

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

RAFAEL RAMOS DA SILVA

**Estudo da via Th17 em pacientes portadores de anemia
falciforme com úlcera maleolar: descoberta de novos
alvos terapêuticos**

Recife

2013

RAFAEL RAMOS DA SILVA

**Estudo da via Th17 em pacientes portadores de anemia
falciforme com úlcera maleolar: descoberta de novos
alvos terapêuticos**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da
Universidade Federal de Pernambuco, como
requisito parcial para a obtenção do Título de
Mestre em Inovação Terapêutica.**

**Orientadora: Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta
Co-orientador: Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra**

**Recife
2013**

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Rafael Ramos da

Estudo via Th17 em pacientes portadores de anemia falciforme com úlcera maleolar: descoberta de novos alvos terapêuticos/ – Recife: O Autor, 2013.

123 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Maira Galdino da Rocha Pitta

Coorientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Inovação Terapêutica, 2013.

Inclui bibliografia, apêndice e anexo

- 1. Anemia falciforme I. Pitta, Maira Galdino da Rocha (orientadora) II. Bezerra, Marcos André Cavalcanti (coorientador)**
III. Título

616.1527

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2014- 241

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

REITOR(A)

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR(A)

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR(A) PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR(A) DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Maria Eduarda Lacerda de Larrazábal da Silva

VICE- DIRETOR(A) DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Oliane Maria Correia Magalhães

COORDENADOR(A) DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Prof. Dr. César Andrade

VICE- COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Prof. Luiz Alberto Lira Soares



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Recife, 28 de fevereiro de 2013.

Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 28 de fevereiro de 2013, cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E PRIMEIRO EXAMINADOR INTERNO: Profª Drª Maira Galdino da Rocha Pitta
(Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

SEGUNDO EXAMINADOR INTERNO: Profª Drª Valéria Rego Alves Pereira
(Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães)

Assinatura: _____

PRIMEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Profª Drª Michelly Cristiny Pereira
(Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Severino e Rosilda, por nunca medirem esforços para me incentivar e apoiar em todas as etapas da minha vida. Pelo grande amor e por serem essenciais na minha vida.

Aos meus irmãos, Rosy, Christiane e Robson, pelo incentivo e apoio em todos os momentos. À minha noiva, Marcella, pelo estímulo, paciência e muito amor.

AGRADECIMENTOS

A **Prof. Dr. Maira Galdino da Rocha Pitta**, pela orientação, compreensão, profissionalismo e por todos os ensinamentos transmitidos durante estes dois anos de convívio.

Ao **Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra**, meu co-orientador, pelo incentivo, amizade, compreensão, confiança e apoio demonstrados durante os anos de convivência.

A **Dr. Aderson da Silva Araújo**, pela confiança, ajuda, incentivo e amizade durante a realização deste trabalho.

Aos meus amigos, **Michelly e Moacyr**, pelo companheirismo. Amizade, conselhos e apoio científico durante a fase final deste trabalho.

Aos Amigos do Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas, **Elayne, Flaviana, Kamila, Karla, Laurindo, Leidiane, Marina, Mardonny, Mariana Brayner, Michael, Pablo, Priscilla, Sayonara, Thámara e Thiago** pela amizade, carinho e incentivo neste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Hemoglobinopatias do Hemope, **Tauane, Diego, Luana, Aleide, Betânia, Ohanna, Isabela e Igor** pela amizade, carinho, e auxílios técnicos e científicos na realização deste trabalho.

As amigas do Setor de coleta do Hospital, **Gicélia, Josileide, Rosana, Divonize e Edineide** pelo companheirismo e disponibilidade na coleta dos pacientes deste estudo.

Aos amigos do Laboratório de Citologia do Hemope, **Dr. Roberto, Rose, Lau** sempre prestativos durante a realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica do Hemope, **Leonia e Flávia** sempre prestativos durante a realização deste trabalho.

Aos amigos da Uninassau, **Jurandy, Diego e Gracielly** pela amizade, parceria, incentivo e bons momentos compartilhados.

A **Paulo Germano**, secretário do PPGIT, pelos serviços prestados a mim durante este período.
A **FACEPE**, pelo suporte financeiro.

A meus pais **Severino e Rosilda** pelo amor e dedicação incondicionais, e aos meus irmãos.

Rosy, Christiane e Robson, por sempre me apoiarem e fazer parte dessa família que eu adoro.

A minha noiva, **Marcella**, pelo amor, carinho, principalmente compreensão e paciência.

Aos meus futuros sogros, **Luciano e Eudénice** pelo carinho e incentivo nessa etapa da minha vida.

A **todos os meus familiares**, por todo carinho, amor e incentivo a mim dispensados.

Aos meus amigos **João e Diego**, pela amizade e estímulo. Pelos bons momentos compartilhados nesses últimos anos.

Dez leis para ser feliz

Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes,
mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo.

E que posso evitar que ela vá à falência.

Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver,
apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.

Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas
e se tornar autor da própria história.

É atravessar desertos fora de si,
mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma.

É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.

Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.

É saber falar de si mesmo.

É ter coragem para ouvir um “não”.

É ter segurança para receber uma crítica,
mesmo que injusta.

AUGUSTO CURY

RESUMO

Silva, R.R. Avaliação de IL-17A e IL-22 associada aos parâmetros clínicos e laboratoriais em pacientes portadores de anemia falciforme com e sem úlcera de membros inferiores. 2013. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

As úlceras de membros inferiores (UMIs) representam uma das causas principais de morbidade na anemia falciforme (AF). Esta manifestação tem sido relacionada a hemólise, predisposição e inflamação que acarretam a secreção de citocinas. Neste contexto, nosso estudo objetivou avaliar citocinas relacionadas a via Th17 (IL-6, IL-17A, IL-22 e IL-23) no soro e em sobrenadantes de cultura de células mononucleares periféricas com e sem estimulação linfoproliferativa (anti-human CD3 e anti-human CD-28). Os níveis das citocinas também foram correlacionados aos parâmetros clínicos, hematológicos e bioquímicos nos pacientes AF com e sem histórico de UMIs (AFUMI e AFSU) bem como controles sadios. Nos pacientes SCALU, os altos níveis de IL-17A foram associados a ausência da síndrome torácica aguda (STA, $p=0.0328$). Os outros parâmetros clínicos analisados (osteonecrose, priapismo, esplenectomia e histórico de transfusão de sangue) não foram significativamente relacionados com outros níveis de citocinas. Nos pacientes AFUMI foi observado que os níveis aumentados de IL-17A foram associados aos altos níveis de LDH ($p = 0.0130$), o mesmo padrão de associação foi encontrado na IL-6 (0.0160) e IL-22 ($p=0.0165$) no mesmo grupo. Interessantemente, não encontramos correlações estatísticas no grupo AFSU. Os outros parâmetros hematológicos (hemoglobina, contagem de leucócitos e reticulócitos) e bilirrubina indireta não mostraram nenhuma correlação com as citocinas analisadas. Então, pela primeira vez, mostramos que a IL-17A presente nos pacientes AFUMI pode exercer um papel preventivo no desenvolvimento da STA. Além do mais, IL-6, IL-17A e IL-22 acompanharam os níveis de LDH apenas nos pacientes AFUMI sugerindo como marcadores adicionais a hemólise ou estar relacionados com a resposta imune contra patógenos extracelulares.

Palavras-chave: anemia falciforme, úlceras de membros inferiores, citocinas, inflamação, vaso-oclusão.

ABSTRACT

SILVA, R.R. Evaluation of IL-17A and IL-22 associated with clinical and laboratory parameters in patients with sickle cell disease with and without leg ulcers. 2013. Dissertation (Master Degree). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Leg ulcers (LUs) represent one of the main causes of morbidity in sickle cell anemia (SCA). This manifestation has been related to hemolysis, infections predisposition and inflammation that leads cytokines secretion. In this context, our study aimed to evaluate Th17 related cytokines (IL-6, IL-17A, IL-22 and IL-23) in serum and peripheral mononuclear cells culture supernatants with and without lymphoproliferative stimulation (anti-human CD3 and anti-human CD28). The cytokines levels were also correlated to clinical, hematological and biochemical parameters in SCA patients with and without LUs history (SCALU and SCAWH) as well in healthy controls. In SCALU patients, high levels of IL-17A were associated with absence of acute chest syndrome (ACS, $p=0.0328$). The other clinical parameters analyzed (osteonecrosis, stroke, priapism, splenectomy and blood transfusions history) were not significantly related with other cytokine levels. In SCALU patients was also observed that IL-17A increased levels were associated with high levels of LDH ($p = 0.0130$), the same association pattern was found for IL-6 (0.0160) and IL-22 ($p=0.0165$) in the SCALU group. Interestingly, we did not find statistical correlations with this parameters in SCAWH group. The other hematological parameters (hemoglobin, leucocyte and reticulocyte count) and indirect bilirubin did not show any correlation with analyzed cytokines in both groups. So, for the first time, we show that IL-17A present in SCALU patients may exert a preventive role in the ACS development. Furthermore, IL-6, IL-17A and IL-22 accompanied the LDH levels only in SCALU patients suggesting to serve as additional markers of hemolysis or be related with immunity response against extracellular pathogens.

Keywords: *sickle cell anemia, leg ulcer, cytokines, inflammation, hemolysis, vaso-occlusion*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: A mutação pontual no gene da cadeia beta globínica, as alterações na característica das hemácias e o favorecimento aos dois principais eventos na anemia falciforme: a hemólise e a vaso-occlusão. RBC, hemácias; R, reticulócitos; EC, células endoteliais, ISC, isquemia, N, neutrófilos. **Fonte:** Adaptado STEINBERG, 2006.

Figura 2: Aparência das úlceras de membros inferiores. Nota-se a despigmentação da pele nas úlceras cicatrizadas na região maleolar média direita e pequenos satélites de úlceras em torno da lesão na região maleolar média esquerda, bem como, pigmentação irregular, áreas atróficas e cicatrizes curadas. **Fonte:** Adaptado SERJEANT, 2005.

Figura 3: A inflamação e o processo vaso-oclusivo. A hemólise contribui para a diminuição do óxido nítrico, favorecendo a vasoconstricção. Hemácias falcizadas e reticulócitos se ligam por meio de ligantes específicos as células endoteliais além da expressão de moléculas de adesão celular aos leucócitos. Também há a participação do estresse oxidativo, a expressão de citocinas e quimiocinas e o recrutamento de leucócitos para os sítios de inflamação. RBC, hemácias; R, reticulócitos; EC, células endoteliais, ISC, isquemia. **Fonte:** Adaptado STEINBERG, 2006.

Figura 4: Subtipos de linfócitos. Os sinais de citocinas e antígenos específicos induzem a diferenciação das células T naíve em vários subtipos de Th (Th1, Th2 e Th17). Enquanto estes subtipos produzem padrões de citocinas que induzem a imunidade, as células Treg, naturalmente com Foxp3⁺ induzido, secretam mediadores antiinflamatórios com a IL-10 e TGF- β que mantêm a tolerância imunológica e a homeostase imune. **Fonte:** Adaptado AWASTHI, 2009.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estudo de citocinas pesquisadas em pacientes falciformes em estado clínico estável (*steady-state*, SS) e em crise vaso-oclusiva (CVO) ao longo do tempo.

