *Chlamydia trachomatis*. *J Biol Chem*. 2009;
 137. Cullen SP, Kearney CJ, Clancy DM, Martin SJ. Diverse Activators of the NLRP3 Inflammasome Promote IL-1 β Secretion by Triggering Necrosis. *Cell Rep*. 2015;
 138. Afonina IS, Tynan GA, Logue SE, Cullen SP, Bots M, Lüthi AU, et al. Granzyme B-dependent proteolysis acts as a switch to enhance the proinflammatory activity of IL-1 α . *Mol Cell*. 2011;
 139. Lin XY, Choi MSK, Porter AG. Expression analysis of the human caspase-1 subfamily reveals specific regulation of the CASP5 gene by lipopolysaccharide and interferon- γ . *J Biol Chem*. 2000;
 140. M.D. T, B. N, T. H, D.J. P. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2014;
 141. Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH, et al. Mortality In Sick Cell Disease -- Life Expectancy and Risk Factors for Early Death. *N Engl J Med*. 1994;
 142. Mankan AK, Dau T, Jenne D, Hornung V. The NLRP3/ASC/Caspase-1 axis regulates IL-1 β processing in neutrophils. *Eur J Immunol*. 2012;
 143. Miller ST, Sleeper LA, Pegelow CH, Enos LE, Wang WC, Weiner SJ, et al. Prediction of Adverse Outcomes in Children with Sick Cell Disease. *N Engl J Med*. 2000;
 144. Elmariah H, Garrett ME, De Castro LM, Jonassaint JC, Ataga KI, Eckman JR, et al. Factors associated with survival in a contemporary adult sick cell disease cohort. *Am J Hematol*. 2014;
 145. Canalli AA, Proença RF, Franco-Penteado CF, Traina F, Sakamoto TM, Saad STO, et al. Participation of Mac-1, LFA-1 and VLA-4 integrins in the in vitro adhesion of sick cell disease neutrophils to endothelial layers, and reversal of adhesion by simvastatin. *Haematologica*. 2011;
 146. Greten FR, Arkan MC, Bollrath J, Hsu LC, Goode J, Miething C, et al. NF- κ B Is a Negative Regulator of IL-1 β Secretion as Revealed by Genetic and Pharmacological

Inhibition of IKK β . *Cell*. 2007;

147. Tourneur L, Witko-Sarsat V. Inflammasome activation: Neutrophils go their own way. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2019;(January):JLB.3CE1118-433R. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/JLB.3CE1118-433R>
148. 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* [Internet]. 2018;3(26):eaar6676. Available from: <http://immunology.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/sciimmunol.aar6676>
149. Bakele M, Joos M, Burdi S, Allgaier N, Pöschel S, Fehrenbacher B, et al. Localization and functionality of the inflammasome in neutrophils. *J Biol Chem*. 2014;
150. Thomas CJ, Schroder K. Pattern recognition receptor function in neutrophils. *Trends in Immunology*. 2013.
151. Chen KW, Groß CJ, Sotomayor FV, Stacey KJ, Tschopp J, Sweet MJ, et al. The Neutrophil NLRC4 Inflammasome Selectively Promotes IL-1 β Maturation without Pyroptosis during Acute Salmonella Challenge. *Cell Rep*. 2014;8(2):570–82.
152. Gaidt MM, Ebert TS, Chauhan D, Schmidt T, Schmid-Burgk JL, Rapino F, et al. Human Monocytes Engage an Alternative Inflammasome Pathway. *Immunity*. 2016;
153. Man SM, Karki R, Kanneganti TD. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. *Immunological Reviews*. 2017.
154. Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, Walle L Vande, Louie S, Dong J, et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature*. 2011;
155. Schmid-Burgk JL, Gaidt MM, Schmidt T, Ebert TS, Bartok E, Hornung V. Caspase-4 mediates non-canonical activation of the NLRP3 inflammasome in human myeloid cells. *Eur J Immunol*. 2015;
156. Bauernfeind F, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, Speert D, Fernandes-alnemri T, et al. NF- κ B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol*. 2010;
157. Strickson S, Campbell DG, Emmerich CH, Knebel A, Plater L, Ritorto MS, et al. The anti-inflammatory drug BAY 11-7082 suppresses the MyD88-dependent signalling network by targeting the ubiquitin system. *Biochem J*. 2013;
158. Silveira A A , Cunningham C , Corr E , Ferreira J W A , Costa FF., Almeida CB, Conran N DA. Heme Induces NLRP3 Inflammasome Formation in Primary Human Macrophages and May Propagate Hemolytic Inflammatory Processes By Inducing S100A8 Expression. *Blood*. 2016;128(22):1256.
159. Hiratsuka S, Watanabe A, Sakurai Y, Akashi-Takamura S, Ishibashi S, Miyake K, et al. The S100A8-serum amyloid A3-TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase. *Nat Cell Biol*. 2008;
160. Alberts BM, Bruce C, Basnayake K, Ghezzi P, Davies KA, Mullen LM. Secretion of IL-1 β From Monocytes in Gout Is Redox Independent. *Front Immunol* [Internet]. 2019;10(January):1–12. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.00070/full>

161. Bouchier-hayes L, Oberst A, Mcstay GP, Connell S, Stephen WG, Dillon CP, et al. Characterization of cytoplasmic caspase-2 activation by induced proximity Lisa. *Mol Cell*. 2010;35(6):830–40.
162. Thalappilly S, Sadasivam S, Radha V, Swarup G. Involvement of caspase 1 and its activator Ipaf upstream of mitochondrial events in apoptosis. *FEBS J*. 2006;
163. Mendonça R, Silveira AA, Pericole FV, Seguin C, Leonardo FC, Olalla Saad ST, et al. Inflammasome-Dependent IL-1 β Release from Neutrophils in Human Sickle Cell Anemia. *Blood*. 2016;

10. APÊNDICES

10.1 APÊNDICE I

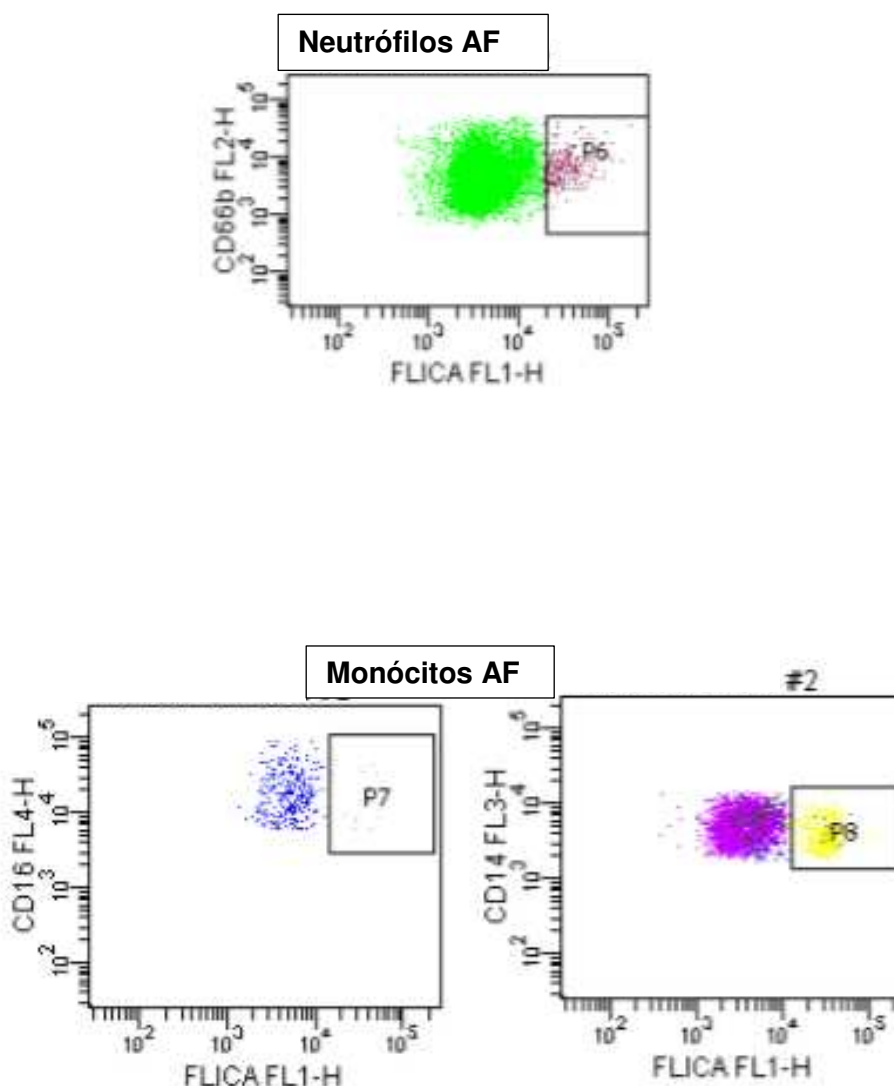
Faixa de detecção de sensibilidade dos Kits de ELISA usados neste estudo:

Kit ELISA	Faixa de detecção	Fabricante
IL-1β HS	0.1 – 8 pg/mL	R&D systems®
IL-1β DuoSet	3.9 – 250 pg/mL	R&D systems®
IL-18	36.1 – 257.8 pg/mL	MBL®
IL-1α	3.9 – 250 pg/mL	R&D systems®
TNF-α	15.6 – 1000 pg/mL	R&D systems®
HMGB1	0.20 – 1.0 ng/mL	CD creative diagnostics®
HSP70 HS	0.20 – 12.5 ng/mL	Enzo life sciences ®
IL-33	3.1 – 200 pg/mL	R&D systems®
IL-6	3.1 – 300 pg/mL	R&D systems®

10.2 APÊNDICE II

Avaliação da ativação de caspase-1 representadas através de dot plots utilizando a técnica de citometria de fluxo.

A aquisição foi realizada no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson®) sendo as análises realizadas por meio do software FacsDiva. A detecção da ativação da caspase-1 foi realizada utilizando o kit FAM-FLICA® (Immuno Chemistry Techenologies).