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

$\alpha 4\beta 1$	Alfa 4 Beta 1 integrina
AAT	Alfa-1-antitripsina
AF	Anemia falciforme
AGP	Alfa-1-ácido-glicoproteína
AMG	Alfa-2-macroglobulina
AVC	Acidente Vascular Cerebral
CCL	Ligante da quimiocina2 (Do inglês, chemokine (C-C motif) ligand)
CD	Grupo de Diferenciação (Do inglês, Cluster of Differentiation)
CD18	Receptor de superfície celular em neutrófilos
CD36	Receptor de adesão de eritrócitos
CD4+	Grupo de Diferenciação 8 (Do inglês, Cluster of Differentiation 8)
CD8+	Grupo de Diferenciação 4 (Do inglês, Cluster of Differentiation 4)
CER	Ceruloplasmina
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
COX-2	Cicloxigenase-2
CVO	Crise vaso-oclusiva
CXCL1	Ligante da quimiocina1
DEPC	Dietilpirocarbonato
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido Etileno-Diamino-Tetra-Acético
ELISA	Ensaio de Enzima Imunoabsorvente Ligada à Enzima
ET-1	Endotelina-1
FoxP3	Forkhead BOX P3
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos (Do inglês, Fibroblast Growth Factor)
GAG	Guanina-Adenina-Guanina
Glu6	Acido glutâmico na sexta posição do gene
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (Do inglês, Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor)
GTG	Guanina-Timina-Guanina

Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina A
HbS	Hemoglobina S
HbSS	Genótipo da Anemia Falciforme
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HGF	Fator de Crescimento de Hepatócitos (Do inglês, Hepatocyte Growth Factor)
Hm	Hemácias
HO-1	Heme oxigenase-1
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance (Do inglês, High-performance Liquid Chromatography)
HPT	Haptoglobina
Ht	Hematócrito
HU	Hidroxiuréia
IFN- γ	Interferon Gama
IL	Interleucina
RA	Antagonista de receptor
iNOS	Oxido nítrico sintase induzida (Do inglês, Induced Nitric Oxide Synthase)
kDA	kilodaltons
LDH	Lactato Desidrogenase
LPS	Lipopolisacarídeo
MAC-1	Antígeno 1 de macrófago (Do inglês, Macrophage-1 antigen)
MCP-1	Proteína quimiotática do monócito (Do inglês, Monocyte chemoattractant protein-1)
MIP-1	Proteína inflamatória do macrófago (Do inglês, Macrophage Inflammatory Protein)
MIP-1 α	Proteína inflamatória alfa do macrófago (Do inglês, Macrophage Inflammatory α Protein)
MMP13	Matriz da metalopeptidase 13 (Do inglês, Matrix Metallopeptidase 13)
MMP3	Matriz da metalopeptidase3 (Do inglês, matrix metallopeptidase 3)
MNCs	Células mononucleares (Do inglês, Mononuclear Cells)

NP	Neopterin
PBMCs	Células Mononucleares de Sangue Periférico (Do inglês, Peripheral Blood Mononuclear Cells)
PCR	Proteína C Reativa
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase (Do inglês, Polymerase Chain Reaction)
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta (Do inglês, Platelet-Derived Growth Factor)
PGE2	Prostaglandina E2
PHA	Fitohemaglutinina (Do inglês, Phytohaemagglutinin)
Plaq	Plaquetas
Ret	Reticulócitos
RNA	Ácido Ribonucléico (Do inglês, Ribonucleic Acid)
RNA _m	RNA mensageiro
ROR- γ T	Receptor Órfão Relacionado ao Ácido Retinóico (Do inglês, Retinoid-Related Orphan Receptor Gamma T)
RT-PCR	PCR em Tempo Real (Do inglês, Real-Time PCR)
sIL-2R	Receptor de IL-2 solúvel (Do inglês, soluble IL-2 receptor)
steady-state	Estado Clínico Estável da Doença
Naïve	Imaturo
reg	Regulatório
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TFR	Transferrina
TGF- β	Fator de Crescimento Transformante β (Do inglês, Transforming growth factor)
Th	T auxiliar (Do inglês, Helper)
TNF	Fator de necrose tumoral (Do inglês, Tumor Necrosis Factor)
Val6	Valina na sexta posição do gene
VCAM-1	Molécula de adesão de celular vascular (Do inglês, vascular cell adhesion molecule 1).
VCM	Volume Corpuscular Médio
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (Do inglês, Vascular Endothelial Growth Factor).

LISTA DE SÍMBOLOS

β^6	6º posição do gene β
$\rightarrow$	Substituição
+	Positivo
pg/ml	Picogramas por mililitro
μ g/ml	Microgramas por mililitro

Sumário

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	22
2.1	Geral	22
2.2	Específicos	22
3	REVISÃO DE LITERATURA	23
3.1	Anemia Falciforme.....	23
3.2	Úlceras de Membros Inferiores	24
3.3	O processo vaso-oclusivo e a inflamação na anemia falciforme	25
3.4	As Respostas Imunes e a Via Th17	27
3.5	Citocinas e Outras Proteínas Envolvidas na Anemia Falciforme.....	30
4	JUSTIFICATIVA	40
5	METODOLOGIA.....	41
5.1	Local do Estudo	41
5.2	Considerações Éticas	41
5.3	Avaliação dos Aspectos Clínicos dos Pacientes com Anemia Falciforme	41
5.3.1	Critérios de Inclusão & Exclusão	41
5.4	Seleção de Pacientes	42
5.5	Coleta de amostras de sangue periférico	42
5.6	Separação de Soros das Amostras	42
5.7	Cultura Celular de PBMCs de Pacientes com Anemia Falciforme e Controles Sadios.....	43
5.7.1	Contagem Celular.....	43
5.7.2	Condições e Incubação de Células Mononucleares.....	43
5.8	Coleta de Sobrenadante de Cultura de PBMCs.....	43
5.9	Quantificação de Citocinas e Leitura.....	44
5.10	Análise Hematológica	44
5.11	Análise Bioquímica.....	44
5.12	Organização de Dados e Análise Estatística	44
6	RESULTADOS	46
6.1	ARTIGO 1	46
7	DISCUSSÃO	83

8	CONCLUSÃO	86
9	REFERÊNCIAS	86
11	APÊNDICES	95
12	ANEXO	119

1 INTRODUÇÃO

A anemia falciforme é uma doença causada por uma mutação pontual no gene da globina β (HBB; β^6 GAG→GTG; glu6→val6). Esse evento monogênico resulta na síntese de uma hemoglobina (Hb) anormal: a HbS (Steinberg, 2008). As hemácias contendo a HbS se tornam rígidas (falcizadas) e dificilmente passam por vasos sanguíneos de pequeno calibre acarretando crises vaso-oclusivas. Fisiopatologicamente, dentre vários sintomas da anemia falciforme, as úlceras de membros inferiores têm sido pouco exploradas (Stuart et al., 2004).

Estas úlceras são uma das causas de morbidade na anemia falciforme visto que, são feridas que afetam regiões essenciais ao movimento do indivíduo (Serjeant et al., 2005). Os locais mais afetados são: o tornozelo, dorso do pé e o calcanhar. Estudos relatam que a causa seria a insuficiência venosa na região do tornozelo que favorece processos vaso-oclusivos ou vice-versa (Mohan et al, 2000). Outros estudos sugerem a influência da hemólise na diminuição do oxido nítrico disponível no plasma, aumentando a vasoconstrição e obstruindo o lúmen vascular nos locais mais frequentes de surgimento destas úlceras, contribuindo para o retardo da cura e o aumento de recidivas (Kato, 2007). Os leucócitos contribuem para vaso-oclusão estimulando o endotélio vascular a aumentar a expressão de ligantes e causando danos teciduais e reações inflamatórias. Em resposta ao estresse, as citocinas são liberadas por diversos tipos celulares e por si só levam a liberação de outras citocinas que aumentam o estresse oxidativo levando a inflamação crônica (Makis et al., 2000).

Funcionalmente, as citocinas são subdivididas em tipo 1 e 2 baseadas nos tipos celulares que produzem estas citocinas: os linfócitos t auxiliares (Th) (Awasthi, 2009). Algumas citocinas foram encontradas no soro de indivíduos com anemia falciforme tanto em um estado clínico estável (*steady-state*) quanto em crises vaso-oclusivas (Graido-Gonzalez et al., 1998, Taylor et al, 1999) embora não exista uma predominância entre os tipos 1 e 2 na anemia falciforme pois variam de acordo com a condição clínica de cada indivíduo. Com o advento dos estudos imunológicos, outro grupo de células Th foi descoberto: as Th17

(Park, et al., 2005). Segundo pesquisas, a IL-17 bem como a IL-22, citocinas produzidas pelas células Th17, atua na autoimunidade como também no combate a patógenos extracelulares (Awasthi, 2009) porém seu aspecto na anemia falciforme tem sido pouco explorado.

Neste trabalho objetivou avaliar a participação das citocinas relacionadas a via Th17 na anemia falciforme com ênfase nos pacientes falciformes com úlceras de membros inferiores. Inicialmente avaliamos as citocinas presentes em soro e em sobrenadantes de cultura e realizamos correlações com o histórico clínico e com parâmetros laboratoriais, comumente utilizados no acompanhamento do estado clínico destes pacientes.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Verificar a expressão das citocinas envolvidas na via Th17 associado aos parâmetros clínicos, hematológicos e bioquímicos em pacientes portadores de anemia falciforme com e sem úlceras de membros inferiores.

2.2 Específicos

- I. Realizar dosagens séricas das citocinas IL-6, IL-17A, IL-22 e IL-23 em pacientes portadores de anemia falciforme com e sem úlceras de membros inferiores e de controles sadios.
- II. Realizar dosagens de IL-6, IL-17A, IL-22 e IL-23 em sobrenadantes de cultura de células mononucleares (PBMCs) estimuladas em pacientes portadores de anemia falciforme com e sem úlceras de membros inferiores e de controles sadios
- III. Relacionar os dados obtidos através das quantificações de citocinas aos parâmetros clínicos, hematológicos e bioquímicos avaliados em pacientes portadores da anemia falciforme com e sem úlceras de membros inferiores.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Anemia Falciforme

A anemia falciforme (AF) é uma doença, de caráter genético, causada por uma mutação pontual no gene da globina β (HBB), resultando na substituição do ácido glutâmico pela valina na 6ª posição do gene da cadeia β globínica (HBB; β^6 GAG→GTG; glu6→val6). Como consequência, ocorre síntese de hemoglobina anormal (HbS) ao invés da normal (HbA) (Brittenham, 1985).

A fisiopatologia da AF está centralizada na capacidade de polimerização da HbS desoxigenada. Quando em baixas condições de oxigênio, a HbS pode formar estruturas filamentosas que se depositam nas hemácias, tornando-as rígidas, modificando sua morfologia (falcização) e diminuindo sua vida média (Poilon, 1998).

A forma anormal deste eritrócito falciforme aliada à viscosidade aumentada e a tendência a aderir às células do endotélio, favorece a ocorrência de dois mecanismos patológicos principais: a hemólise e a vaso-oclusão (Figura 1). Embora, a nível molecular a AF esteja bem caracterizada, a doença apresenta uma grande variabilidade clínica (Stuart & Nagel, 2004; Platt, 2000).

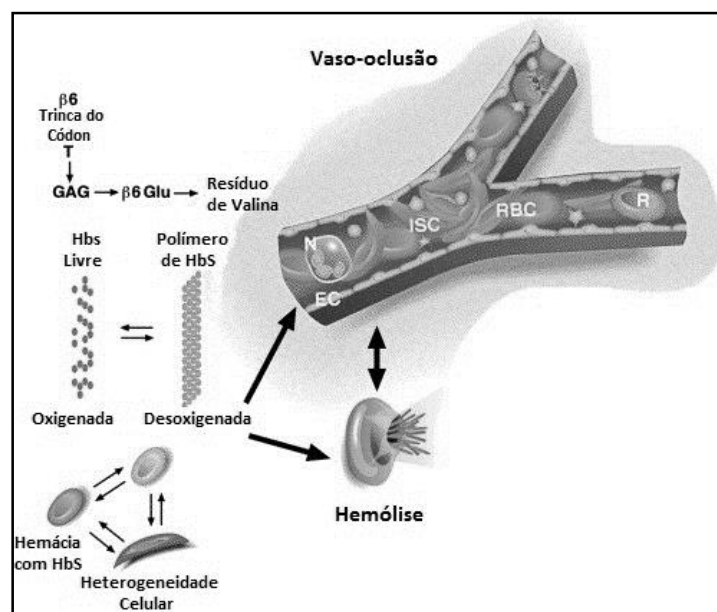


Figura 1: A mutação pontual no gene da cadeia beta globínica, as alterações na característica das hemácias e o favorecimento aos dois principais eventos na anemia falciforme: a hemólise e a vaso-oclusão. RBC, hemácias; R, reticulócitos; EC, células endoteliais, ISC, isquemia, N, neutrófilos. **Fonte:** Adaptado de STEINBERG, 2006.

A anemia crônica, icterícia, hepatoesplenomegalia e alterações ósseas podem ser atribuídas à hemólise. Os eventos vaso-oclusivos podem gerar, de acordo com o local envolvido: dor abdominal, necrose asséptica da cabeça do fêmur (osteonecrose), priapismo, artralgia, dactilite, hipostenúria, hematúria, acidente vascular cerebral (AVC), retinopatias e úlceras de membros inferiores (Steinberg, 2008). Além disso, o fenômeno vaso-oclusivo pode levar à destruição progressiva do baço e conseqüentemente à auto-esplenectomia, sendo responsável pela susceptibilidade aumentada a infecções graves, que estão entre as principais causas de morte em todas as idades nesses indivíduos (Chies & Nardi, 2010).

No estado de Pernambuco, a anemia falciforme afeta 1/1.400 nascidos vivos (Ministério da Saúde, 2008). O Hospital de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco, referência estadual no acompanhamento de doenças hematológicas. Atualmente esta instituição atende 1.500 pacientes entre crianças e adultos com anemia falciforme e destes estima-se que 10% desenvolvem úlceras de membros inferiores (UMIs).

3.2 Úlceras de Membros Inferiores

As úlceras de membros inferiores (UMIs) aparecem como uma condição debilitante nos indivíduos portadores da anemia falciforme, pois limitam a capacidade de andar bem como, são caracterizadas pela vermelhidão, intensas dores locais, descaracterização de epitélio local, de difícil cicatrização e recidivas freqüentes (Serjeant et al., 2005) (Figura 2).