10.3 APÊNDICE III

Sequências de iniciadores utilizados em experimentos de qPCR

Gene	Sequência dos iniciadores
<i>IPAF</i>	FW: 5'- GAGGTCCCACAACCTCGTCAA – 3' RW: 5'- GATTTCCCGCCAAATTCAAC- 3'
<i>NALP12</i>	FW: 5'- GTTGGATTCCCAGGCATGAT- 3' RW: 5'- GCACAGAAGCCATCTCCTGA- 3'
<i>NALP6</i>	FW: 5'- CTCAAGGCACCACAAAACAA- 3' RW: 5'- AGGGAGTTTGCAGTGGGAC- 3'
<i>NALP1</i>	FW: 5'- GGTGAGATCAACCCACAGCA- 3' RW: 5'- GCCATTTGGAACAGGGATGT- 3'
<i>NALP3</i>	FW: 5'- GACTCTTGCACCCCGACTG- 3' RW: 5'- CTGGCTGGAGGTCAGAAAGTGT- 3'
<i>AIM2</i>	FW: 5'-GCAGTGATGAAGACCATTCGTA- 3' RW: 5'- GCTGAGTTTGAAGCGTGTTGAT- 3'
<i>CASP1</i>	FW: 5'- GCCCACCACCTGAAAGAGTGA- 3' RW: 5'- CACTTCCTGCCCACAGACAT- 3'
<i>PYCARD (ASC)</i>	FW: 5'- CTCCTCAGTCGGCAGCCAAG- 3' RW: 5'- TGTGACCCTCGCGATAAGC- 3'

10.4 APÊNDICE IV

Concentração dos anticorpos utilizados no Western blotting/ immunoblotting

Anticorpo Primário	[] primário	Anticorpo secundário	[] secundário	Fabricante
<i>NLRP3 (IgG rabbit)</i>	1:1000	Goat anti-Rabbit IgG HRP	1:10.000	ThermoFisher®
<i>ASC (IgG camundongo)</i>	1:1000	Goat anti-Mouse IgG HRP	1: 5.000	Santa Cruz®
<i>Caspase-1 (IgG mouse)</i>	1:1000	Goat anti-Mouse IgG HRP	1: 5.000	Santa Cruz®
<i>IL-1β (IgG rabbit)</i>	1:1000	Goat anti-Rabbit IgG HRP	1: 10.000	Cell Signaling®
<i>GAPDH (IgG mouse)</i>	1:3000	Goat anti-Mouse IgG HRP	1: 5.000	Santa Cruz®

10.5 APÊNDICE V

Sequências de iniciadores (plasmídeos) utilizados em experimentos de transfecção

Plasmídeo	Sequência de Iniciadores
<i>C1ProVC</i>	FW: 5´- TGAGAATTCTATGGCCGACAAGGTC – 3´ RW: 5´- CGCGGTACCTTG CATATTAAGGT- 3´
<i>C1ProVN</i>	FW: 5´- TGAGAATTCCATGGCCGACAAGG – 3´ RW: 5´- CGCGGTACCGCTTG CATATTAAGG- 3´
<i>C1ProVC D59R mutante</i>	FW: 5´- TTCGGAATAACGGAGCGAATCAAAGCTGGGTCTTATCCA – 3´ RW: 5´- TGGATAAGACCCGAGCTTTGATTGCTCCGTTATTCCGAA- 3´
<i>C1ProVN D59R mutante</i>	FW: 5´- TTCGGAATAACGGAGCGAATCAAAGCTCGGGTCTTATCCA – 3´ RW: 5´- TGGATAAGACCCGAGCTTTGATTGCTCCGTTATTCCGA- 3´

10.6 APÊNDICE VI

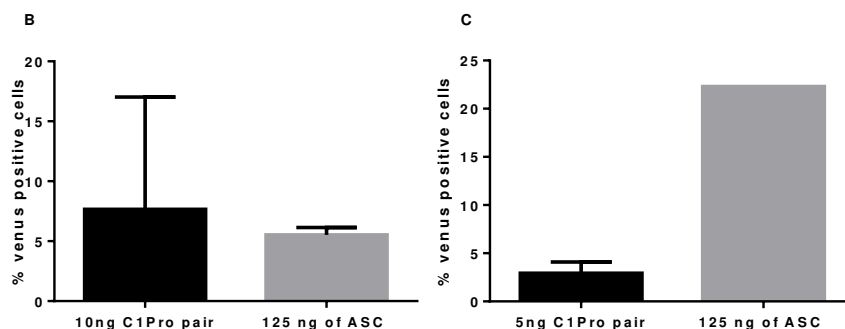
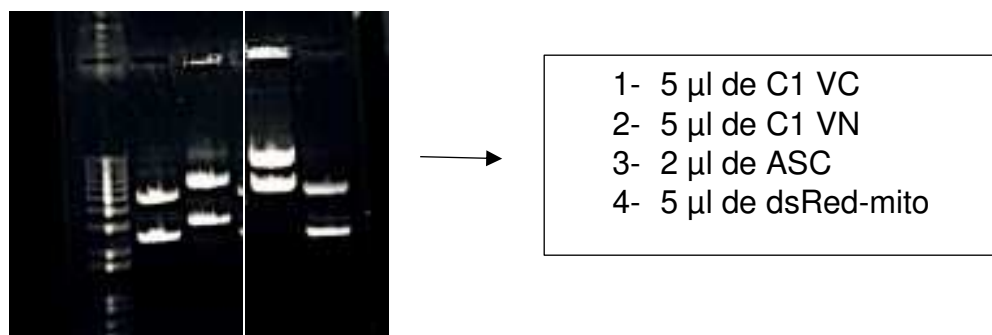
Concentrações dos plasmídeos utilizados nos ensaios

Plasmídeos	Concentração inicial	Diluição	Concentração final
C1 VC	1 µg/µl	1:100	10 ng/µl
C1 VN	1 µg/µl	1:100	10 ng/µl
ASC	1 µg/µl	1:8	125 ng/µl
dsRed-mito	1 µg/µl	1: 100	10 ng/µl

VC: fragmento vênus C-terminal; VN: fragmento vênus N-terminal; C1: caspase-1 plasmídeo; ASC: ASC plasmídeo; dsRedmito: reporter do experimento de transfecção (marcador de mitocôndria).

10.7 APÊNDICE VII

As concentrações inicialmente utilizadas para o protocolo de transfecção foram: 10 ng de C1Pro VC, C1Pro VN e 125 ng de ASC. (A) Para verificar se as concentrações dos plasmídeos estavam corretamente diluídas e para avaliar a integridade dos plasmídeos, checamos as concentrações no nanodrop e aplicamos em um gel de agarose 0,6% para avaliar a integridade dos mesmos. (B). As células utilizadas no estudo foram transfectadas separadamente com os plasmídeos nas concentrações acima, no entanto, a eficiência do ensaio de transfecção não foi considerada ideal (< 20% de eficiência de transfecção) e decidimos usar concentrações mais baixas desses plasmídeos (5 ng de C1 Pro Vc e C1 Pro VN), para o qual observamos uma boa eficiência (C).

A

(A) Titulação de plasmídeo para o ensaio de dimerização de caspase (BiFC); (B) Células HeLa foram transientemente transfectadas com os plasmídeos C1-Pro VC (10 ng), C1-Pro VN (10 ng) e dsRed-mito (10 ng) com/sem um plasmídeo codificando ASC (125 ng); (C) Células HeLa foram transitoriamente transfectadas com os plasmídeos C1-Pro VC (5 ng), C1-Pro VN (5ng) e dsRed-mito (10 ng) com/sem um plasmídeo codificando ASC (125 ng). As células vênus-positivas foram determinadas a partir de um mínimo de 100 células positivas para dsRed-mito (contagem manual). Para uma boa eficiência de transfecção recomenda-se uma porcentagem de 20-25% de células vênus-positivas.

11. ANEXOS

11.1 ANEXO I

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: A INVESTIGAÇÃO DA FORMAÇÃO DE INFLAMASSOMAS EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME

Pesquisador: Rafaela Mendonça

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 31962214.1.0000.5404

Instituição Proponente: Centro de Hematologia e Hemoterapia - HEMOCENTRO

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 942.083

Data da Relatoria: 29/01/2015

Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda ao projeto original, na qual pesquisadora solicita inclusão de pacientes recrutados em outro projeto já aprovado pelo CEP, de modo a aumentar a casuística e acompanhar o quadro inflamatório destes indivíduos. Não haverá necessidade de aumentar o volume de sangue a ser colhido, de modo que esta condição se mantém em relação ao projeto original, assim como os termos do TCLE, que não sofrerão alteração.

Objetivo da Pesquisa:

Solicitar adendo ao projeto original, m conforme relatado acima.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não alterados em relação ao projeto original.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentados adequadamente.

Recomendações:

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Página 01 de 02

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 942.083

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda aprovada.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

CAMPINAS, 30 de Janeiro de 2015

Assinado por:
Maria Fernanda Ribeiro Bittar
(Coordenador)

11.2 ANEXO II

Artigo publicado em Setembro de 2016 na revista Inflammation Research



Red cell DAMPs and inflammation

Rafaela Mendonça¹ · Angélica A. A. Silveira¹ · Nicola Coman²

Received: 20 January 2016 / Revised: 19 April 2016 / Accepted: 21 May 2016 / Published online: 1 June 2016
 © Springer International Publishing 2016

Abstract Intravascular hemolysis, or the destruction of red blood cells in the circulation, can occur in numerous diseases, including the acquired hemolytic anemias, sickle cell disease and β -thalassaemia, as well as during some transfusion reactions, pre-eclampsia and infections, such as those caused by malarial or *Clostridium perfringens*. Hemolysis results in the release of large quantities of red cell damage-associated molecular patterns (DAMPs) into the circulation, which, if not neutralized by innate protective mechanisms, have the potential to activate multiple inflammatory pathways. One of the major red cell DAMPs, heme, is able to activate converging inflammatory pathways, such as toll-like receptor signaling, neutrophil extracellular trap formation and inflammasome formation, suggesting that this DAMP both activates and amplifies inflammation. Other potent DAMPs that may be released by the erythrocytes upon their rupture include heat shock proteins (Hsp), such as Hsp70, interleukin-33 and Adenosine 5' triphosphate. As such, hemolysis represents a major inflammatory mechanism that potentially contributes to the clinical manifestations that have been associated with the hemolytic diseases, such as pulmonary hypertension and leg ulcers, and likely plays a role in specific complications of sickle cell disease such as endothelial activation, vaso-occlusive processes and tissue injury.

Keywords Hemolysis · DAMPs · Inflammasome · Red blood cells · Sickle cell disease · Toll-like receptor

Red cells and their disorders

The red cells, or erythrocytes, are the most abundant cells in the blood, where their main function is to transport oxygen and carbon dioxide throughout the organism. These cells are anucleate, biconcave discs (facilitating gas exchange and membrane deformability, allowing their passage through small vessels) that are filled with hemoglobin, the principal oxygen-binding protein. Red blood cells are produced in the bone marrow via erythropoiesis and released into the circulation, where they usually survive for between 100 and 120 days, although final maturation of circulating reticulocytes (immature nucleated red cells) can also occur in the spleen [1]. In general, erythrocyte destruction and hemoglobin processing occur principally via phagocytosing macrophages in the spleen, and also in the blood marrow and liver, without the release of damaging hemoglobin into the plasma (extravascular hemolysis). Of the numerous red cell disorders, the anemias are distinguished by a reduction in red cell volume. In addition to impairments in red cell production, the anemias may also result from augmented erythrocyte destruction, as occurs in the hereditary hemolytic anemias and in acquired hemolytic anemias [2].

Of particular relevance to this review are those disorders that cause excessive red cell destruction in the circulation, or intravascular hemolysis, as the red cells contain a number of damage-associated molecular patterns (DAMPs) that, if released into the plasma, can potentially cause inflammatory mayhem if not neutralized rapidly by the

Responsible Editor: Arne Bachofen.

R. Mendonça and A. A. A. Silveira contributed equally to this review.

✉ Nicola Coman
 coman@unicamp.br

¹ Hematology Center, School of Medicine, University of Campinas-UNICAMP, Rua Cesário, Campinas, São Paulo 13083-870, Brazil

organism's innate protective mechanisms. Diseases and events that are characterized by elevated intravascular hemolysis include the acquired hemolytic anemias, such as autoimmune hemolytic anemia, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, mismatched transfusion reactions, preeclampsia and infections, such as those caused by malaria or *Clostridium perfringens* [3, 4] (see Table 1 for a summary of some of the major causes of intravascular hemolysis). Hemolytic anemia can also occur following high-dose intravenous immunoglobulin (IVIg) administration, where non-O blood group patients with underlying inflammatory or immune-mediated disorders are reportedly at increased risk of hemolysis [5].

Some of the hereditary hemolytic anemias (caused by alterations in hemoglobin or alterations in the red cell membrane or its enzymes) can also present augmented intravascular hemolysis, in addition to extravascular hemolysis. Hemolytic anemia is characterized by decreased

hemoglobin levels (typically below 10 g/dL, but reaching as low as less than 6 g/dL, in cases of severe hemolysis), reduced red blood cell counts and haptoglobin levels, in addition to increased bilirubin levels [6]. Additionally, elevated plasma lactate dehydrogenase (LDH), particularly of the LDH-1 and LDH-2 isoenzymes, has been suggested to be a marker of intravascular hemolysis [6, 7]. Chronic hemolysis often presents as anemia when erythropoiesis cannot match the pace of red cell destruction, leading to reticulocytosis, in addition to manifestations such as jaundice and gallstones that occur as a consequence of hemoglobin and heme catabolism [8]. The hemoglobin disorders, such as sickle cell disease and β -thalassaemia, can induce extensive red cell destruction and, therefore, intravascular hemolysis and, although extensively studied, the chronic inflammation that can ensue from these hemoglobin disorders, and indeed hemolytic processes in general, is only just being recognized [9].

Table 1 Major clinical causes of hemolysis

Class of disorder	Examples	Acute/chronic hemolysis
Hemoglobin abnormalities (hemoglobinopathies)	Sickle cell disease	Chronic
	Thalassemias	Chronic
Red cell membrane disorders	Hereditary spherocytosis	Chronic
	Hereditary elliptocytosis	Chronic
Red cell enzyme disorders	Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency	Chronic/acute
	Pyruvate kinase (PK) deficiency	Chronic
Acquired hemolytic anemias	Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH)	Chronic
	Liver cirrhosis	Acute
	Infections (e.g. malaria, <i>Clostridium septicum</i>)	Chronic/acute
	Preeclampsia/hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count (HELLP) syndrome	Acute
	High-dose IVIg administration	Acute
Mechanical/physical trauma	Micangiopathic hemolytic anemia	Chronic
	Abnormalities in heart and large vessels	Chronic
	March hemoglobinuria (due to prolonged marching/foot striking, etc.)	Acute
	Burns	Acute
Chemical lesions	Spider/snake bites/bee stings	Acute
	Drug-induced (usually oxidant drugs)	Acute
	Copper/lead toxicity	Acute
	Osmotic (water/hypotonic injection)	Acute
Alloimmune disorders	Mismatched transfusion	Acute
	Hemolytic disease of the fetus/newborn	Acute
Autoimmune hemolytic anemia (AIHA)	Warm-active autoantibody AIHA (can be associated with some autoimmune disorders, lymphoproliferative disorders amongst others)	Chronic
	Cold-active autoantibody AIHA (may be associated with infections)	Acute
	Drug-induced	Acute

All of these disorders are associated with some degree of intravascular hemolysis; however, the red cell membrane disorders usually present a higher proportion of extravascular hemolysis, rather than intravascular hemolysis. Table compiled using information from [4, 5, 158, 159] IVIg intravenous immunoglobulin

Sickle cell disease and β -thalassaemia

The term sickle cell disease describes a group of genetic disorders caused by mutations in the hemoglobin β chain, resulting in the production of abnormal hemoglobin S (HbS) in the erythrocyte. The most common form of the disease is homozygotic HbSS disease (sickle cell anemia; SCA), although other genotypes in which one sickle gene is co-inherited with another mutation that alters the β -globin chain also exist (for example, HbSC disease and HbS/ β thalassaemia) and, together with SCA, these are collectively denominated sickle cell disease (SCD) [10].

At low concentrations of oxygen and high hemoglobin concentrations, HbS polymerizes leading the erythrocyte to take on a characteristic sickle-shaped morphology. The pathophysiological mechanisms of SCD are complex, but are now known to also involve intravascular hemolytic processes and recurrent vaso-occlusion, together with chronic vascular inflammation and endothelial activation [11, 12]. These events result in the numerous and varied clinical complications that are associated with SCD, including painful vaso-occlusive episodes, autoinfection of the spleen, pulmonary hypertension, acute chest syndrome, stroke, end-organ damage, renal damage and a shortened lifespan [13].

In another class of hemoglobinopathies, the β -thalassaemias, a reduced or abolished synthesis of the beta-globin chains occurs, causing the precipitation of free α -globin chains and resulting in ineffective erythropoiesis, red cell destruction and, therefore, anemia. Alterations in the red cell membrane cause membrane damage and instability, which can induce phosphatidyl serine exposure and induce hypercoagulability. Splenomegaly is the hallmark of β -thalassaemia, although thrombocytopenia and leukopenia can also occur, in addition to an increased requirement for blood transfusions. Splenectomy can be used in the management of some hematological diseases, such as β -thalassaemia, to reduce spleen-driven extravascular hemolysis [14]; however, a number of risks and complications are reported to be associated with splenectomy in β -thalassaemia, including an increased risk of infection and venous thromboembolism [14], besides a significant shift towards intravascular hemolysis [15, 16].

Vascular inflammation and hemolytic diseases

Increasing evidence emphasizes the participation that inflammatory processes and ensuing vascular dysfunction have in the pathophysiology of many of the hemolytic diseases. In SCD, for example, the chronic inflammatory state associated with the disease drives a vicious cycle of pan-cellular activation, inflammatory mediator release and

leukocyte and red cell recruitment to the endothelium, culminating in the occlusion of blood vessels, particularly in the microcirculation. The driving role of inflammation in SCD vaso-occlusive processes has been reviewed in more detail in [17–19] and these mechanisms are summarized in Fig. 1. SCD vaso-occlusive processes are responsible for the acute painful episodes that are a characteristic of the disease and, indirectly, for many of the disease's complications [20]. In addition to other triggering mechanisms, such as repeated events of hypoxia and reperfusion, a clear role for intravascular hemolysis in the initiation of vascular inflammation in SCD is emerging [18].

Chronic blood transfusion of some individuals with β -thalassaemia often leads to iron overload and, therefore, low-grade inflammation, endothelial activation and a higher cardiovascular risk [21]. Furthermore, splenectomy (sometimes employed in the management of β -thalassaemia) has been reported to significantly increase intravascular hemolysis in hemoglobin E/ β -thalassaemia individuals, in association with elevations in biomarkers indicative of inflammation, endothelial activation and hypercoagulability [15]. Leg ulcers are relatively frequent in individuals with β -thalassaemia, SCD, hereditary spherocytosis and PNH, while incidences of pulmonary hypertension (PH) and peliosis have also been reported in all these diseases, suggesting a common role for intravascular hemolysis and consequent vascular dysfunction in these complications [16, 22, 23].

Malaria infections can cause intravascular hemolytic processes [2] that may contribute to the reduced nitric oxide (NO) bioavailability and inflammatory processes associated with complications of the disease. During cerebral and severe malaria due to *Plasmodium falciparum* (the latter being characterized by the dysfunction of the brain tissue and others organ, such as the lungs or kidneys), augmented pro-inflammatory cytokine production, cellular adhesion molecule expression, endothelial activation and decreased NO bioavailability cause the adhesion of red blood cells and leukocytes to the brain and lung vasculature, respectively. In the brain, the congestion of cerebral capillaries leads to blood brain barrier dysfunction and edema, while the margination and subsequent migration of red blood cells, leukocytes and platelets from the lung microvasculature into interstitial tissue and the alveolar air space can lead to the acute lung injury and acute respiratory distress syndrome that can be associated with severe malaria [24].

Red cell DAMPs

The hemolytic process leads to the release of a number of red cell components that are recognized as DAMPs which can trigger a sterile inflammatory response. Erythrocyte

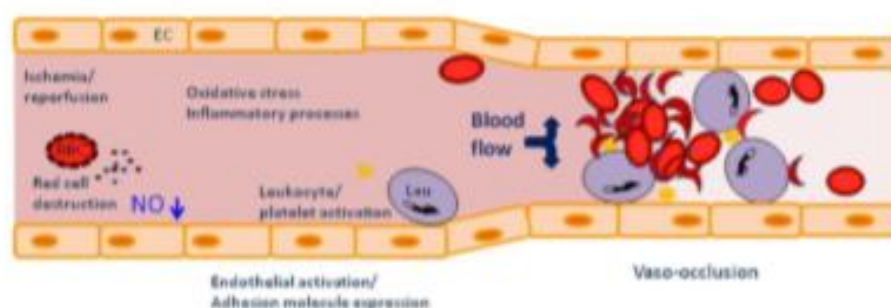


Fig. 1 Inflammation as a driver of vaso-occlusion in sickle cell disease. The production of abnormal hemoglobin S (HbS) leads to a number of pathophysiological events, including intravascular hemolysis and processes of ischemia/reperfusion. Cell-free hemoglobin, released from damaged red blood cells (RBC), induces nitric oxide (NO) bioavailability (facilitating vasoconstriction) and induces reactive oxygen species (ROS) production. Oxidative stress is also caused by processes of ischemia-reperfusion (IR) in blood vessels. Inflammatory processes resulting from damage-associated molecular patterns (DAMPs) release from RBC, oxidative stress, abnormalities

in the sickle RBC membrane and ER injury, cause cytokine and inflammatory mediator production, consequently contributing to the activation of endothelial cells (EC), the coagulation system and leukocytes (Leu). The increased expression of adhesion molecules on the surface of these cells leads to their recruitment to the blood vessel wall and a decrease in blood flow. The subsequent increase in RBC transit time can induce RBC sickling and lead to the sequestration of RBC in the cellular agglomeration, consequently inhibiting flow and causing vaso-occlusion. Figure adapted from [160], with permission yellow star platelet; red/blue small circles red cell DAMPs

components that potentially act as DAMPs following red cell destruction are listed below and in Table 2.