Uma vez desenvolvida, as úlceras nestes pacientes possuem um processo de cicatrização bastante lento. Quando cicatrizadas, podem reaparecer num intervalo de um ano (Halabi-Tawill et al., 2007). Sugere-se que a causa

desta condição seja a insuficiência venosa local na drenagem do sangue, favorecendo o aparecimento destas úlceras (Mohan, 2000). A incidência de surgimento das úlceras é maior a partir dos 10 anos de idade, é influenciada em mais de 90% dos casos por lesões traumáticas, e em alguns casos, de forma espontânea (Sergeant, 2005). A prevalência destas úlceras em indivíduos falciformes é variável de acordo com a localização geográfica sendo maior que 75% na Jamaica, entre 8 a 10% na América do Norte e aproximadamente 22% no Brasil (Minniti, 2011; Meneses, 2010). A variabilidade destas razões podem ser explicadas devido a falhas de notificação de novos casos, variação fenotípica, ambiental e diferentes fatores sócio-econômicos (Serjeant, 1992).



Figura 2: Aparência das úlceras de membros inferiores. Nota-se a despigmentação da pele nas úlceras cicatrizadas na região maleolar média direita e pequenos satélites de úlceras em torno da lesão na região maleolar média esquerda, bem como, pigmentação irregular, áreas atróficas e cicatrizes curadas. **Fonte:** SERJEANT, 2005.

3.3 O processo vaso-oclusivo e a inflamação na anemia falciforme

O processo de vaso-oclusão compreende múltiplos passos. É resultado de um ambiente complexo envolvendo interações de diferentes tipos celulares: células falcizadas densas, reticulócitos, leucócitos ativados, células endoteliais anormalmente ativadas (Solovey et al., 1997), plaquetas e proteínas plasmáticas (Kasschau et al., 1996; De Franceschi & Corrocher, 2004).

Destaca-se também que a anemia falciforme caracteriza-se por manifestações inflamatórias crônicas que comprovam que os leucócitos influenciam em algumas das manifestações clínicas da AF (Chies & Nardi, 2010; Zago e Pinto, 2007). Os leucócitos aderem à parede dos vasos sanguíneos promovendo agregação de outras células sanguíneas com efetivo bloqueio do lúmen vascular, estimulando o endotélio na expressão de ligantes para moléculas de adesão nas células sanguíneas e causando dano tecidual e reação inflamatória, os quais predispõem a vaso-oclusão (Miller et al., 2000; Frenette, 2002) (Figura 3).

A ativação e o aumento do número de leucócitos são importantes mediadores da inflamação na anemia falciforme (Belcher et al., 2000; Lard et al., 1999). Os leucócitos podem aderir a outras células como, eritrócitos falcizados ou não, plaquetas e à parede do vaso sanguíneo (figura 3) podendo ter um papel central no desenvolvimento da oclusão vascular (Okpala, 2006).

As interações moleculares, responsáveis pela adesão de hemácias falcizadas e pelos leucócitos ao endotélio, são mediadas por moléculas de adesão na superfície das células, como particularmente as integrinas e por moléculas de adesão celular vascular 1 (VCAM-1), presentes nas células endoteliais. Nos eritrócitos, as principais moléculas de adesão são as integrinas ($\alpha 4\beta 1$) e o receptor de adesão CD36, enquanto nos leucócitos são as integrinas antígeno 1 de macrófago (MAC-1) e o antígeno 1 de função associada aos leucócitos (LFA-1), capazes de se ligarem aos componentes da matriz extracelular e às camadas endoteliais (Solovey et al, 2001, Makis et al. 2000).

As vaso-oclusões decorrentes de processos de isquemia, injúria e consequente ativação do endotélio devido ao estresse oxidativo, induzem a contínuas respostas inflamatórias na anemia falciforme que se propagam por níveis elevados de citocinas. (Chiang e Frenette, 2005; Conran et al., 2009).

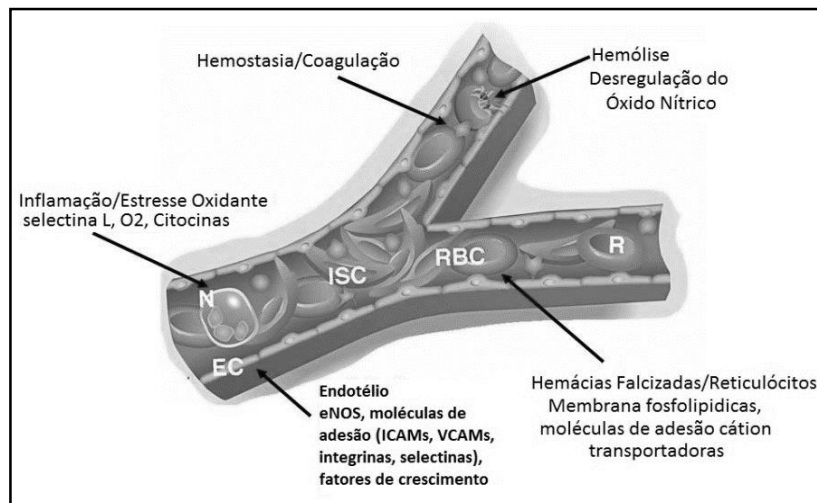


Figura 3: A inflamação e o processo vaso-oclusivo. A hemólise contribui para a diminuição do óxido nítrico, favorecendo a vaso-oclusão. Hemácias falcizadas e reticulócitos se ligam por meio de ligantes específicos às células endoteliais além da expressão de moléculas de adesão celular aos leucócitos. Também há a participação do estresse oxidativo, a expressão de citocinas e quimiocinas e o recrutamento de leucócitos para os sítios de inflamação. **Fonte:** STEINBERG, 2006.

3.4 As Respostas Imunes e a Via Th17

As células T são um conjunto de células divididas em TCD4⁺ e TCD8⁺ (citotóxicas) que tem o objetivo de combater patógenos. Inicialmente as células TCD4⁺ depois de produzidas no timo e amadurecidas nos órgãos linfoides secundários (baço e linfonodos), são denominadas de naíve devido à ausência de contato inicial com antígenos não-próprios. (Abbas et al., 2008).

A partir da indução de citocinas, estas sofrem diferenciação sendo denominadas de células ou linfócitos T helper (Th) ou auxiliar. Cada célula subgrupo Th possui uma produção diferenciada de moléculas efetoras, perfil de migração e recrutamento de outros leucócitos nas respostas imunes. Podem ser divididas em: Th1, Th2, Th17 e Treg (Awasthi, 2009). Ver figura 4.

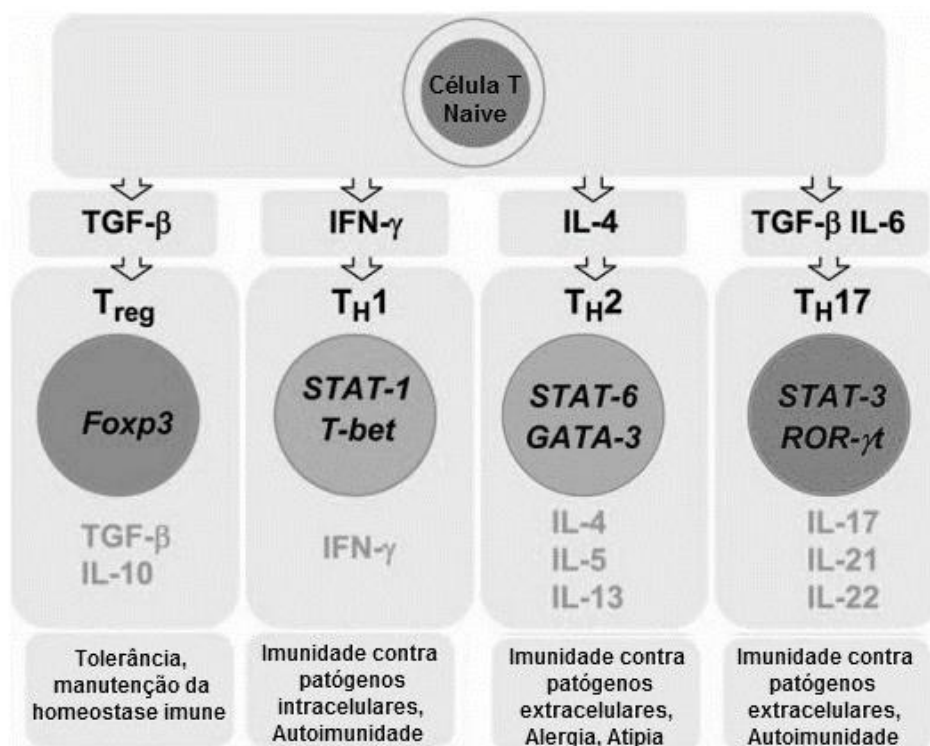


Figura 4: Subtipos de linfócitos. Os sinais de citocinas e antígenos específicos induzem a diferenciação das células T naive em vários subtipos de Th (Th1, Th2 e Th17). Enquanto estes subtipos produzem padrões de citocinas que induzem a imunidade, as células Treg, naturalmente com Foxp3^+ induzido, secretam mediadores antiinflamatórios com a IL-10 e TGF- β que mantêm a tolerância imunológica e a homeostase imune. **Fonte:** AWASTHI, 2009.

As células Th1, caracteristicamente produzem IFN γ e recrutam linfócitos T CD8 $^+$ nas respostas contra patógenos intracelulares (vírus). As células Th2 produzem IL-4 e conduzem a imunidade sistêmica (humoral) contra patógenos extracelulares e nas alergias (Hobbs, 1997). As células Th17, produtoras principalmente de IL-17(A-F) e IL-22, possuem como fator de transcrição nuclear o ROR γ t e diferenciam-se a partir das células T naive induzida por TGF- β e IL-6, com a resposta imune mantida pela IL-23 (Spolski & Leonard, 2009).

As citocinas IL-17 e IL-22 são pró-inflamatórias que foram implicadas na regulação de uma grande quantidade de genes, como aqueles que codificam para outras citocinas pró-inflamatórias, quimioquinas, ou metaloproteinasas. Estas citocinas ativam também vários outros mediadores inflamatórios, como a

ciclooxigenase2 (COX-2) e a prostaglandina E2 (PGE2), que são dois dos principais mediadores da febre e da dor durante a inflamação (Park, et al., 2005).

A IL-17 também possui outra ação biológica importante na defesa microbiana interconectando as defesas mielóide e linfóide (Shen, et al., 2008; Vilas-Boas, 2010). As células Th17 têm atuado positivamente em algumas doenças seja auxiliando no processo inflamatório quanto na complementação da via Th1 enquanto têm agravado os sintomas em algumas doenças autoimunes (Tsakris, 2002). Estes dois aspectos merecem ser observados já que as úlceras de membros inferiores estão expostas a um ambiente suscetível a infecções bacterianas locais interferindo no tempo de cicatrização das mesmas (Ademiluyi, 1988). Não há estudos no contexto imunológico em relação a Th17 nas úlceras de membros inferiores.

Outra diferenciação dos linfócitos T CD4+ naive é a sua conversão em células T regulatórias naturais (nTreg) e induzidas (iTeg). As nTreg e iTeg diferenciam-se no timo e no córtex, respectivamente, e exercem um importante papel no controle supressivo tanto da imunidade inata quanto adaptativa *in vivo* (Chen et al., 2010). Estas células além de possuir um fenótipo celular CD4 (para linfócitos T helper) e CD25 (Treg), possuem como marcador específico o fator de transcrição nuclear Foxp3 (Lan et al., 2012).

Tanto a conversão para as células iTreg Foxp3+ quanto Th17 dependem das citocinas envolvidas neste processo. O TGF- β , por exemplo, está envolvido nestas duas diferenciações, porém a IL-2 está mais associada a indução da diferenciação do linfócito T CD4+ em células Treg enquanto que a IL-6 para as células Th17. A formação destes subtipos deve ser equilibrada, pois, pode haver uma quebra na homeostase imune levando ao desenvolvimento de doenças autoimunes (Lan et al., 2012; Chen et al., 2010).

A diferenciação das células T CD4+ tem sido objeto de muitas pesquisas e seu papel em outras doenças inflamatórias crônicas está sendo constantemente explorada. Os linfócitos Th17 têm contribuído negativamente em algumas doenças auto-imunes e protetoras em algumas doenças bacterianas, porém seu

papel na anemia falciforme e em relação às UMIs é pouco explorado (Park et al., 2005; Harrington et al., 2005; Xu et al., 2007).

3.5 Citocinas e Outras Proteínas Envolvidas na Anemia Falciforme

Os eventos isquêmicos decorrentes de vaso-oclusão envolvem interações intrínsecas entre as hemácias, o endotélio e os leucócitos. Essas interações regulam a secreção de citocinas secretadas por células endoteliais e linfócitos t que consequentemente estão envolvidas no desenvolvimento das crises vaso-oclusivas na anemia falciforme (Makis, 2000).