Hemoglobin/Heme

Upon the destruction of the red cells in the blood vessels, a significant quantity of hemoglobin and other contents of the cell are released into the circulation. If this cell-free hemoglobin is not swiftly neutralized by specialized scavenger proteins, it can cause significant damage in the vascular, perivascular and endothelial spaces [25]. In the event of extensive hemolysis, innate protective mechanisms are overwhelmed and decompartmentalized hemoglobin can react with significant quantities of vascular NO via multiple pathways [26]. NO dioxygenation of oxy-

hemoglobin can generate ferric hemoglobin (Hb-Fe^{3+}) and nitrate (NO^3), while iron-nitrosylhemoglobin may also be formed by the direct nitrosylation of the iron of deoxy-hemoglobin (Hb-Fe^{2+}) [26, 27]. While the S-nitrosylation of hemoglobin at the β -cysteine 93 (β -cys93) residue, forming S-nitrosohemoglobin (SNO-Hb) (which can release NO during deoxygenation), and the reduction of nitrite to NO by deoxygenated hemoglobin represent mechanisms for the retention of some of the biological activity of NO in the circulation [28, 29], the immediate bioavailability of vascular NO is essentially considerably decreased during hemolytic processes, potentially augmenting vasoconstriction and altering blood flow. Since NO is also important for maintaining cellular homeostasis, a reduction in its vascular bioavailability can bring about endothelial

Table 2 Known and putative red cell DAMPs and their receptors

Red cell DAMP	Role Presence in RBC/sources	Associated receptors
Heme	Released following oxidation of cell-free hemoglobin	TLR4 and NLRP3
Hsp70	Molecular chaperone	TLR2, TLR4, CD14
ATP	Energy source, released from RBC during cell damage, hypoxia, reduced oxygen tension and oxidative stress	NLRP3 and P2X7
mt DNA	Residual (from reticulocytes)	TLR9, NLRP3
IL-33	Stored by RBC (?)	ST2
Cyclophilin A	Chaperone found in cytosolic fraction (residual from reticulocytes)	CD147

RBC red blood cell, TLR toll-like receptor

dysfunction and platelet activation amongst other effects [30, 31]. More recent data have highlighted the significant effects that intravascular hemolytic processes may have on inflammatory processes. The induction of acute hemolytic events in C57BL/6 mice (using intravascular water infusion, resulting in plasma hemoglobin levels that were similar to those seen in a mice model of SCD) was found to induce an almost immediate and extensive vascular inflammatory response, characterized by extensive leukocyte recruitment to the blood vessel walls of the microcirculation [32].

In addition to its oxidation by NO, hemoglobin can react with physiological oxidants such as hydrogen peroxide and lipid peroxide. The oxidized hemoglobin product, Hb-Fe³⁺, accumulates in the circulation and tissues [27], where it can release heme (or heme, as it is commonly termed), a hydrophobic inflammatory molecule [33, 34]. Heme exerts multiple inflammatory effects, activating leukocytes and their migration, upregulating adhesion molecule and cytokine expression and augmenting oxidant production and lipid peroxidation [33, 35–37]. Importantly, heme, but not porphyrins without iron, can act as a DAMP promoting the formation of the inflammasome in LPS-primed macrophages [34], in addition to inducing toll-like receptor (TLR)-4-mediated endothelial cell activation and macrophage TNF- α (TNF)-production [33, 38]. In addition to receptor-mediated effects, heme can bind to transcription factors, such as Bach-1, a transcriptional regulator of heme-oxygenase-1 (HO-1). Due to its hydrophobicity, heme can insert itself in, and impair, lipid bilayers and organelles [39], and also binds to and oxidizes proteins or lipids, to generate reactive molecules, including oxidized low-density lipoprotein, an extremely inflammatory molecule with cytotoxic activity [37]. As a result of such oxidant reactions, heme can induce significant reactive oxygen species (ROS) generation and, therefore, oxidative stress [39, 40]; additionally, receptor-mediated ROS generation may occur via signaling pathways involving protein kinase C (PKC) and phosphoinositide 3-kinase (PI3K) in neutrophils [36]. Heme-induced oxidative stress can, in turn, also upregulate the expression of redox-sensitive genes, such as the cytoprotective HO-1 enzyme [41]. The effects of LPS-mediated activation of NF κ B and cytokine production in macrophages can also be potentiated by heme via spleen tyrosine kinase (Syk)-mediated ROS generation, suggesting a role for heme in amplifying the innate immune response to microbial molecules [42]. In macro- and micro-vascular endothelial cells, heme has been shown to induce tissue factor expression in an NF κ B-dependent fashion [43], while, more recently, heme-laden erythrocyte microparticle generation has been reported in sickle cell disease (SCD), where these microparticles can

adhere to and transfer heme to endothelial cells, inducing oxidative stress and apoptosis [44].

ATP and adenosine

Adenosine 5' triphosphate (ATP) has vasoactive properties and acts as a universal energy source in cellular reactions. ATP release can occur during necrosis, although numerous molecular pathways can result in augmented extracellular ATP. In the case of red cells, ATP can be released following cell lysis and there are reports to indicate that red cells release ATP when subjected to hypoxia and reduced oxygen tension, as well as oxidative stress, as may occur in vaso-occlusive processes, such as those seen in SCD [10, 45–47]. The intracellular ATP concentration in red blood cells is high (millimolar concentrations) [48]; as such, hemolytic mechanisms conceivably contribute to significant elevations in extracellular ATP in the red cell disorders [49].

Extracellular ATP can act as a potent signaling molecule via the activation of purinergic P2 receptors [50], with inflammatory consequences. For example, binding of ATP to the P2X7 receptor on inflammatory cells may contribute to Nod-like receptor family, pyrin domain-containing (NLRP3) activation and inflammasome formation, due to potassium efflux via ATP-gated cation channel opening [51]. Increased extracellular ATP levels may amplify inflammation *in vivo* by stimulating leukocyte activation and recruitment via P2 receptor activation [52–54]. Extracellular ATP can also potentially exert important effects on the erythrocytes themselves, as erythrocyte P2 receptor activation on progenitor red blood cells can cause microparticle release, ROS formation and apoptosis, while stimulation of P2 receptors on mature red blood cells can trigger eicosanoid release, phosphatidylserine exposure and further hemolysis [55].

Furthermore, extracellular ATP is converted by ectonucleotidases to adenosine, another vasoactive mediator. Adenosine concentrations have been found to be elevated in the plasma of transgenic SCD mice and humans with SCD [56], probably due to hemolysis, in addition to hypoxia and tissue damage. While the interaction of adenosine with the Adora2a adenosine receptor may have anti-inflammatory effects by selectively inhibiting the invariant natural killer T (iNKT) cells, adenosine signaling through the Adora2b adenosine receptor on the red blood cell membrane can contribute to erythrocyte sickling in SCD [56, 57].

Other red cell DAMPs

Other potential DAMPs that may be released by damaged red cells include some of the heat shock proteins (Hsp).

Hsp70 has been identified in mature erythrocytes [58] and, while Hsp70 has a protective chaperone function, this ATP-driven protein can stimulate monocytes/macrophages, microglia and dendritic cells via the TLR2 and 4 and CD14 pathways, leading to the activation of intracellular signaling pathways [59]. Furthermore, an Hsp70-TLR4 axis has been implicated in albumin-stimulated renal tubular inflammation in mice [60]. In pregnant women with hemolysis, elevated liver enzymes and low platelet count syndrome (HELLP syndrome), elevated serum Hsp70 levels are thought to indicate tissue damage, due to both hemolysis and hepatocellular injury, and disease severity [61]. Upregulated levels of Hsp70 have been reported in the erythrocyte proteome of HbE β -thalassemia patients [62] and increased levels of circulating serum Hsp70 level have been described in SCD individuals during vaso-occlusive crisis [63].

IL-33 is a nuclear-associated IL-1 family cytokine that signals via the ST2 receptor, inducing innate immune cells to produce type 2 cytokines [64]. A major source of IL-33 may be the red cells, which have been shown to release significant amounts of this cytokine upon their hemolysis. Circulating levels of IL-33 show a positive correlation with the degree of hemolysis in SCD patients [65], while elevated IL-33 has also been observed to correlate with disease activity in autoimmune hemolytic anemia [66]. Given the ability of IL-33 to induce the secretion of pro-inflammatory cytokines, and promote responses by cytotoxic NK cells and regulatory T cell subsets [67], this red cell DAMP may conceivably mediate some of the significant inflammatory responses that are observed following hemolysis.

Mitochondrial (mt) DNA may have a role in sterile inflammation due to its ability to activate TLR9 and directly induce NLRP3 inflammasome formation [68, 69]. Furthermore, the inflammatory effects of extracellular mtDNA may be enhanced by the oxidative modifications that occur during oxidative stress [70]. While mature erythrocytes do not have functional mitochondria, they appear to retain some residual mtDNA, which has been detected in red cell products [71]. Cyclophilin A (CypA) is a DAMP that has been associated with rheumatoid arthritis, liver injury and severe sepsis and that can act as a chemotactic agent for inflammatory cells by binding to the CD147 receptor and directly stimulating the release of a number of inflammatory mediators [72–75]. Although, to our knowledge, extracellular CypA has not been associated with hemolysis, it has been identified in the erythrocyte cytosolic fraction by proteomic studies [76], where it is suggested to persist from the reticulocyte stage of red cell maturation [77] and could contribute to the red blood cell DAMPs that are released upon erythrocyte lysis.

Inflammatory pathways stimulated by red cell DAMPs

Extracellular trap formation

Extracellular traps (ETs) are now thought to be essential for immune responses; these traps are formed by reticulate structures of extracellular DNA and granular proteins that can be released from monocytes, eosinophils and mast cells, but particularly from neutrophils [78]. Within minutes of activation by molecules such as lipopolysaccharide (LPS; the major component of the outer membrane of Gram-negative bacteria), neutrophils undergo a series of processes that include delobulation of the nucleus, chromatin condensation, disintegration of granular membranes and mixing of the cell's nuclear and cytoplasmic contents [79, 80]. These cellular contents are then ejected through the ruptured cell membrane, resulting in the extrusion of NETs that are more than tenfold the volume of the neutrophil. These NETs are thought to be important for host defense against infection to immobilize microorganisms and facilitate pathogen elimination [79, 81]; however, growing evidence indicates a role for NETs in a number of inflammatory and autoimmune diseases such as atherosclerosis and systemic lupus erythematosus [82, 83]. The presence of NETs has also been reported in SCD and transfusion-related acute lung injury (TRALI), a major cause of transfusion-related mortality [84, 85], both of which are characterized by vascular inflammation with implications for the participation of hemolytic processes or products (derived from stored blood products), respectively, in their pathophysiology [86–89].