Estudos também mostram que a susceptibilidade a infecções na anemia falciforme está relacionada a deficiência de células T para combater patógenos extracelulares. Os linfócitos T CD4⁺ são classificados de acordo com o tipo de citocinas que produzem. O Th1 ou Th2 exercem papel crucial na eliminação de infecções e nas repostas inflamatórias. Os linfócitos Th1 realizam a imunidade contra patógenos intracelulares secretando IL-2, IL-12 e IFN- γ enquanto os linfócitos Th2 programam a eliminação de patógenos extracelulares, secretando citocinas como IL-10, IL-4 e IL-13. (Protonotariou, 2003).

Acredita-se que o equilíbrio destas respostas de pelos linfócitos Th1/Th2 exerça um papel importante na resposta imune efetiva, que estão presentes desde condições subclínicas (*steady-state*) até as mais graves como as crises vaso-oclusivas na AF (Pathare et al., 2004; Musa et al., 2010).

Francis, et al. avaliou o fator de necrose tumoral (TNF) e a IL-1 α através de dosagens plasmáticas para determinar se estas citocinas estariam envolvidas na patogênese da AF. A presença do TNF foi encontrada em 86% dos pacientes em condições estáveis, 68% em crise vaso-oclusiva (CVO). Apenas 37% dos controles tiveram IL-1 α elevada. Este grupo sugeriu principalmente que o TNF poderia ter um papel indireto na AF (Francis, et al. 1992).

Em 1995, Taylor e colaboradores avaliaram a IL-6 sérica em pacientes com AF em estado estável (n=27) e em controles sadios (n=19). Os níveis desta

citocina foram significativamente elevados nos pacientes AF em relação a controles sadios (Taylor et al. 1995).

O mesmo pesquisador (Taylor, et al) em 1997, realizou dosagens séricas de citocinas (IL-4, IL-6 e IL-10) em crianças com AF em *steady-state* com o objetivo de revelar que mesmo em condições subclínicas poderia haver expressão relevante nestes pacientes. Seis (13%) de 45 pacientes com anemia falciforme mostraram elevados níveis de IL-4 e apenas 1 (2%) em 45 controles sadios. Os níveis de IL-6 foram encontrados em 35 (78%) de 45 enquanto que em controles normais, 12 (41%) de 29. Da mesma forma, a IL-10 foi encontrada em 13 (41%) de 32 amostras e apenas 1 (4%) em 25 amostras normais. Os níveis detectáveis destas citocinas foram significativamente mais altos em relação ao grupo controle. Este estudo lançou a hipótese de que os níveis circulantes destas citocinas podem representar uma ativação policlonal crônica de linfócitos B ou um defeito regulatório de anticorpos. Esta produção anormal de citocinas do tipo 2 pode ser deletéria tanto para as respostas imunológicas mediadas por células quanto humorais, que resultaria no aumento do risco de morbidade na AF (Taylor et al., 1997).

Ainda em 1997, Kubividila et al., realizou também uma dosagem plasmática de TNF apenas em crianças com AF em condições estáveis objetivando encontrar níveis significantes do TNF que poderiam estar mais expressos em crianças com déficit de crescimento, com infecção ou em crises de dor. Para complementar a análise da inflamação, três proteínas de fase aguda foram dosadas: proteína C Reativa (PCR), alfa-2-macroglobulina (AMG) e ceruloplasmina (CER). Nas crianças com quadros de infecção os níveis de TNF foram significantes em relação aos que não tiveram. As crianças que tiveram elevados níveis de TNF tinham déficit de peso (46% contra 31% dos normais) e de altura (50% contra 28,6% dos normais). Este estudo sugeriu que os níveis elevados de TNF estão mais associados às crianças com AF em condições estáveis, porém com déficit de crescimento (Kubividila et al., 1997).

Em 1998, Bourantas, et al., realizou um estudo semelhante ao de Francis e Taylor, porém avaliando mais parâmetros. Este grupo realizou dosagens de citocinas séricas (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF) em indivíduos com AF (n=17)

e controles sadios (n=14) tanto de crianças quanto de adultos. Outras proteínas de fase aguda também foram quantificadas: P2-microglobulina, as cadeias leves κ e λ , proteína C-Reativa (PCR), alfa-1-ácido-glicoproteína (AGP), alfa-1-antitripsina (AAT), ceruloplasmina (CER), alfa-2-macroglobulina (AMG), haptoglobina (HPT) e transferrina (TFR). Concentrações elevadas de PCR foram vistas em 5 (29%) dos pacientes, AGP em 3 (17%), AAT em 8 (47%), CER em 2 (11%), AMG em 14 (82%) e diminuição da HPT e TFR em 11 (64%) e 9 (53%) respectivamente. Dentre as citocinas dosadas neste estudo, apenas a IL-6 e a presença do sIL-2R foi significativamente elevada em relação aos controles sadios. Os dados observados pelo grupo sugeriram que as expressões destas proteínas resultam de processos inflamatórios subclínicos em eventos vaso-oclusivos do qual a IL-6 pode exercer importante papel. Apesar dos níveis observados de sIL-2R, não foi possível atestar as causas destes resultados (Bourantas et al., 1998).

Graido-Gonzalez et al., realizou dosagens plasmáticas em pacientes adultos com AF com crises agudas de dor e pós-crise/assintomático (13SS e 11 controles sadios). Este estudo avaliou-se as citocinas inflamatórias: TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8 e a antiinflamatória: IL-10. Além disso, avaliou se também a presença de mediadores inflamatórios como a prostaglandina E2 (PGE2) e a endotelina-1 (ET-1), um potente agente vasoconstrictor liberado pelas células endoteliais. A ET-1 plasmática foi significativamente elevada nos pacientes em crise e pós-crise em relação aos controles sadios. O comportamento da PGE2 foi semelhante ao da ET-1 diferentemente dos níveis de IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-10 que não diferiram entre os pacientes AF e os controles. Apenas o TNF e a IL-10 permaneceram mais altos que os controles durante e após crises, porém permaneceram entre os indivíduos AF mesmo após o período de recuperação pós-crise. Sugere-se que a presença dos mediadores de vasoconstrição (ET-1) e inflamação (PGE2) pode exercer um papel importante nos mecanismos de isquemia e inflamação que iniciam e sustentam o dor nas crises. Os efeitos sub-reguladores da PGE2 na função da imunidade celular poderiam contribuir no aumento da susceptibilidade a infecções observadas na anemia falciforme (Graido-Gonzalez et al., 1998).

Taylor e colaboradores fizeram outra avaliação das citocinas em soro de pacientes com AF em *steady-state* (n=56) e 58 controles. Neste estudo, foram dosadas: IL-1, IL-2, IL-12 e IFN- γ e o sIL-2R para detectar *in vivo* a produção de citocinas do tipo 1 e a presença do receptor de IL-2. Apenas o sIL-2R foi significativamente maior comparado aos controles sadios enquanto marcadores de ativação imune como o sIL-2R que é produzido por células que medeiam as respostas de defesa a infecções ou estímulos inflamatórios (Taylor et al., 1999).

Em 2000, o estudo de Abboud procurou associar a expressão de citocinas a sintomas na doença falciforme. A pesquisa objetivou determinar se a IL-8, IL-1 β , TNF e o G-CSF exerceriam um papel no desenvolvimento da STA em adultos e crianças com doença falciforme. Os níveis séricos de IL-8 foram significativamente maiores entre os pacientes com STA do que no grupo controle. A IL-1 β e o TNF ao tiveram significância estatística em relação aos dois grupos. O G-CSF foi indetectável sericamente em ambos os grupos. A IL-8 e o G-CSF, no entanto, estavam aumentados nos pacientes falciformes em outro tipo de amostra também avaliada: alíquotas de lavagens brônquicas de crianças falciformes e controles adultos. Estes dados sugeriram a participação destas citocinas no desenvolvimento da STA (Abboud et al, 2000).

Ainda neste ano, Ragupathy e colaboradores dosaram o TNF no plasma de crianças AF em condição estável (n=28) e 24 controles sadios além de observar a expressão em sobrenadantes de cultura de PBMCs estimulados com Fitohemaglutinina (PHA) em pacientes AF com elevados níveis de Hb Fetal. Embora em plasma os níveis plasmáticos não tenham sido significantes comparados aos controles sadios nos sobrenadantes, os níveis de TNF foram mais altos em relação aos controles. Os resultados obtidos *in vivo* sugeriram que os leucócitos levariam ao aumento da TNF nos pacientes AF (Ragupathy et al., 2000).

Wun et al. realizaram dosagens de TNF e IL-1 β em sobrenadantes de cultura de monócitos além de fenotipá-los através da citometria de fluxo. Esta pesquisa objetivou analisar a expressão de TNF e IL-1 β em *steady-state*, em crise, estimulado ou não com lipopolisacarídeo (LPS) em monócitos ativados ou

em agregados de monócitos e plaquetas entre adultos e crianças, em alguns casos, em crise. Os monócitos não estimulados de pacientes com AF expressaram mais IL-1 β e TNF quando comparados aos controles. Não houve diferenças significantes entre pacientes e controles que produziram IL-1 β em resposta ao LPS. Embora os resultados *in vitro* obtidos não tivessem significância, monócitos ativados foram encontrados em maior número nos pacientes com AF (Wun et al., 2002).

Lum, et al. observaram neutrófilos em cultura estimulados com IL-8 e observados através da citometria de fluxo em 13 pacientes AF e 12 controles sadios. O resultado deste estudo afirmou que estes neutrófilos ativam a expressão de CD18 no sangue e respondem a ativação de quimiocinas e moléculas de adesão. Isto sugere que estes neutrófilos ativados na AF podem aderir ao endotélio na inflamação, recrutando hemácias para estes sítios e contribuindo para as crises vaso-oclusivas (Lum, et al., 2004).

Pathare et al. também em 2004, realizou a análise do perfil de citocinas do tipo 1 e 2 (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, TNF e IFN γ) em pacientes AF em condições estáveis e em CVO. Os pacientes em crises mostraram elevados níveis de TNF e IL-6 quando comparados as condições clínicas estáveis. Também foi observado que em pacientes AF em condições estáveis apresentaram uma elevação significativa de IL-1 β , IL-6 e IFN γ quando comparados aos indivíduos normais. Este estudo sugeriu que as citocinas pró-inflamatórias do tipo 2 estão elevadas na fase de crise em que verifica-se também a presença de citocinas do tipo 1. Estes resultados refletem o papel perturbado do endotélio e monócitos ativados nos eventos vaso-oclusivos durante a crise na AF (Pathare et al., 2004).

A pesquisa de Rodrigues et al. (2006) avaliou o IFN γ e diferentemente dos anteriores: a IL-3 e a Neopterina (NP) nas dosagens séricas (n=35 com AF e 66 controles sadios). Eles objetivaram avaliar a possível ação das citocinas e da neopterina no metabolismo do ferro e hematopoese. A concentração de IL-3 foi mais alta nos grupos AF comparados aos controles, entretanto o mesmo não foi visto para o IFN γ . Os níveis de IL-3, HbF e NP foram significativamente mais

altos em grupos AF em relação aos controles. Os dados obtidos deste estudo sugeriram que a IL-3 estimula a hematopoese mesmo em condições estáveis e há uma ativação de macrófagos (representados pelos níveis de neoptertina) que provavelmente contribuiriam para uma condição inflamatória crônica (Rodrigues et al., 2006).

Em 2008, Bao et al., dosou citocinas em plasma e em sobrenadantes de cultura de PBMCs estimulados com PHA bem como a expressão de TNF, IL-1, IL-2 e IL-2R. O objetivo deste estudo foi verificar se a suplementação de zinco aumentaria a função dos linfócitos T, diminuindo a ativação das células do endotélio vascular, estresse oxidativo e a ligação com o fator nuclear $\kappa\beta$ em células mononucleares de pacientes com AF (n=36). Após a suplementação de zinco, as hemácias, hemoglobina, hematócrito, zinco plasmático e o poder oxidante aumentaram enquanto, o nitrato e nitrito do plasma, produtos de peroxidação lipídica, produtos de oxidação de DNA, e molécula-1 de adesão vascular estavam diminuídos no grupo de pacientes que receberam suplementação com zinco. Os pacientes que receberam zinco exibiram uma diminuição significativa no TNF induzido por LPS, na expressão de IL-1 e da ligação do fator nuclear de ligação ao DNA em mononucleares comparados com o grupo placebo. A adição do zinco *ex vivo* de células mononucleares (MNCs) de indivíduos placebo diminuiu TNF e a expressão de IL-1. A suplementação de zinco também aumentou os níveis transcricionais e proteicos de IL-2 em mononucleares estimulados com PHA. Estes resultados sugerem que doses ótimas poderiam beneficiar os pacientes AF quanto a melhora nas respostas imunes. (Bao et al., 2008).

Lanaro et al. em 2009, realizou dosagens plasmáticas de IL-8, IL-10, TNF e PGE2 e avaliou a expressão dos genes pró-inflamatórios nos pacientes adultos com AF tratados ou não com hidroxiuréia (HU). TNF, IL-8 e PGE2 atingiram níveis significantes no plasma quando comparados a controles saudáveis. A terapia da hidroxiuréia foi associada com a diminuição do TNF e o aumento da citocina anti-inflamatória plasmática: IL-10. As expressões gênicas de IFN γ , IL-10, COX-2 e iNOS permaneceram inalteradas nas células mononucleares (MNCs) embora TNF e IL-8 e a enzima protetora HO-1 foram significativamente mais altas. A

terapia com hidroxiuréia (HU) não foi associada significativamente alterada nos MNCs dos AFs embora a expressão de RNAm da COX-2 tenha diminuído. Os neutrófilos de pacientes AF também apresentaram maior expressão de IL-8, IFN γ , iNOS e HO-1 comparados aos controles sadios porém se comparados aos pacientes em terapia com HU, demonstraram baixas expressões de iNOS e IL-10 em neutrófilos. Todos estes dados observados neste estudo sugeriram que a expressão gênica e a produção de mediadores inflamatórios e antiinflamatórios estão presentes em pacientes AF em terapia com HU (Lanaro et al., 2009).

Asare et al., determinaram se a concentração de proteínas plasmáticas estaria associada ao aparecimento do acidente vascular cerebral (AVC). Por meio do sistema de ensaio de proteínas baseado em beads multiplex calorimétrico estes pesquisadores avaliaram IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL13, IL-15, IL-17, eotaxina, proteína básica para o fator de crescimento de fibrócitos, fator de crescimento estimulador de colônia granulocítica (GM-CSF), proteína indutora de IFN γ 10 kDa (IP-10), Proteína quimiotática do monócito, proteína inflamatória do macrófago (MCP-1), proteína inflamatória 1, alfa e beta do macrófago (MIP-1, MIP-1 α , MIP-1 β), fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), fator de regulação normal de linfócitos T, TNF e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Apesar de todos estes parâmetros terem sido analisados, apenas a IL-1 β demonstrou significância para este estudo. Análises associando as características relacionadas à idade e gênero demonstrou que a IL-1 β foi protetora contra o AVC, diminuindo a probabilidade nos pacientes AF (Asare et al., 2010).

Musa et al. (2010) investigaram as citocinas no soro de pacientes AF em CVO (27 em CVO, 20 em *steady-state* e 20 controles). As citocinas avaliadas foram: IL-2, IL-4 e IL-10 além de fenotipar subgrupos de linfócitos dos pacientes AF e compará-los aos controles sadios. O grupo com CVO obteve os níveis marcadamente elevados de IL-4, entre as três citocinas testadas em relação aos AF sem CVO e controles. Os pacientes com CVO também obtiveram baixos níveis de IL-10, bem como baixos índices de células T CD4 $^{+}$ e CD8 $^{+}$. Os padrões pró-inflamatórios de IL-2 não diferiram entre os grupos AF (com e sem CVO), apenas em relação aos o grupo controle. Estes resultados demonstraram a

coexistência de ambos os níveis altos e baixos das citocinas do tipo 1 e 2 bem como os níveis diminuídos nos subgrupos com CVO. Estes resultados favoreceram também um melhor entendimento do perfil do sistema imune nas crises vaso-oclusivas na AF.

Cerqueira et al. (2011) avaliou a associação entre os níveis séricos de IL-18, ácido úrico, marcadores de hemólise e moléculas inflamatórias em pacientes AF. Este estudo incluiu 45 pacientes AF adultos em estado clínico estável e sem transfusões recentes. Os níveis de IL-8 e ácido úrico foram correlacionados com marcadores de hemólise e de disfunção endotelial. Estes achados sugeriram uma provável influência de IL-18 na fisiopatologia da oclusão vascular na AF.

Em 2012, Garrido e colaboradores avaliaram se a produção de TNFSF14 estaria alterada nas doenças falciformes e se as plaquetas contribuiriam para esta produção. O TNFSF14 é uma citocina pró-trombótica e proinflamatória da superfamília do TNF, que possui um potente efeito de ativação nas células endoteliais. Foi observado que a media do TNFSF14 observado no plasma foi significativamente maior entre os pacientes AF (steady state) em comparação aos controles e também correlacionados com a ativação plaquetária

A investigação de Qari et al. (2012) examinou o pael de várias citocinas proinflamatórias, fatores de crescimento e parâmetros de coagulação em pacientes com doenças falciformes durante crises anteriormente a administração de analgésicos e pacientes em *steady-state* comparados a voluntários sadios. Os níveis de TNF plasmático foram significativamente elevados durante a crise ou em *steady-state* em relação aos controles. Surpreendentemente, os níveis de TNF foram significativamente altos em *steady-state* quando comparados aos níveis durante as crises. A IL-1 β e a IL-6 plasmática seguiram o mesmo padrão da TNF. Os níveis de IL-8 e IL-10 plasmáticos entre os pacientes falciformes não diferiram dos controles sadios. A IL-10 plasmática foi elevada em 1.5 a 2 vezes mais entre pacientes em crise ou no *steady-state* quando comparado controles. Os níveis plasmáticos dos diferentes fatores de crescimento: endotelial vascular (VEGF), de fibroblastos (FGF) ou de hepatócitos (HGF) nos pacientes

falciformes mostrou um aumento distinto seja em qualquer estado, 3 vezes maior do que o grupo controle (Qari et al., 2012)

Nos estudos anteriormente citados, verifica-se que a maior parte dos estudos em citocinas na AF são do tipo 1 e 2 (tabela 1) além de outras proteínas plasmáticas e moléculas de adesão solúveis foram bastante exploradas no entanto, verifica-se a necessidade de estudar outras citocinas como as envolvidas na via Th17, ainda pouco exploradas em pacientes AF.

Tabela 1. Estudo de citocinas pesquisadas em pacientes falciformes em estado clínico estável (*steady-state*, SS) e em crise vaso-oclusiva (CVO) ao longo do tempo.

Autores	Amostra	Estado	Citocinas pesquisadas	Ano
Francis et al.	Plasma	SS e CVO	TNF e IL-1 α	1992
Taylor et al.	Soro	SS	IL-6	1995
Taylor et al.	Soro	SS	IL-4, IL-6, IL-10	1997
Kubividila et al.	Plasma	SS	TNF	1997
Bourantas et al.	Soro	SS	TNF, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10	1998
Graido-Gonzales et al.	Plasma	CVO	TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8, e IL-10	1998
Taylor et al.	Soro	SS	IL-1, 2, 12, e IFN- γ	1999
Abboud et al.	Soro	SS e STA	G-CSF, IL-1 β , TNF, IL-8	2000
Ragupathy et al.	Plasma	SS	TNF	2000
Wun et al.	SCC	SS e CVO	TNF e IL-1 β	2002
Pathare et al.	Soro	SS e CVO	IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, TNF e IFN- γ	2004
Rodrigues et al.	Soro	SS	IFN- γ , IL-3	2006
Bao et al.	Plasma SCC	SS	TNF, IL-1, IL-2	2008
Lanaro et al.	Plasma e SCC	SS	TNF, IL-8, IL-10	2009
Asare et al.	Plasma	SS	IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, G-CSF, GM-CSF	
Musa et al.	Soro	SS e CVO	IL-2, IL-4, e IL-10	2010
Vilas-Boas et al.	Soro	SS	TGF- β , IL-17, IL-23	2010
Cerqueira et al.	Soro	SS	IL-18	2011
Garrido et al.	Plasma	SS	TNFSF14	2012
Qari	Plasma	SS e CVO	IL-1 β , IL-6, IL-8	2012

SCC, sobrenadantes de cultura celular; SS, *steady-state*; CVO, crise vaso-oclusiva; STA, síndrome torácica aguda.

4 JUSTIFICATIVA

A anemia falciforme é uma doença de grande importância epidemiológica. Segundo dados do ministério da saúde, no Brasil, mais de 8.000 indivíduos são afetados. Estima-se o nascimento entre 700 a 1.000 novos casos anuais de doenças falciformes no país. No estado de Pernambuco, a anemia falciforme afeta 1 a cada 1.400 nascidos vivos, portanto, as doenças falciformes são um problema de saúde pública no Brasil e que vem sendo estudadas por vários grupos de pesquisa.

O sistema imune apresenta grande importância na patogênese da anemia falciforme, pois foi verificado que a presença de citocinas está envolvida nos processos inflamatórios envolvidos na AF. Devido à escassez de estudos imunológicos em indivíduos com úlceras de membros inferiores, é importante este estudo de citocinas relacionadas da via Th17 (IL-6, IL-17A, IL-22 e IL-23) na busca de identificar novos fatores que possam estar associados entre os pacientes AF com úlceras de membros inferiores.

Além disso, faz-se necessário desenvolver alternativas terapêuticas visto que estas úlceras contribuem para a diminuição da qualidade de vida do indivíduo falciforme, gerando aflição, custos com tratamento, imprevisibilidade de cura e casos de aposentadoria por invalidez, tornando esta condição um desafio para novas pesquisas.

5 METODOLOGIA

5.1 Local do Estudo

Na Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE), foi realizada uma entrevista clínica no setor de coleta do hospital (tabela 1) enquanto a avaliação hematológica e bioquímica foi realizada na unidade de laboratórios especializados (UNILABE) também pertencente ao HEMOPE. No laboratório de imunomodulação e novas abordagens terapêuticas (LINAT) pertencente à Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), foram feitas as análises imunológicas.

5.2 Considerações Éticas

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do centro de Ciências da Saúde da universidade federal de Pernambuco (483/10 - CCS - UFPE) e pelo comitê de ética em pesquisa da fundação de hematologia e hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE). Todos os indivíduos que participaram do projeto estavam cientes do objetivo da pesquisa e mediante esclarecimentos verbais pelo próprio pesquisador, estes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

5.3 Avaliação dos Aspectos Clínicos dos Pacientes com Anemia Falciforme

5.3.1 Critérios de Inclusão & Exclusão

Para o grupo de pacientes com úlceras de membros inferiores (AFUMI) os critérios de inclusão foram: ser portador de anemia falciforme (HbSS), possuir idade acima de 18 anos e possuir pelo menos 1 úlcera de membro inferior em atividade (aberta). Para o grupo de pacientes sem úlceras de membros inferiores (AFSU) os critérios de inclusão foram: ser portador de anemia falciforme (HbSS), possuir idade acima de 18 anos, não possuir histórico de úlceras ou eventos semelhantes em membros inferiores. Tanto o grupo AFUMI quanto para o AFSU estavam clinicamente estáveis (*“steady-state”*), não mostrando qualquer doença sistêmica aguda que potencialmente pudesse alterar o perfil inflamatório e que não tivessem recebido transfusões em menos de 3 meses durante a coleta das amostras de sangue. Para o grupo de controles sadios, os critérios de inclusão

foram: não ser portador de anemia falciforme, ser clinicamente sadio, possuir idade acima de 18 anos, nunca ter tido eventos semelhantes a úlceras. Para efeitos de exclusão em todos os grupos, voluntários menores de 18 anos, portadores de traço falciforme (um gene afetado para HbS) ou doença falciforme (um gene afetado para HbS+ outra hemoglobina variante).

5.4 Seleção de Pacientes

Neste estudo, 86 amostras foram coletadas e selecionadas aleatoriamente sendo 66 de indivíduos com AF e 20 controles no setor de coleta do hospital da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE). Cada voluntário concordou em participar deste estudo mediante entrevista, esclarecimentos verbais e submetidos à coleta sanguínea, segundo proposto, no projeto e da aprovação dos respectivos comitês anteriormente citados. O grupo de indivíduos AF foi subdividido em 2 grupos: grupo com úlceras de membros inferiores ativas (AFUMI) com idades entre 21 a 59 anos (média = 35 anos). O grupo de indivíduos sem histórico de UMI (AFSU), com idades de 18 a 50 anos (média = 29 anos). Todos os indivíduos AF coletados estavam em condições clínicas estáveis (*“steady-state”*). Por último, o grupo formado por vinte controles sadios com idades entre 21 a 58 (média = 34 anos) sem qualquer evidência clínica e laboratorial de anemia ou infecção.

5.5 Coleta de amostras de sangue periférico

As amostras de sangue periférico foram obtidas em tubos de coleta (vacuette) contendo anticoagulantes; EDTA (2x5ml) e heparina lítica (2x9ml) além de tubos secos com gel (2x9ml).

5.6 Separação de Soros das Amostras

Para acondicionamento de amostras antes da análise de citocinas, inicialmente em soro, as amostras contidas em tubos secos com gel separador (1x5ml) foram centrifugadas à 1811 g por 10 min. Após a centrifugação, o soro foi coletado e guardado em tubos eppendorf de 1,5 ml e estocados a -80°C.

5.7 Cultura Celular de PBMCs de Pacientes com Anemia Falciforme e Controles Sadios

As amostras de sangue total contidas em 2 tubos com heparina lítica (9ml cada) foram diluídos em PBS 1X até o volume de 50 ml em tubo de fundo cônico (Falcon). Após esse processo, o sangue diluído em PBS 1X é colocado em novos tubos Falcon contendo FicollHypaque Plus (GE Healthcare – densidade 1.077) numa proporção de 2:1 e posteriormente centrifugados à 400g durante 30 minutos.