The activation of neutrophils by heme to induce the production of inflammatory molecules, such as IL-8, ROS and cell migration, has been recognized for some time [36, 89, 90]. A crucial role for heme in inducing NET formation in neutrophils after proinflammatory cytokine priming has been suggested [91], where this NET production occurs in a ROS-dependent manner, and may be dependent on heme iron [88, 91]. Furthermore, there is evidence to indicate that NET formation is augmented in SCD, where they are likely pathogenic [84, 91]. Free heme has also been shown to induce the formation of mast cell extracellular traps (METs) in TNF-primed mice mast cells from SCD mice, possibly mediated by the action of TLR4, suggesting a contribution of heme-induced MET formation to SCD pathophysiology [92].

Red cell DAMPs and TLR pathways

TLRs are members of the superfamily of pattern recognition receptors (PRRs). TLRs are located on the cell surface

of both immune cells (e.g., macrophages and dendritic cells) and nonimmune cells (e.g., epithelial, fibroblast, and endothelial cells), where they can detect pathogen-associated molecular pattern (PAMPs) and endogenous inflammatory DAMPs [93, 94]. The TLRs are type I transmembrane glycoprotein receptors that contain leucine-rich repeat (LRR) domains for the recognition of PAMPs or DAMPs, a transmembrane domain, and a cytoplasmic Toll/IL-1 receptor (TIR) domain that mediates downstream signaling [95]. TLRs can be divided into two groups based on their cellular localization of ligand interaction: TLRs 1, 2, 4–6 and 11 are found on the cell surface, where they detect lipids, lipoproteins and proteins. In contrast, TLRs 3 and 7–9 are localized in the membranes of endosomal compartments (intracellular TLRs) and recognize bacteria- and virus-derived nucleic acids [96]. TLR expression differs on different cell types and, on the same cell type, signaling by different TLRs may result in diverse effects [97]. The pathways of cell activation and pathogen recognition in neutrophils, for example, are regulated by different TLRs that control oxidative mechanisms, inflammatory cytokine production and different cell death pathways, to control the cell's microbicidal and inflammatory activity [97, 98].

Of the potential red cell DAMPs, Hsp70 and mtDNA are both known to stimulate TLR (TLR2 and 4, and TLR9, respectively), while heme exerts a number of inflammatory effects via activation of TLR4 [38, 99, 100]. Methemoglobin (the precursor of heme) [101] causes dose-dependent, TLR4-mediated secretion of TNF from microglia and macrophages. Heme can also induce programmed necrosis in macrophages, by means of autocrine TNF and ROS production via a TLR4/MyD88-dependent pathway [102], and TLR4-mediated cerebral inflammation in an intracerebral hemorrhage (ICH) model [100, 103]. TNF, in turn, is a potent inflammatory cytokine that induces endothelial activation, lipid mediator expression and the activation of leukocytes [104], as well as modulating cell survival, differentiation and proliferation via the receptors TNF receptor 1 (TNFR1) and TNFR2. TNF has consistently been reported to be elevated in SCD and malaria [105–108], where it is assumed to play a major role in the inflammatory state associated with these diseases.

In the specific context of SCD, heme is reported to induce TLR4 activity, leading to acute lung injury in a sickle mice model [109] and induces vaso-occlusive-like processes via TLR4-mediated damage to endothelial cells in SCD mice [33]. Transcriptome profile hierarchical clustering identified TLR4 as being over 100-fold more expressed in the mononuclear cells of a group of SCD patient, compared to healthy controls [110], while the mast cells of SCD mice express significantly higher TLR4, as compared to control mice [111]. Individuals with malaria,

another disease characterized by hemolysis [112], present elevated plasma heme concentrations, in association with a decrease in endothelial progenitor cells (EPC) and augmented TLR4 expression. In vitro experiments demonstrated that heme induced CXCL10 expression and apoptosis in human brain microvascular endothelial cells (HBVEC) and CD34⁺ hematopoietic stem and progenitor cells (HSPC) via a TLR4-dependent pathway, indicating a role for the heme/TLR4 pathway in malaria pathogenesis [113].

Activation of TLRs on leukocytes, macrophages, other immune cells, vascular smooth muscle cells and endothelial cells can result in the increased production of proinflammatory cytokines and adhesion molecules, exacerbating the vascular inflammatory mechanisms that contribute to the pathophysiology of many of the hemolytic diseases, such as SCD and potentially causing damage to organs such as the kidneys and heart [96, 114]. Furthermore, TLRs have been implicated in pain signaling [115, 116], a finding that could be of relevance to SCD [117].

The inflammasome pathway and red cell DAMPs

The existence of the inflammasome was first proposed in 2002, when the association of caspase-1 activation and the maturation and release of IL-1 β was first reported [118]. It is now well accepted that this mechanism is largely responsible for the maturation and release of the IL-1 β and IL-18 cytokines, although a complex organization of multiple proteins and pathways is necessary for this to occur. In addition to cytokine maturation, the formation of the inflammasome results in cell pyroptosis, a type of programmed cell death [94]. IL-1 β and IL-18 activate and stimulate adhesive interactions on endothelial cells, vascular smooth muscle cells and leukocytes via their interactions with the IL-1 type 1 receptor (IL-1RI) and the IL-18 receptor α (IL-18R α), respectively. These cytokines also stimulate the release of IL-6 and IL-17 (IL-17 β) and interferon (IFN)- γ , IL-2 and IL-12 (IL-18), which in turn stimulate T-helper (Th) 1 and Th17 type immune responses [119].

Inflammasome formation can occur in response to both microbial activators and sterile inflammatory signals, such as those released by damaged cells, and play a central role in controlling the host innate immune defense, the principal role of which is to maintain homeostatic tissue function [120]. The formation of inflammasomes in inflammatory cells, including macrophages, neutrophils and dendritic inflammatory cells, has been observed in a number of inflammatory diseases, including autoinflammatory and autoimmune diseases such as gout, diabetes type 2, Alzheimer's disease, atherosclerosis and obesity, and

evidence for a role of red cell DAMPs in inflammasome formation is growing. The inflammasome is formed by a multiprotein complex, containing PRRs, often represented by the NLRPs (also known as NOD-like receptors, NLRs), which recognize PAMPs or DAMPs. Once activated, the NLRs recruit multiple copies of the adapter protein, apoptosis-related speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC) and pro-caspase-1. Cleavage of pro-caspase-1 into its activated form then occurs, which in turn cleaves pro-interleukin IL-1 β and pro-IL-18 into their bioactive forms [120–122].

Inflammasome components

Of the inflammasomes, the best characterized is the NLRP3 inflammasome, which is formed principally in neutrophils, macrophages, monocytes and dendritic cells in a rapid response to inflammatory stimuli [120]. In addition to the NLRP3 inflammasome, NLRP1, retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-1), absent in melanoma (AIM2) and IL-1 β -converting enzyme protease-activating factor (IPAF) inflammasomes have also been reported [123]. Thus far, 22 NLRs have been identified in humans, and 34 in mice. The proteins of this family all present C-terminal leucine-rich repeats followed by a nucleotide-binding NACHT domain, but differ in their N-terminal effector domains. NLRP3 has a pyrin-like domain that is necessary for the recruitment of the adapter molecule ASC [123, 124]. NLRP3 can recognize a wide variety of exogenous and endogenous stimuli such as microbial agonists, ATP, heme and mtDNA [34, 54, 69, 125]; however, the activation of NLRP3 by its DAMPs appears to occur via indirect mechanisms triggered by signaling intermediates, such as a reduction in intracellular potassium levels [126] and the generation of mitochondrial ROS [127, 128]. Following danger signal recognition, the activated NLRP3 rapidly induces polymerization of the ASC adapter protein into large helical filaments via pyrin interactions, which in turn provides a scaffold for the CARD-domain dependent recruitment and activation of pro-caspase-1 to form caspase-1 that subsequently induces the maturation and subsequent release of cytokines of the IL-1 family [129].

Inflammasome priming

In addition to the activation of inflammasome following the recognition of a PAMP/DAMP, a priming signal is also required for the production of active IL-1 β to occur. This priming signal, or "signal 1", upregulates the gene transcription of the inflammasome machinery and the pro-form of IL-1 β , which is then fed into the inflammasome for cleavage by caspase-1 to form active IL-1 β [123]. For example, for heme to induce NLRP3 inflammasome

formation in macrophages, these cells require priming by LPS to activate NF- κ B and induce the expression of NLRP3, caspase-1 and IL-1 β , probably via TLR-mediated signaling [34]. Additionally, NETs and LL-37 (a protein contained in NETs) can activate caspase-1, in human and murine macrophages [130, 131]. As such, cross talk between inflammatory pathways can occur to amplify inflammatory responses.

Heme, ATP and the inflammasome

Heme has been shown to induce IL-1 β processing in mice bone marrow macrophages via the activation of the NLRP3 inflammasome, where inflammasome components were shown to contribute to hemolysis-induced lethality [34]. Heme induces Syk activation through its coordinated iron, via an unknown receptor, in turn inducing mtROS generation and NLRP3 activation. mtROS generation, NADPH oxidase 2 (NOX2) and K⁺ efflux are all essential for NLRP3 activation in this setting [34]. In another study, heme was suggested to activate NLRP3 inflammasome formation through P2X receptors, especially the P2X7R and P2X4R, with a potential role in kidney inflammation [132]. Increased extracellular ATP levels are also thought to amplify inflammatory responses by promoting NALP3-inflammasome assembly via the P2X7 receptor [34, 133].

Hemoglobin/heme scavenging proteins

The organism can counter hemoglobin release from red blood cells via scavenger proteins such as haptoglobin (HP) and hemopexin. HP, produced mainly by hepatocytes, is an acute phase plasma glycoprotein whose synthesis can be upregulated by inflammatory stimuli, particularly IL-6 [134]. The HP protein can bind tightly to free hemoglobin thereby preventing its oxidative effects and the extravasation of free hemoglobin into tissues. The hemoglobin/HP complex is then taken up by the liver and other tissues via receptors such as the CD163 receptor, found on macrophages and Kupffer cells [25, 135]. The human HP gene is polymorphic, resulting in three major HP genotypes, Hp1-1, Hp2-2 and Hp2-1, whose frequencies appear to vary according to geographical region. HP phenotype may have a significant influence on inflammatory status, particularly in inflammatory diseases where poor disease outcome has been consistently linked to the Hp2-2 phenotype [134, 136, 137], which while apparently preserving HP's hemoglobin-binding capacity [138, 139] may affect the clearance of the hemoglobin-HP complex and CD163-dependent anti-inflammatory signaling [140–142]. Current data regarding the influence of the HP genotype on the inflammatory status of the hemolytic diseases are scarce; the Hp2-2 genotype may

represent a risk for premature atherosclerosis and iron overload in children with transfusion-dependent β -thalassaemia [143]; however, no HP genotype effect on inflammatory cytokine production was reported in a population of individuals with SCA in Brazil [144]. Paradoxically, in malaria, some studies have reported data to suggest a protective effect of the HP2-2 phenotype against *Plasmodium falciparum* infection and inflammatory mediator production [145–148].