As camadas de células mononucleares obtidas a partir do Ficoll foram colocadas em novo tubo *falcon* de 50 ml e passaram por 2 lavagens com 40 ml e 30 ml respectivamente com PBS1X por período de 15 minutos cada à 350 g. Caso houvesse hemácias presentes no botão de células mononucleares após a 1º lavagem, as células foram submetidas a uma solução de lise de hemácias (RBC Lysis Buffer - Ebiosciences) durante 10 minutos e então centrifugadas novamente com a adição de 30 ml de meio RPMI 1640 (2º lavagem).

5.7.1 Contagem Celular

Após a segunda lavagem, as células mononucleares separadas foram diluídas numa concentração de 1:4 e então, contadas na câmara de Neubauer para se obter uma quantidade de 2×10^6 células.

5.7.2 Condições e Incubação de Células Mononucleares

A concentração de 2×10^6 células foi utilizada em placa de cultura de 24 poços (TPP). Determinou-se 2 condições: Condições da cultura: apenas células (48h) e estimulação de linfócitos com anti-human CD3 e anti-human CD28 (Ebioscience) nas respectivas concentrações de $2,5 \mu\text{g/mL}$ e $2,0 \mu\text{g/mL}$. Posteriormente as placas foram incubadas à 37°C em estufa de CO₂ (5%, Ultrasafe, HF 212 UV).

5.8 Coleta de Sobrenadante de Cultura de PBMCs

Após um período de 48 horas, definidas as condições, os sobrenadantes de cultura foram coletados e armazenados à -20°C.

5.9 Quantificação de Citocinas e Leitura

A quantificação de citocinas foi analisada tanto nas amostras presentes em soros quanto em sobrenadantes de cultura após período de 48h de cultivo. A metodologia aplicada para essa quantificação foi realizada por ELISA sanduíche (Sandwich Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay) analisando as seguintes citocinas: IL-6, IL-17A, IL-22 e IL-23 (BD Biosciences/Ebiosciences) de acordo com recomendações do fabricante. Os resultados colorimétricos obtidos a partir da etapa final do ELISA sanduíche foram lidos no espectrofotômetro (EL808, Biotek) na faixa de 450 e 570 nm. Os limites de detecção para a IL-17A e a IL-22 foram de 3.906 pg/ml e 7.8125 pg/ml respectivamente.

5.10 Análise Hematológica

O hemograma das amostras de sangue coletadas em tubos com EDTA foram analisadas de forma automatizada (STKS, COULTER) e depois em lâminas coradas (May-Gruenwald) e observadas por microscopia ótica. Contagem de Reticulócitos: A contagem foi feita por microscopia ótica complementando a análise hematológica esfregaços (Azul de cresil brilhante) para avaliação da atividade medular.

5.11 Análise Bioquímica

Os parâmetros de lactato desidrogenase (LDH), bilirrubinas total e indireta foram obtidos a partir do soro contidos em tubos secos com gel separador para avaliação do grau de hemólise e icterícia respectivamente (COBAS INTEGRA 400 plus, ROCHE).

5.12 Organização de Dados e Análise Estatística

Todos os dados inicialmente obtidos foram registrados em planilhas no programa Office Excel 2007. Para fins de análise estatística o método de Mann-Whitney foi utilizado para comparar os resultados encontrados de IL, 6IL,-17A e IL-22 em soro e sobrenadantes de cultura de PBMCs nos três grupos (AFUMI, AFSU e o grupo controle) e compará-los em relação aos resultados obtidos através da análise do perfil clínico. Para a associação entre os níveis destas

citocinas aos parâmetros hematológicos e bioquímicos foi utilizado o teste de correlação de Spearman. A significância do valor do método foi definida em $p < 0,05$. Os cálculos e gráficos obtidos foram realizados nos softwares Graphpad Prism versão 5.0 e no Origin versão 8.0.

6 RESULTADOS

6.1 ARTIGO 1

EVALUATION OF TH17 RELATED CYTOKINES ASSOCIATED WITH CLINICAL AND LABORATORIAL PARAMETERS IN SICKLE CELL ANEMIA PATIENTS WITH LEG ULCERS

Rafael Ramos da Silva^a, Michelly Cristiny Pereira^a, Moacyr Jesus Barreto Melo Rêgo^a, Betania Lucena Domingues Hatzlhofer^c, Aderson da Silva Araújo^c, Marcos André Cavalcanti Bezerra^c, Ivan da Rocha Pitta^{a,b}, Maira Galdino da Rocha Pitta^{a,*}

^aLaboratory of Immunomodulation and Novel Therapeutic Approaches (LINAT), Research Center for Therapeutic Innovation (NUPIT), UFPE, Recife, Brazil.

^bLaboratory of Planning and Synthesis of Drugs (LPSF), Research Center for Therapeutic Innovation (NUPIT), Recife, Brazil.

^cHematology and Hemotherapy Foundation of Pernambuco, Recife, Brazil.

*Corresponding author: Tel.: +55 81 9671-7788. E-mail: mgrpitta@gmail.com
Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), Diretoria de Inovação e Empreendedorismo. Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Rua Thereza Amélia, s/n, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil. ZIP code: 50670-901.

Abstract: Leg ulcers (LUs) represent one of the main causes of morbidity in sickle cell anemia (SCA). This manifestation has been related to hemolysis, infections predisposition and inflammation that leads cytokines secretion. In this context, our study aimed to evaluate Th17 related cytokines (IL-6, IL-17A, IL-22 and IL-23) in serum and peripheral mononuclear cells culture supernatants with and without lymphoproliferative stimulation (anti-human CD3 and anti-human CD28). The cytokines levels were also correlated to clinical, hematological and biochemical parameters in SCA patients with and without LUs history (SCALU and SCAWH) as well in healthy controls. In SCALU patients, high levels of IL-17A were associated with absence of acute chest syndrome (ACS, $p=0.0328$). The other clinical parameters analyzed (osteonecrosis, stroke, priapism, splenectomy and blood transfusions history) were not significantly related with other cytokine levels. In SCALU patients was also observed that IL-17A increased levels were associated with high levels of LDH ($p = 0.0130$), the same association pattern was found for IL-6 (0.0160) and IL-22 ($p=0.0165$) in the SCALU group. Interestingly, we did not find statistical correlations with this parameters in SCAWH group. The other hematological parameters (hemoglobin, leucocyte and reticulocyte count) and indirect bilirubin did not show any correlation with analyzed cytokines in both groups. So, for the first time, we show that IL-17A present in SCALU patients may exert a preventive role in the ACS development. Furthermore, IL-6, IL-17A and IL-22 accompanied the LDH levels only in SCALU patients suggesting to serve as

additional markers of hemolysis or be related with immunity response against extracellular pathogens.

Keywords: *sickle cell anemia, leg ulcer, cytokines, inflammation, hemolysis, vaso-occlusion*

1. Introduction

Leg ulcers (LUs) are a debilitating condition in sickle cell anemia (SCA). This manifestation represents one of the most important cases of morbidity in SCA patients [1]. The LUs usually develops in SCA patients before 10 years old and being more prevalent in African countries [2]. These ulcers usually appear in ankle region and are characterized by slow healing, frequent local pain and high number of recurrences [3]. The pathophysiology of LUs in SCA patients remains unclear. Mohan and coworkers argue that the cause is due to venous insufficiency in the regions where ulcers develop, preventing normal blood flow, causing hypoxia and tissue infarction [4].

The acute chest syndrome (ACS), osteonecrosis, priapism, stroke, blood transfusions and splenectomy represents risk factors in SCA [5] being ACS the second most common cause of hospitalization in SCA patients [6]. The ACS is characterized by fever, leucocytosis, and respiratory symptoms leading to chronic lung damages [7-9]. These clinical manifestations are involved in two main processes in sickle cell disease: hemolysis and vascular occlusion [10].

The hemolysis leads to cardiovascular, pulmonary, gastrointestinal, renal manifestations [11]. Besides leg ulcers were also related to the intensity of hemolysis [12]. These events involves vascular occlusion and inflammatory process that involves many cell types, inflammatory mediators, cell adhesion molecules and the presence of cytokines and chemokines which recruit cells to inflammatory sites and induce immune responses [13-15].

IL-17A is the hallmark cytokine of Th17 cells and has been shown to function as a proinflammatory cytokine that upregulates a number of chemokines and matrix metalloproteases, leading to the recruitment of neutrophils into sites of inflammation [16]. IL-22 is a family type II cytokine that is preferentially expressed by differentiated Th17 cells [17] and thus considered as a Th17 cytokine, but it also is expressed by other cells like CD8⁺ T cells and CD11c⁺ dendritic cells as showed by Zheng and coworkers [18]. Overall, Th17 cells produce multiple effector cytokines with partially overlapping roles in immunity. IL-23 can also directly promote Th17 differentiation by increasing ROR γ t expression in combination with IL-1 β and IL-6 [19]. IL-23 is a novel member of the IL-12 cytokine family and is composed of a unique p19 subunit and an identical p40 subunit to IL-12 whereas IL-12 drives the classical Th1 response [20, 21].

Most cytokine studies in SCA have evaluated cytokines produced by Th1 cells (IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-12) that are involved in innate immunity [22-24] and produced by Th2 cells (IL-4, IL-5,

IL-13) in humoral immunity [25, 26]. On the other hand, there are few studies associating clinical profiles to other cytokines pathway such Th17 [27, 28]. Th17 cells differentiation is driven by TGF- β and IL-6 [29, 30] and is reinforced by IL-23 [31, 32]. These cells mainly secrete IL-17 (A and F) but also produce IL-9 [33], IL-21, IL-22, IL-26, and CCL20 [34].

These mediators are responsible for a number of effector functions in host defense and in several autoimmune diseases [35].

Due to lack of studies in this context, our study analyzed if the cytokines IL-6, IL-17A, IL-22 and IL-23 were related to clinical parameters in SCA patients with LUs. For this reason, we evaluated hematological and biochemical markers to identify whether there is a relationship between the Th17 related cytokines and the laboratorial parameters in these patients.

2. Material and methods

2.1 Ethical approval

Ethics approval was obtained from ethical committee from Health Science Center of Federal University of Pernambuco and Hematology and Hemotherapy Foundation of Pernambuco (protocols 483/10 and 57/10 respectively).

2.2 Patients

All SCA patient blood samples were obtained from January 2011 to June 2012 during regular clinical visits at the Hospital of Hematology and Hemotherapy Foundation of Pernambuco (HEMOPE), Brazil. The SCA patients were divided into two groups: patients with active LUs (SCALU) and without LUs history (SCAWH). Healthy individuals were used as controls and also collected in the same place totalizing three groups. Informed written consent and the clinical questionnaire were obtained from all patients and controls. The inclusion criteria for all patients were must be at a steady-state condition and the exclusion criteria was showed no other systemic diseases could have potentially altered their inflammatory profile functions and did not receive transfusions at less than 3 months.

2.3 Isolation and culture conditions for peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

PBMCs were isolated from fresh peripheral blood collected in sodium heparin tubes, following an adapted method described previously by English et al. [36]. Briefly, whole blood was laid over one layer of Ficoll-Paque Plus (density gradient of 1.077 g/L, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) and centrifugated at 400 g for 45 min, cells were washed once in PBS (pH 7.4) before washed once more in PBS, RBC lysis buffer was used for contaminating red cells for 10 min at 4°C (Ebioscience, San Diego, CA, USA). PBMCs were incubated at 37 °C for 48 hours under two conditions: unstimulated cells and stimulated cells with anti-human CD3 and anti-human CD28 (anti-humanCD3+anti-humanCD28, Ebioscience, San Diego, CA, USA).

2.4 Cytokines measurements in serum and PBMCs culture supernatants

Serum was obtained from blood samples that were collected and centrifuged at 1258g for 15 min, and stored at -80°C . Commercially available ELISA kits were used to determine IL-6 (BD Biosciences, NJ, USA), IL-17A, IL-22 and IL-23 (Ebioscience, San Diego, CA, USA). These cytokines were evaluated on culture supernatants of PBMCs incubated during 48h with or without stimulation with anti-humanCD3+anti-humanCD28 (Ebioscience, San Diego, CA, USA). The ELISA plates were read at 450nm and 570nm (EL808, Biotek, VT, USA). Following the detection limits of each kit: IL-6 (4.69 pg/ml), IL-17A (3.91 pg/ml), IL-22 (7.81 pg/ml), IL-23 (15.62 pg/ml).

2.5 Blood samples, hematological and biochemical evaluation

Peripheral blood samples obtained from EDTA tubes were analyzed for complete blood count (STKS, Coulter) and reticulocyte count. Sera obtained tubes were used to analyze serum levels of indirect bilirubin and lactate dehydrogenase (Cobas Integra plus 400, Roche).