Hemopexin is another acute-phase plasma glycoprotein that is also produced principally by the liver in response to inflammatory stimuli [149]. Hemopexin can bind heme (once released from oxidized hemoglobin), sequestering it in an inert form for transport to the liver [25] and preventing its

pro-oxidant and pro-inflammatory effects. Additionally, the small lipocalin protein, Alpha-1-microglobulin (A1M), found in plasma and tissues can also bind to and scavenge heme [150, 151]. The heme transported to the liver by hemopexin can then be cleaved by the HO-1 enzyme, generating biliverdin, carbon monoxide and iron. The expression of this enzyme is upregulated by hemoglobin/heme and represents a protective feedback mechanism [152, 153]. However, in events characterized by excessive intravascular hemolysis, these efficient hemoglobin/heme clearance mechanisms can be overwhelmed; indeed, HP and hemopexin depletion occurs in sickle cell anemia and other hemolytic anemias, and levels of these proteins may correlate inversely with disease severity [154–157].

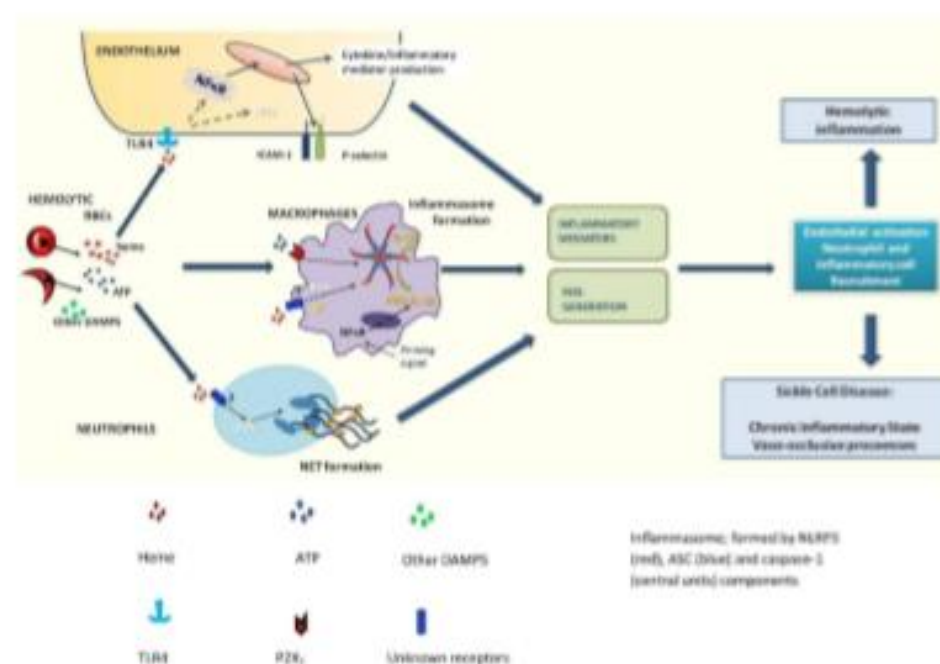


Fig. 2 Red cell DAMPs and inflammatory pathways. Damage-associated molecular patterns (DAMPs) are released from red blood cells during hemolysis. In turn, DAMPs such as heme, ATP and hsp70 activate endothelial cells, macrophages and leukocytes via interactions with membrane receptors such as toll-like receptor 4 (TLR4) or P2X₁, respectively, or other unknown receptors. In the endothelium, heme-mediated TLR4 signaling leads to reactive oxygen species (ROS) production and activates the NF- κ B transcription factor, resulting in the upregulation of surface adhesion molecules and inflammatory mediator production. Macrophages are previously primed, by lipopolysaccharide or cytokines such as TNF (or possibly

by the binding of heme to TLR4), to produce Pro-IL-1 β and other inflammasome components. Subsequent DAMP interaction induces the assembly of inflammasomes formed by the NLRP3 pattern recognition receptor, ASC and caspase-1. Pro-IL-1 β is then cleaved by caspase-1 to form IL-1 β . In neutrophils, heme can activate and promote NET formation via ROS generation. Subsequent inflammatory mediator production and ROS generation lead to further endothelial activation and leukocyte recruitment in the blood vessel, with ensuing amplification of inflammatory mediator release and, under certain circumstances, triggering of vaso-occlusive processes. Adapted from [18], with permission of Springer

Conclusion

Although hemolytic processes have long been associated with a decrease in red cell mass and, therefore, insufficient oxygen delivery to peripheral tissues [2], the major inflammatory consequences of intravascular hemolysis and their potential pathophysiological significance have only been recognized more recently. The release of large quantities of red cell DAMPs into the circulation, if not neutralized by innate protective mechanisms, has the potential to activate multiple inflammatory pathways that are known to participate in major inflammatory diseases. Indeed, evidence suggests that the major red cell DAMP, heme, is able to activate converging inflammatory pathways, such as TLR signaling, NET formation and inflammasome formation (Fig. 2), suggesting that this DAMP both activates and amplifies inflammation. As such, hemolysis represents a major inflammatory mechanism that potentially contributes to the clinical manifestations that have been associated with the hemolytic diseases, such as priapism, pulmonary hypertension and leg ulcers [16], and may contribute to specific complications of sickle cell disease such as endothelial activation, vaso-occlusive processes and tissue/organ injury.

Recognition of the huge inflammatory burden of hemolytic processes will pave the way for new approaches for use in combination with already established therapies aimed at treating specific aspects of the hemolytic diseases, with a view to either diminishing or neutralizing the effects of the release of hemoglobin and other DAMPs during red cell destruction. In sickle cell disease, for example, the prime approach for reducing the effects of hemolysis would be the use of gene editing or anti-hemoglobin-S-polymerizing therapies to prevent red cell lysis. However, in lieu of such therapies (or the only partial success of existing therapies), manners in which to neutralize hemoglobin and its products and the inflammatory downstream effects of red cell DAMP release in the circulation should be developed or optimized. Such approaches may include the use of purified or recombinant haptoglobin or hemopectin, NO donors (or modulators of downstream NO signaling, such as guanylate cyclase activators/inhibitors), anti-inflammatory drugs, such as anti-TNF agents or IL-1-receptor antagonists, and antioxidants.

Acknowledgments R. M. is funded by a grant from CAPES, Brazil. A. A. S. is funded by a grant from FAPESP, Brazil. The authors thank Prof. Fernando Ferreira Costa for his review of the paper and comments.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest N. C. has received research funding from Bayer Pharma AG. The authors have no other potential conflicts of interests to declare.

References

1. Qvistley JG, Means RT Jr, Glader B. The birth, life and death of red blood cells, erythropoiesis, the mature red blood cell and cell destruction. In: Greer JP, Ather DA, Glader B, List AF, Means Jr RT, Paraskevas F, et al., editors. *Wintrobe's clinical hematology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, Wolters Kluwer; 2014. p. 93–124.
2. Means RT Jr, Glader B. Anemia: general considerations. In: Greer JP, Ather DA, Glader B, List AF, Means Jr RT, Paraskevas F, et al., editors. *Wintrobe's clinical hematology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, Wolters Kluwer; 2014. p. 587–616.
3. Dhaliwal G, Cornett PA, Turney LM Jr. Hemolytic anemia. *Ann Fam Phys*. 2004;69:2599–606.
4. Green M, Dellberg Anderson U, Johansson ME, Edner-Hagerwall A, Larsson I, Järnby M, et al. The human endogenous protection system against cell-free hemoglobin and heme is overwhelmed in pre-eclampsia and provides potential biomarkers and clinical indicators. *PLoS One*. 2015;10:e0138113.
5. Patrino R. Possible mechanisms for immune-mediated intravascular hemolysis: clues obtained from review of clinical case reports. *Transfusion*. 2015;55(Suppl 2):559–64.
6. Bazzill W, Patrino R. Clinical applications of hemolytic markers in the differential diagnosis and management of hemolytic anemia. *Dis Mark*. 2015;2015:653679.
7. Kato GJ, McGowan V, Machuga RT, Linde JA, Taylor M, Morris CR, et al. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulcers, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. *Blood*. 2006;107:2279–85.
8. Perrotti S, Gallagher PG, Mohandas N. Hereditary spherocytosis. *Lancet*. 2008;372:1411–26.
9. Scher DI, Buchler PW. Cell-free hemoglobin and its scavenger proteins: new disease models leading the way to targeted therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3:a033433.
10. Stuart MJ, Nagel RL. Sickle-cell disease. *Lancet*. 2004;364:1343–60.
11. Correas N, Costa FF. Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions. *Clin Biochem*. 2009;42:1824–38.
12. Habbel RP, Venzell G, Nath KA. A systems biology consideration of the vasculopathy of sickle cell anemia: the need for multi-modality chemoprophylaxis. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2009;9:271–82.
13. MHO-F Steinberg K, Hsu MM. Clinical and pathophysiological aspects of sickle cell anemia. In: Steinberg ME, Forgan BG, Higgs DR, Weatherall DJ, editors. *Disorders of hemoglobin*. Cambridge: Cambridge University Press; 2009.
14. Olivieri NF, Weatherall DJ. *Disorders of Hemoglobin*. Chapter 17. New York: Cambridge University Press; 2009.
15. Atchankare V, Chanchareon S, Atchankare N, Udomak-payakul U, Arjanchai K. Intravascular hemolysis, vascular endothelial cell activation and thrombophilia in splenectomized patients with hemoglobin E-beta-thalassemia disease. *Acta Haematol*. 2014;132:100–7.
16. Correas N. Intravascular hemolysis: a disease mechanism not to be ignored. *Acta Haematol*. 2014;132:97–8.
17. Correas N, Frances-Pereira CF, Costa FF. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. *Hemoglobin*. 2009;33:1–10.
18. Almeida CB, Kato GJ, Correas N. Inflammation and sickle cell anemia. In: Costa FF, Correas N, editors. *Sickle cell anemia: from basic science to clinical practice*. Switzerland: Springer International; 2016. p. 177–211.

19. Hoppe CC. Inflammatory mediators of endothelial injury in sickle cell disease. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2014;28:265–86.
20. Steinberg M. Overview of sickle cell anemia pathophysiology. In: Costa FF, Conran N, editors. *Sickle cell anemia: from basic science to clinical practice*. Switzerland: Springer International; 2016. p. 49–73.
21. Aggeli C, Antoniadou C, Costa C, Chrysoschos C, Tsonoulis D, Lalis V, et al. Endothelial dysfunction and inflammatory process in transfusion-dependent patients with beta-thalassemia major. *Int J Cardiol.* 2005;105:90–4.
22. MacMillan KM, Taher AT, Buchnikowicz EA. beta-thalassemia intermedia: a clinical perspective. *Crit Care Opin Perspect Med.* 2012;2:a013482.
23. 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;293:1653–62.
24. Souza MC, Pithu TA, Henriques MG. Endothelial-leukocyte interaction in severe malaria: beyond the brain. *Mediat Inflamm.* 2015;2015:168933.
25. Schaefer DJ, Virchi F, Ingoglia G, Tofosano E, Buchler PW. Haptoglobin, hemopexin, and related defense pathways—basic science, clinical perspectives, and drug development. *Front Physiol.* 2014;5:415.
26. Reiter CD, Wang X, Tamas-Santos JE, Hogg N, Cannon RO 3rd, Schoeter AN, et al. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med.* 2002;8:1385–9.
27. Schaefer DJ, Buchler PW, Alayash AI, Belcher JD, Vercellotti GM. Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and heme scavengers as a novel class of therapeutic proteins. *Blood.* 2013;121:1276–84.
28. Sturder JS, Jia L, Bu JP, McMahon TJ, Demchenko IT, Bonaventura J, et al. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin is the physiological oxygen gradient. *Science.* 1997;276:2034–7.
29. Crosby K, Pastore KS, Crawford JH, Patel RP, Reiter CD, Maier S, et al. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med.* 2003;9:1498–505.
30. Gladwin MT, Crawford JH, Patel RP. The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: role in blood flow regulation. *Free Radic Biol Med.* 2004;36:707–17.
31. Helms CC, Marvel M, Zhao W, Stable M, Vest R, Kato GI, et al. Mechanisms of hemolysis-associated platelet activation. *J Thromb Haemost.* 2013;11:2348–54.
32. Almeida CB, Souza LE, Lacerda FC, Costa FT, Wernick CC, Circo DT, et al. Acute hemolytic vascular inflammatory processes are prevented by nitric oxide replacement or a single dose of hydroxyurea. *Blood.* 2015;126:711–20.
33. 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;123:377–90.
34. Datta FF, Alves LS, Rodriguez D, Fernandez PL, de Oliveira RB, Gofersbeck DT, et al. Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111:E4110–8.
35. Datta FF, Bozza MT. Heme on innate immunity and inflammation. *Front Pharmacol.* 2014;5:115.
36. Pinto BN, Alves LS, Fernandez PL, Datta 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;282:24430–6.
37. Jeney V, Balla J, Yachia A, Varga Z, Vercellotti GM, Eaton JW, et al. Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood.* 2002;100:879–87.
38. Figueiredo RT, Fernandez PL, Mourao-Sa DS, Pinto BN, Datta FF, Alves LS, et al. Characterization of heme as activator of toll-like receptor 4. *J Biol Chem.* 2007;282:20221–8.
39. Wagner FA, Volk HD, Willis D, Abraham NG, Soares MP, Adams GL, et al. Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol Rev.* 2005;55:551–71.
40. Hark RC, Hardy J, Smith A. Heme-mediated reactive oxygen species toxicity to retinal pigment epithelial cells is reduced by hemopexin. *J Cell Physiol.* 1996;168:51–6.
41. Yamada N, Yamaya M, Okitaga S, Lie R, Suzuki T, Nakayama K, et al. Protective effects of heme oxygenase-1 against oxidant-induced injury in the cultured human tracheal epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999;21:428–35.
42. Fernandez PL, Datta FF, Alves L, Figueiredo RT, Mourao-Sa D, Fortes GB, 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;285:52844–51.
43. Sanyal BN, Boral SG, Zhang J, Smart MJ. Heme induces endothelial tissue factor expression: potential role in hemostatic activation in patients with hemolytic anemia. *J Thromb Haemost.* 2008;8:2202–9.
44. Carras SM, De Moraes EA, Bousin P, Abdyad P, Le Joux S, Lionnet F, et al. Circulating cell membrane microparticles transfer heme to endothelial cells and trigger vaso-occlusion in sickle cell disease. *Blood.* 2015;125:3805–14.
45. Sprague RS, Stephenson AM, Ellsworth ML. Red cell death signaling in and from erythrocytes. *Trends Endocrinol Metab.* 2007;18:150–5.
46. Ransilani G, Langley G. ATP, an extracellular signaling molecule in red blood cells: a messenger for malaria? *Biomed J.* 2014;37:284–92.
47. Nar E, Burnand BE, Otten HM, Brandjes DP, Schaap JJ, Group CS. Oxidative stress in sickle cell disease: pathophysiology and potential implications for disease management. *Am J Hematol.* 2011;90:484–9.
48. Sprague RS, Ellsworth ML. Erythrocyte-derived ATP and perfusion distribution: role of intracellular and intercellular communication. *Microcirculation.* 2012;19:430–9.
49. Gorman MW, Feigl EO, Buffington CW. Human plasma ATP concentration. *Clin Chem.* 2007;55:318–25.
50. Iidaka M, Ferrati D, Ellsworth ML. Nucleotide signaling during inflammation. *Nature.* 2014;509:310–7.
51. Iidaka M, Ferrati D, Regel AK, Ellsworth ML. Extracellular nucleotide and nucleotide signaling in vascular and blood disease. *Blood.* 2014;124:1029–37.
52. Suni Y, Wondolfe T, Chen Y, Bao Y, Li X, Yao Y, et al. Plasma ATP is required for neutrophil activation in a mouse sepsis model. *Shock.* 2014;42:147–7.
53. Levent C, Fiedleris K, Johnson DM, Dorman C, Thery M, Exciteto C, et al. P2X1 ion channels promote neutrophil chemotaxis through the kinase activation. *J Immunol.* 2009;183:2801–8.
54. Bozza MT, Dagnello PC, Giuliani AL, Wesolowski A, Di Virgilio F. P2 receptors and extracellular ATP: a novel homeostatic pathway in inflammation. *Front Biosci (Schol Ed).* 2011;3:1443–56.
55. Skryter R. P2X and P2Y receptor signaling in red blood cells. *Front Mol Biosci.* 2015;2:80.
56. Zhang Y, Dai Y, Wen J, Zhang W, Guo A, Sun R, et al. Deleterious effects of adenosine signaling in sickle cell disease. *Nat Med.* 2011;17:79–86.
57. Field JE, Nathan DG, Linden J. The role of adenosine signaling in sickle cell therapeutics. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2014;28:287–98.

58. Gromov PS, Celis JE. Identification of two molecular chaperons (HSC70, HSC70) in mature human erythrocytes. *Exp Cell Res*. 1991;195:556–9.
59. Kim JY, Yoon MA. The immune modulating properties of the heat shock proteins after brain injury. *Asian Cell Biol*. 2013;46:1–7.
60. Jiang HF, Tui PJ, Cheung YL, Shen YT, Tai YA, Chen WC, et al. Albumin stimulates renal tubular inflammation through an HSP70-TRAF4 axis in mice with early diabetic nephropathy. *Dis Model Mech*. 2015;8:1311–23.
61. Mihaylova A, Tamas L, Lomenney G, Madach K, Prohászka Z, Rigo J Jr. Circulating heat shock protein 70 (HSPA1A) in normal and pathological pregnancies. *Cell Stress Chaperones*. 2010;15:237–47.
62. Bhattacharya D, Sahu S, Basu B, Chakravarty S, Chakravarty A, Banerjee D, et al. Differential regulation of stress proteins and chaperones in HbEheta-thalassemia erythrocyte proteome. *Proteom Clin Appl*. 2010;4:480–8.
63. Adewoye AJ, Klings ES, Farber HW, Pakama E, Bassero MA, McMahon L, et al. Nuclei cell vaso-occlusive crisis induces the release of circulating serum heat shock protein-70. *Am J Hematol*. 2005;78:240–2.
64. Lott JM, Hammer TL, Turpin HB. New dog and new tricks: evolving roles for IL-33 in type 2 immunity. *J Leukoc Biol*. 2015;97:1037–48.
65. Wei X, Zhou J, Schott V, Zhang Y, Gladwin MT, Bullock G, et al. Red blood cells store and release interleukin-33. *J Invest Med*. 2015;63:896–100.
66. Bu X, Zhang T, Wang C, Ren T, Wen Z. IL-33 reflects dynamics of disease activity in patients with autoimmune hemolytic anemia by regulating autoantibody production. *J Transl Med*. 2015;13:381.
67. Mohrley AB, Savage AK, Lockley RM. Interleukin-33 in tissue homeostasis, injury, and inflammation. *Immunity*. 2015;42:1015–19.
68. Zhang Q, Bassif M, Chen Y, Serey V, Serral T, Jarjour W, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*. 2010;464:104–7.
69. Shimada K, Crother TR, Karlin J, Dagradaj J, Chiba N, Chen S, et al. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity*. 2012;36:401–14.
70. Pavesiati K, Agud Z, Kozlov BV, Shtro A, Fekete T, Sague V, et al. Oxidative modification enhances the immunostimulatory effects of extracellular mitochondrial DNA on plasmacytoid dendritic cells. *Free Radic Biol Med*. 2014;77:281–90.
71. Lee YL, King MB, Gonzalez RP, Buvard SB, Potan MA, Gillespie MN, et al. Blood transfusion products contain mitochondrial DNA damage-associated molecular patterns: a potential effector of transfusion-related acute lung injury. *J Surg Res*. 2014;194:286–9.
72. Billich A, Winkler G, Aschauer H, Ritz A, Preidl F. Presence of cyclophilin A in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *J Exp Med*. 1997;185:975–80.
73. Topolter I, Schenker A, Jahn S, Geiger H, Geislinger G, Bang H, et al. Elevated serum cyclophilin levels in patients with severe sepsis. *J Clin Immunol*. 1997;17:380–6.
74. Kim H, Kim WJ, Kim ST, Koh EM, Cho RS, Ahn KS, et al. Cyclophilin A may contribute to the inflammatory processes in rheumatoid arthritis through induction of matrix degrading enzymes and inflammatory cytokines from macrophages. *Clin Immunol*. 2005;116:217–24.
75. Dear JW, Simpson RJ, Nicolai MP, Caterson JB, Street J, Hastings T, et al. Cyclophilin A is a damage-associated molecular pattern molecule that mediates acetaminophen-induced liver injury. *J Immunol*. 2011;187:5347–52.
76. Kakkaiadze DG, Bello LA Jr, Goodman SR. The human erythrocyte proteome: analysis by ion trap mass spectrometry. *Mol Cell Proteom*. 2004;3:501–6.
77. Pavesi EM, Kishigawa M, Mortensen P, Lane HB, Thomas AW, Mann M. In-depth analysis of the membrane and cytosolic proteome of red blood cells. *Blood*. 2006;108:791–803.
78. Prachtak MP, Kotula L, Mordal-Hendrik A. Neutrophil extracellular traps (NETs) impact upon autoimmune diseases. *Curr Biol J Immunol*. 2015;40:217–24.
79. Geyrhofer PC, Kappas ME. At the Bench: Neutrophil extracellular traps (NETs) highlight novel aspects of innate immune system involvement in autoimmune diseases. *J Leukoc Biol*. 2016;99:253–64.
80. Fuchs TA, Abud U, Grossman C, Barwick R, Schaller T, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2007;176:231–40.
81. Behr K, Wurth F, Abigge B, Stenmark S, Zychlinsky A, Henriques-Normark B. An endonuclease allows macrophages to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr Biol*. 2009;19:401–7.
82. Yu Y, Su K. Neutrophil extracellular traps and systemic lupus erythematosus. *J Clin Cell Immunol*. 2013;4:119.
83. Dierckx V, Mahtey HB, Dierckx M, Liersch D, Meyers RT, Schellert D, et al. Auto-antigenic protein-DNA complexes stimulate plasmacytoid dendritic cells to promote autoimmunity. *Circulation*. 2012;125:1673–83.
84. Schirmer M, Nae E, Bismuth BE, von Moltke GE, Solati S, Brundage DP, et al. Neutrophils and neutrophil activation in sickle cell disease painful crisis. *Hematologica*. 2013;98:1795–803.
85. Thomas GM, Carbo C, Curtis BR, Martinez K, Mann HB, Schatzberg D, et al. Extracellular DNA traps are associated with the pathogenesis of TRALI in humans and mice. *Blood*. 2012;119:6135–43.
86. Kim GJ, Gladwin MT, Steinberg ME. Dissecting sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev*. 2007;21:37–47.
87. Peters AL, van Heesde MB, Jellumans NP, Vlas AF. Pathogenesis of non-antibody mediated transfusion-related acute lung injury from bench to bedside. *Blood Rev*. 2015;29:51–61.
88. Kono M, Sugo K, Takagi Y, Takahashi T, Kawachi S, Wada A, et al. Heme-related molecules induce rapid production of neutrophil extracellular traps. *Transfusion*. 2014;54:2813–8.
89. Kono M, Sugo K, Takagi Y, Kawachi S, Wada A, Shinkawa M, et al. Morphological and flow-cytometric analysis of hemo-induced human neutrophil activation: implications for transfusion-related acute lung injury. *Blood Transfus*. 2015;11:55–60.
90. Graca-Santos AV, Almeida MA, de Freitas MS, Rapa-Fidalgo C, Oliveira PL. Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. *Blood*. 2002;99:4160–5.
91. Chan G, Zhang D, Fuchs TA, Mannari D, Wagner DD, Preissner PS. Heme-induced neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of sickle cell disease. *Blood*. 2014;123:3816–27.
92. Tran H, Ba R, Nguyen J, Jurek S, Rodriguez I, Mitul A, et al. Hemo-induced neutrophil extracellular traps impact resistance to therapy in a sickle mouse environment. *Blood*. 2015;126:Abstr 3385.
93. Akita S, Takeuchi K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:499–511.
94. Mariathasan S, Monack DM. Innate immune adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:31–40.
95. Kang IY, Lee HJ. Structural biology of the toll-like receptor family. *Annu Rev Biochem*. 2011;80:917–41.
96. Giallourakis S, McCarthy CG, With BC. Toll-like receptors in the vascular system: seeing the dangers within. *Pharmacol Rev*. 2016;68:142–67.