2.6. Statistical analysis

Mann-Whitney test was used to correlate cytokines levels with clinical parameters using Graphpad Prism software (Version 5.0). The Spearman correlation test was used for hematological and biochemical evaluation associated with cytokines levels using Origin software (Version 8.0). A p value less than 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1 Th17 related cytokines levels in serum and PBMCs culture supernatants

Firstly we evaluated IL-6, IL-17A, IL-22 and IL-23 cytokines levels in serum patients. Only a few SCALU and SCAWH patients had cytokine levels above the kit's detection limit (Supplementary figure 1). All the three analyzed groups were not significantly different regarding their cytokine levels when comparing each other ($p>0.05$). Because of these results, the association of serum cytokines levels with clinical, hematological and biochemical parameters became unfeasible. In these sense, our analysis were focused on PBMC culture supernatant. The IL-17A levels of stimulated cells were significantly higher in SCAWH group than controls (0.0195). We also observed the IL-17A high levels in SCALU group compared with controls but were not significant. The IL-6, IL-22 and IL-23 levels was no statistical significant in either group (Figure 1).

3.2 Correlation between Th17 related cytokine levels with clinical profile

The levels of IL-6, IL-17A, IL-22 and IL-23 were correlated to: acute chest syndrome, osteonecrosis, priapism, stroke, splenectomy and history of transfusions. Firstly, we determined the characterization of SCA patients (Table 1). Then we compared the possibility of associations within SCALU and SCAWH groups. In SCALU patients high levels of IL17A were associated with

absence of acute chest syndrome ($p = 0.0328$). However IL-17A levels were also more expressed in SCAWH than SCALU patients with ACS historic ($p=0.0483$). The associations of IL-17A with other parameters were not significant (Table 2). The IL-6, IL-22 and IL-23 levels were not significantly associated with any clinical parameters (Supplementary Tables 1-2).

3.3 Correlation between supernatant Th17 related cytokine levels with laboratorial parameters

The Th17 related cytokines were correlated with value of Hb (total hemoglobin), WBC (leukocyte count), Ret (reticulocyte count), LDH (lactate dehydrogenase) and IB (indirect billirubin). Only in SCALU patients was observed that increased levels of LDH were positively correlated with IL-6 ($p=0.0191$, $r^2= 0.287$), IL-17A ($p=0.0130$, $r^2= 0.419$) and IL-22 ($r^2= 0.168$) (Figure 2). The IL-23 had no positive correlation with any laboratorial parameter (data not shown). These laboratorial markers are always significantly altered comparing sickle cell anemia patients with normal controls

4. Discussion

The classical view of sickle cell anemia has been focused on the primary genetic defect that lead to hemoglobin polymerization causing red cells deformity, becoming rigid, obstructing blood flow, and producing acute and chronic tissue damage because of poor perfusion [37]. A more complete view that allows that the sticky, stiff, oxidizing sickle red cell is an irritant process that not only obstruct blood flow but also provokes an inflammatory response are mandatory [38]. Serum markers of inflammation have provided evidence for a state of chronic inflammation in SCA patients [39]. Inflammation promotes endothelial adherence to sickle erythrocytes, leukocytosis, in the absence of infection, common in SCA patients and predicts for stroke, acute chest syndrome, and overall mortality [6].

Our results Th17 related cytokines correlation showed no differences between detecting levels of IL-6, IL-17A IL-22 and IL23 in the serum of SCA patients and controls. In this latter case our result could be related with the nature appearing location of leg ulcers or the biological life time of these cytokines [40]. Levels of IL-17A obtained from stimulated cells could suggest the possible involvement of this cytokine with the main events in SCA [27]. We associated the Th17 related cytokine levels in relation to the clinical history of each SCA group.

Vilas-Boas and Coworkers [41] did not demonstrate correlation of IL-4, IL-17, IL-23 and TGF- β with clinical events in SCA patients in steady state. Our association between IL17A with clinical parameters showed an interesting result. Only in SCALU patients, the increased level of IL-17A was related with ACS. The ACS affects SCA patients from 2 years old being considered one of the most frequent complication and major cause of morbidity and mortality in SCA [7]. Data from the Clinical Course of Sickle Cell Disease Cooperative Study indicates that the ACS occurs in 10.5% of patients per year [8] where infectious agents are responsible for more than one third of cases. Extensive antibiotic therapy is usually used in this case, even when the infection does

not have a clear etiology [42]. IL-17 and IL-22 synergistically act to augment the expression of genes involved in the defense against microbial pathogens such as the β -defensin 2 gene in keratinocytes [17]. For example, an analysis of mycobacteria-specific Th17 cells in exposed humans revealed that most of these cells expressed either IL-22 or IL-17 but not both cytokines [43]. Consistent with this hypothesis, mice with targeted deletion of IL-17RA have significant defects in host defense. IL-17R signaling is critical for G-CSF and CXCL chemokine production, and IL-17R deficient mice exhibit a delay in neutrophil recruitment into the alveolar space hindering the immune response that would allow for destruction and expulsion of pathogens [44]. These data suggest that decreased levels of IL-17 could favor the risk to infection. Our associations compared to clinical parameters indicate that IL-17A may exert a preventive role in the development of ACS related to pathogens. Because the results were only found among patients with leg ulcers, possibly the action of related Th17 cytokines is antimicrobial due to predisposing factor of leg ulcers to local infections [45].

Taylor et al. hypothesized that the degree of hemolysis is a key determinant influencing a phenomic spectrum of complications that reflect the severity of sickle vasculopathy. In sickle cell disease two thirds of hemolysis occurs extravascularly, the remaining one third of red cells hemolyze intravascularly. Along with reticulocyte count, indirect bilirubin level, and serum haptoglobin, LDH has been used as a marker of hemolysis. Serum LDH is also usually elevated in sickle cell anemia in the steady state. This robust hemolytic rate increases even further during vaso-occlusive pain crisis (VOC) [46]. Our results revealing that the LDH levels positively correlated with IL-6, IL-17A and IL-22 being favorable for hemolysis. This hemolysis will lead to ischemic events involving interactions between erythrocytes, leukocytes and endothelium cells [15]. Although the levels of hemoglobin, reticulocytes, leukocytes and bilirubin are abnormal when compared to healthy controls, our results indicated that there was no positive correlation related to IL-17A and IL-22 levels

Other cause present in SCA patients with LUs is secondary bacterial infection usually regarded as inevitable and of limited importance in the persistence of LUs [47]. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*, β -hemolytic *streptococci*, and salmonellae were common in African reports [48-50], and anaerobes accounted for over half the isolations in one series [51]. Due to the presence of cytokines related to Th17 only in SCALU patients, there may be an association between these cytokines and the role of immunity against extracellular pathogens in these patients. Thus our data together shows that IL-17A and IL-22 cytokines act as biomarkers of clinical and hematological changes in patients with ACS points out some differences between SCALU and SCAWH patients that could be correlated with different clinical and biological behavior of these patients.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (Facepe), Instituto de Ciência e tecnologia – Inovação Farmacêutica (INCT_If).

REFERENCES

- 1) Serjeant GR. Leg ulceration in sickle cell anemia. *Arch Intern Med* 1974; 133: 690–694.
- 2) Akinyanju O, Akinsete I. Leg ulceration in sickle cell disease in Nigeria. *Trop Geogr* 1974; 31: 87–91.
- 3) Koshy M, Entsuh R, Koranda A, Kraus AP, Johnson R, Bellvue R, Flournoy-Gill Z, Levy P. Leg ulcers in patients with sickle cell disease. *Blood* 1989; 74: 1403–1408.
- 4) Mohan JS, Vigilance JE, Marshall, JM, Hambleton IR, Reid HL, Serjeant GR. Abnormal venous function in patients with homozygous sickle cell (SS) disease and chronic leg ulcers. *Clin Sci (Lond)* 2000; 98(6): 667-72.
- 5) Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet* 2010. 376(9757): 2018-31.
- 6) Buchanan GR, DeBaun MR, Quinn CT, Steinberg MH. Sickle cell disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2004; 35-47.
- 7) Vichinsky EP, Neumayr LD, Earles AN, ET AL. Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. *N Engl J Med* 2000; 342: 1855–65.
- 8) Castro O, Brambilla DJ, Thorington B, Reindorf CA, Scott RB, Gillette Pet AL. The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors: the Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood* 1994; 84: 643–9.
- 9) Powars D, Weidman J, Odom-Maryon T, Niland J. & Johnson C. Sickle cell chronic lung disease: prior morbidity and the risk of pulmonary failure. *Medicine* 1998; 67: 66-76.
- 10) Malowany JI, Butany J. Pathology of sickle cell disease. *Semin Diagn Pathol* 2012; 29(1): 49-55.
- 11) 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: 1653–1662.
- 12) Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev* 2007; 21(1): 37-47.

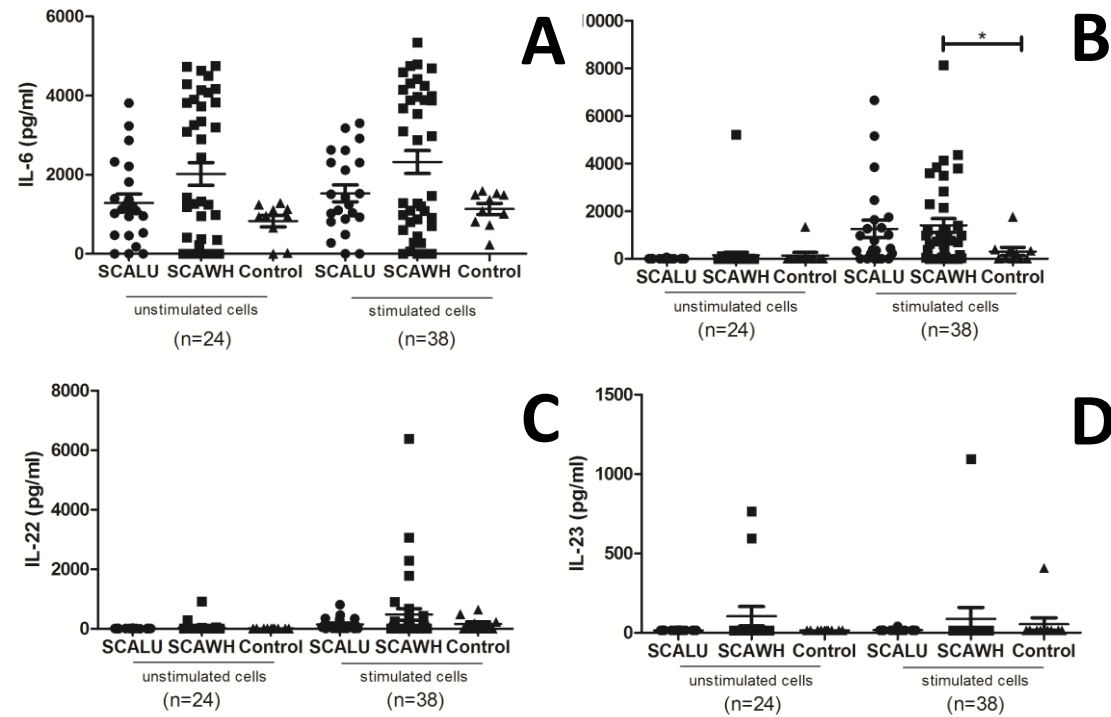
- 13) Lanaro C, Franco-Penteado CF, Albuquerque DM, Saad ST, Conran N, Costa FF. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of SCA patients and effects of hydroxyurea therapy. *J Leukoc Biol* 2009; 85(2): 235-42.
- 14) Napolitani G, Acosta-Rodriguez EV, Lanzavecchia A, Sallusto F. E2 enhances Th17 responses via modulation of IL-17 and IFN-gamma production by memory CD4+T cells. *Eur J Immunol* 2009; 39(5): 1301-12.
- 15) Makis AC, Hatzimichael EC, Bourantas KL. The role of cytokines in sickle cell disease. *Ann Hematol* 2000; 79(8): 407-413.
- 16) Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 2007; 25, 821–852.
- 17) Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser LA. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 2006; 203(10): 2271-9.
- 18) Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, Kasman I, Eastham-Anderson J, Wu J, Ouyang W. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature*. 2007; 445(7128):648-51.
- 19) Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel JE, Ramos HL, Wei L, Davidson TS, Bouladoux N, et al. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TG F- β signaling. *Nature* 2010; 467: 967–971.
- 20) Steinman, L. A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/ TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 2007; 13: 139–145.
- 21) Hunter, C. A. 2005. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 521–531.
- 22) Taylor SC, Shacks SJ, QU, Z. In vivo production of type 1 cytokines in healthy sickle cell disease patients. *J Natl Med Assoc* 1999; 91(11): 619-24.
- 23) Kuvibidila S, Gardner R, Ode D, Yu L, Lane G, WARRIER, RP. Tumor necrosis factor alpha in children with sickle cell disease in stable condition. *J Natl Med Assoc*. 1997; 89(9): 609-15.
- 24) Francis RBJR, Haywood LJ. Elevated immunoreactive tumor necrosis factor and interleukin-1 in sickle cell disease. *J Natl Med Assoc* 1992; 84(7): 611-5.
- 25) Pathare A, Al Kindi S, Alnaqdy AA, Daar S, Knox-Macaulay H, Dennison D. Cytokine profile of sickle cell disease in Oman. *Am J Hematol* 2004; 77(4): 323-8.