97. Wang Y, Song E, Bai B, Vanhoose PM. Toll-like receptors mediating vascular inflammation: lessons from receptor subtypes. *Pharmacol Ther*. 2016;158:91–100.
98. Bellacchio S, Moretti S, Perruccio K, Fallarini F, Bozza S, Montagnoli C, et al. TLRs govern neutrophil activity in sepsis. *J Immunol*. 2004;173:7406–15.
99. Belcher JD, Nath KA, Vercellotti GM. Vasoconstrictive and proinflammatory effects of plasma home: cell signaling and cytoprotective responses. *ISRN Oxidative Med*. 2013;2013:831596.
100. Lin S, Yin Q, Zhong Q, Lv FL, Zhou Y, Li JQ, et al. Home activates TLR4-mediated inflammatory injury via MyD88/TRIF signaling pathway in intracerebral hemorrhage. *J Neuroinflamm*. 2012;9:46.
101. Kwon MS, Woo SK, Kurland DB, Yoon SH, Palmer AF, Benzer U, et al. Methemoglobin is an endogenous toll-like receptor 4 ligand-relevance to subarachnoid hemorrhage. *Int J Mol Sci*. 2015;16:5028–46.
102. Fantes GB, Alves LJ, de Oliveira R, Dutra FF, Rodrigues D, Fernandez PL, et al. Home induces programmed necrosis on macrophages through autocrine TNF and ROS production. *Blood*. 2012;119:2368–75.
103. Teng W, Wang L, Xue W, Gao C. Activation of TLR4-mediated NF- κ B signaling in hemorrhagic brain in rats. *Mediat Inflamm*. 2009;2009:473276.
104. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843:2563–82.
105. Loutch C, Franco-Pontado CF, Altschuler DM, Said ST, Correa N, Costa FF. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. *J Leukoc Biol*. 2009;85:235–42.
106. Pathare A, Al Kindi S, Alsagoff AA, Daar S, Koon-Mundalay H, Denstein D. Cytokine profile of sickle cell disease in Oman. *Ann J Hematol*. 2004;77:323–8.
107. Qut MH, Dier U, Moros SA. Biomarkers of inflammation, growth factor, and coagulation activation in patients with sickle cell disease. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2012;18:195–200.
108. Randall LM, Engwerda CR. TNF family members and malaria: old observations, new insights and future directions. *Exp Parasitol*. 2010;126:326–31.
109. Ghosh S, Adoo DA, Chappi P, Tan F, Jackson KA, Archer DR, et al. Extracellular hemin crisis triggers acute chest syndrome in sickle mice. *J Clin Invest*. 2013;123:4809–20.
110. van Boers EJ, Yang Y, Raghavachari N, Tien X, Allen DT, Nichols JS, et al. Iron, inflammation, and early death in adults with sickle cell disease. *Circ Res*. 2015;116:298–306.
111. Vincent L, Yang D, Nguyen J, Gupta M, Luk K, Ericson ME, et al. Mast cell activation contributes to sickle cell pathology and pain in mice. *Blood*. 2013;122:1853–62.
112. Pampoula A, Harscheid T, Epiphaniou S, Metz MM, Vipera AM. Control malaria and the hemolytic/methemoglobinemic hypothesis: shedding new light on an old disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41:711–6.
113. Dickinson-Copeland CM, Wilson NG, Liu M, Dittu A, Salifu H, Adjei AA, et al. Home-mediated induction of CXCL10 and depletion of CD34⁺ progenitor cells is toll-like receptor 4 dependent. *PLoS One*. 2015;10:e0142328.
114. Zhao H, Ponce JS, Lu K, George AJ, Ma D. Role of toll-like receptor-4 in renal graft ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014;308:F800–11.
115. Kwok YH, Take J, Nicotri LL, Grace PM, Robin PE, Hutchinson MR. TLR 2 and 4 responsiveness from isolated peripheral blood mononuclear cells from rats and humans as potential chronic pain biomarkers. *PLoS One*. 2013;8:e77759.
116. Kato J, Svensson CL. Role of extracellular damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs) as mediators of persistent pain. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2015;131:251–79.
117. Kohli DR, Li Y, Khasabov SG, Gupta P, Kehl LJ, Ericson ME, et al. Pain-related behaviors and neurochemical alterations in mice expressing sickle hemoglobin: modulation by cannabinoids. *Blood*. 2010;116:456–65.
118. Martinez F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-1 β . *Mol Cell*. 2002;10:417–26.
119. Krishnan SM, Sobey CG, Latz E, Mansell A, Desmond GR. IL-1 β and IL-18: inflammatory markers or mediators of hypertension? *Br J Pharmacol*. 2014;171:559–602.
120. Zhong Y, Kier A, Szlach M. Functions of NOD-like receptors in human diseases. *Front Immunol*. 2013;4:333.
121. Ozaki E, Campbell M, Doyle SL. Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: current perspectives. *J Inflamm Res*. 2015;8:15–27.
122. Guo H, Callaway JB, Ting JP. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med*. 2015;21:677–87.
123. Datta A. Inflammasome activation: from inflammatory disease to infection. *Biochem Soc Trans*. 2011;39:669–73.
124. Mao SM, Kottagani TD. Regulation of inflammasome activation. *Immunol Rev*. 2015;265:6–21.
125. Vamaja SK, Rammam VA, Fitzgerald KA. Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights. *Trends Cell Biol*. 2015;25:308–15.
126. Munoz-Planillo R, Kuffa P, Martinez-Collin G, Smith BL, Rajadurai TM, Nunez G. K⁺ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity*. 2013;38:1142–53.
127. Zhou R, Yandi AS, Mena P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*. 2011;480:221–5.
128. Hargithi A, Ehemere DL, Nanaoju V. Reactive oxygen species at the crossroads of inflammasome and inflammation. *Front Physiol*. 2014;5:352.
129. Franklin BS, Broadbent L, De Nardo D, Ratter JM, Hata A, Engels G, et al. The adaptor ASC has extracellular and 'primed' activities that propagate inflammation. *Nat Immunol*. 2014;15:727–37.
130. Kaldenberg JM, Camacho-Rivera C, Smith CK, Kaplan MJ. Neutrophil extracellular trap-associated protein activation of the NLRP3 inflammasome is enhanced in human macrophages. *J Immunol*. 2013;190:1217–26.
131. Warratzsch A, Isomura M, Wang Q, Papayannopoulos V. Inflammation, neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science*. 2015;349:316–20.
132. Li Q, Fu W, Yao J, Ji Z, Wang Y, Zhou Z, et al. Home induces IL-1 β secretion through activating NLRP3 in kidney inflammation. *Cell Biochem Biophys*. 2014;69:495–502.
133. Aitle M, Lahou J, Pernguez DG, Stan E, Purohita N, Koller BH, et al. Altered cytokine production in mice lacking F2X(7) receptors. *J Biol Chem*. 2001;276:125–32.
134. Quyye HK. Haptoglobin, inflammation and disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008;102:733–42.
135. Melzer NL, Rothly ST. Role of hemoglobinemic scavenger protein hemopexin in atherosclerosis and inflammatory diseases. *Curr Opin Lipidol*. 2015;26:384–7.
136. Ito P, Saito I, Saito L, Taira J, Iwashiro M, Jita A, et al. Haptoglobin 2 allele associates with unstable carotid plaque and major cardiovascular events. *Atherosclerosis*. 2013;230:228–34.
137. Salezian M, Kapelovich MB, Rogovin A, Aronson D, Meisel SR, Shochat M, et al. Haptoglobin type and 30-day mortality in diabetic individuals presenting with acute myocardial infarction. *Diabetes Care*. 2005;28:2699–700.