- 26) Taylor SC, Shacks SJ, Qu Z, Wiley P. Type 2 cytokine serum levels in healthy sickle cell disease patients. *J Natl Med Assoc* 1997; 89(11): 753-7.
- 27) Vilas-Boas W, Cerqueira BA, Zannete AM, Reis MG, Barral-Netto M, Gonçalves MS. Arginase levels and their association with Th17-related cytokines, soluble adhesion molecules (sICAM-1 and sVCAM-1) and hemolysis markers among steady-state SCA patients. *Ann Hematol.* 2010; 89(9): 877-82.
- 28) Asare K, Gee BE, Stiles JK, Wilson NO, Driss A, Quarshie A, Adams RJ, Kutlar A, Hibbert JM. Plasma interleukin-1beta concentration is associated with stroke in sickle cell disease. *Cytokine* 2010; 49(1): 39-44.
- 29) Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006; 441: 235–238.
- 30) Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, STOCKINGER B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006; 24(2):179-89.
- 31) Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, Chang SH, Wang D, Watowich SS, Dong C. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J. Biol. Chem* 2007; 282: 9358–9363.
- 32) Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, Levy DE, Leonard WJ, Littman DR. IL-6 programs TH-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat. Immunol* 2007; 8: 967–974
- 33) Beriou G, Bradshaw EM, Lozano E, Costantino CM, Hastings WD, Orban T, Elyaman W, Khoury SJ, Kuchroo VK, Baecher-Allan C, Hafler DA. TGF-beta induces IL-9 production from human Th17 cells. *J Immunol* 2010; 185(1):46-54.
- 34) Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, Basham B, Smith K, Chen T, Morel F, Lecron JC, Kastelein RA, Cua DJ, McClanahan TK, Bowman EP, de Waal Malefyt R. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 2007; 8(9): 950-7.
- 35) Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo, VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2009; 27: 485–517
- 36) English D, Andersen BR. Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque. *J Immunol Methods* 1974; 5: 249–252.

- 37) Platt OS. Preventing stroke in sickle cell anemia. *N Engl J Med* 2005; 353(26): 2743-5.
- 38) 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.
- 39) Wun T. The Role of Inflammation and Leukocytes in the Pathogenesis of Sickle Cell Disease; Haemoglobinopathy. *Hematology* 2001; 5(5): 403-412.
- 40) Tarrant JM. Blood cytokines as biomarkers of in vivo toxicity in preclinical safety assessment: considerations for their use. *Toxicol Sci.* 2010. 117(1):4-16.
- 41) Wendell Vilas Boas, Bruno A. V. Cerqueira, Angela A. D. Zanette, Mitermayer G. Reis, Marilda S. Gonçalves. Cytokines and Clinical Events In The Sickle Cell Anemia. *Gaz. méd. Bahia* 2010;80:3: 53-55
- 42) Emre U, Miller ST, Gutierrez M, Steiner P, Rao SP, Rao M. Effect of transfusion in acute chest syndrome of sickle cell disease. *J Paediatr* 1995; 127: 901–4.
- 43) Scriba TJ, Kalsdorf B, Abrahams DA, Isaacs F, Hofmeister J, Black G, Hassan HY, Wilkinson RJ, Walzl G, Gelderbloem SJ, Mahomed H, Hussey GD, Hanekom WA. Distinct, specific IL-17- and IL-22-producing CD4⁺ T cell subsets contribute to the human anti-mycobacterial immune response. *J Immunol.* 2008; 180(3): 1962-70.
- 44) Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Sch-warzenberger P, et al. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med.* 2001; 194:519–27.
- 45) Serjeant GR, Serjeant BE, Mohan JS, Clare, A. Leg ulceration in sickle cell disease: medieval medicine in a modern world. *Hematol Oncol Clin North Am* 2005; 19(5): 943-56.
- 46) Taylor JG 6TH, Nolan VG, Mendelsohn L, Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Chronic hyper-hemolysis in sickle cell anemia: association of vascular complications and mortality with less frequent vasoocclusive pain. *PLoS One* 2008; 7: 3(5): e2095: 1-9.
- 47) Charache S. Treatment of sickle cell anemia. *Annu Rev Med* 1981; 32:195–206.
- 48) Ankra-Badu GA. Sickle cell leg ulcers in Ghana. *E Afr Med J* 1992; 69:366–9.
- 49) Adedeji MO, Ukoli FAM. Haematologic factors associated with leg ulcer in sickle cell disease. *Trop Geogr Med* 1987; 39:354–6.
- 50) Oluwasanmi JO, Ofodile FA, Akinyemi OO. Leg ulcers in haemoglobinopathies. *E Afr Med J* 1980; 57:60–4.

- 51) Ademiluyi SA, Rotimi VO, Coker AO et al. The anaerobic and aerobic bacterial flora of leg ulcers in patients with sickle-cell disease. *J Infect* 1988; 17:115–20.

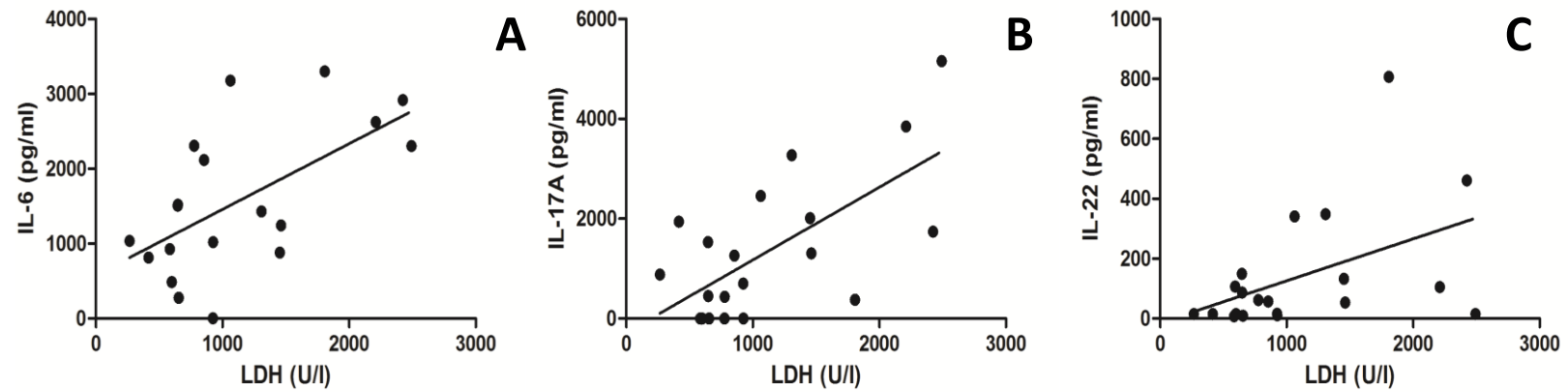
FIGURES

Figure1. Cytokine levels of IL-6, IL-17A, IL-22 and IL-23 measured in PBMCs culture supernatants.

Data presented are means (-) and $\pm$ SEM (Standard Error Mean).

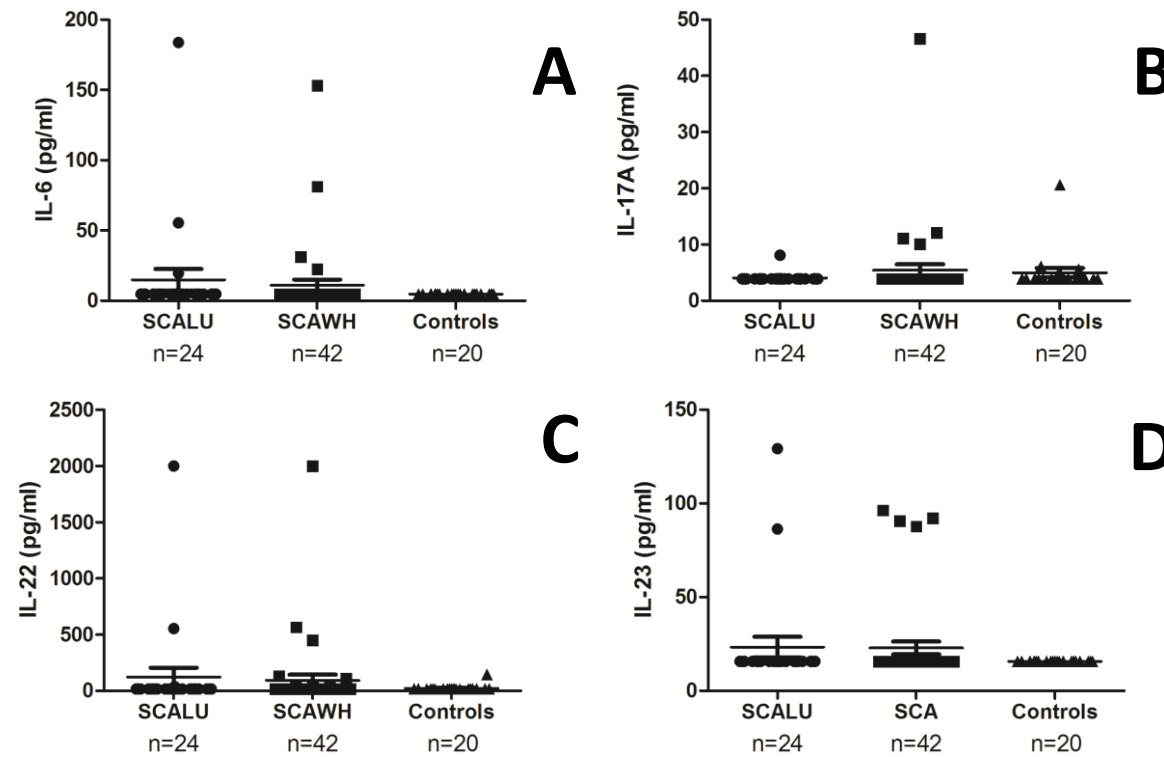
*, p value < 0.05.

Figure2. Levels of IL-6 (A), IL-17A (B) and IL-22 (C) associated with lactate dehydrogenase values founded in SCALU patients.



SUPPLEMENTARY FIGURES

Supplementary Figure 1. Th17 pathway related cytokines measurements in sera: IL-6 (A), IL-17A (B), IL-22 (C) and IL-23 (D). Data presented as means $\pm$ SEM.



Following the detection limits of each kit: IL-6 (4.69 pg/ml), IL-17A (3.91 pg/ml), IL-22 (7.81 pg/ml), IL-23 (15.62 pg/ml).

TABLES

Table1. Clinical parameters obtained from SCALU and SCAWH patients.

Clinical Parameters	SCALU (n=24)		SCAWH (n=42)		Control (n=20)
	n (%Yes)	n (%No)	n (%Yes)	n (%No)	
Male/Female	13/11		20/22		10/10
Age	35 (21-59)		31 (18-50)		34(21-58)
Osteonecrosis	8 (33)	16 (67)	6 (14,2)	36 (85,8)	-
Acute Chest Syndrome	7 (21,2)	17 (71,8)	18 (43)	24 (57)	-
Priapism•	5 (4,1)	8 (95,9)	3 (17)	15 (83)	-
Stroke	1 (0,2)	23 (95,8)	3 (7,2)	39 (92,8)	-
Splenectomy	2 (8)	22 (92)	1 (12)	41 (98)	-

- The priapism percentage was considered only for men. The values represents number of patients (%) except Male/Female value are means (min-max).

Table 2. Levels of IL-17A associated with clinical parameters in SCALU and SCAWH patients.

Clinical Parameters	SCALU (n=24)		P value	SCAWH (n=38)		P value	SCALU X SCAWH
	Yes	No		Yes	No		P value
Acute Chest Syndrome	309.1 (124.5)	1956 (487.5)	0.0328	1156 (313.6)	1620 (464.3)	0.9650	0.0483
Osteonecrosis	1889 (697.4)	1226 (415.2)	0.5151	1292 (637.5)	1420 (320.3)	0.7793	0.9485
Priapism	1324 (430.1)	1840 (818.1)	0.9413	3981 (2349)	1240 (293.9)	0.3419	0.3929
Stroke	437.6 (0)	1491 (371.6)	ND	1945 (950.6)	1353 (300.8)	0.2131	ND
Splenectomy	633.1 (629.2)	1276 (1433)	ND	4374 (0)	1320 (280.7)	ND	ND
History of Transfusions	1775 (800.3)	1104 (312.8)	0.3878	1619 (538.9)	1322 (339.8)	0.9868	1.000

Data presented as means (standard error). ND, Non-determined.

Table 3. IL-6 levels correlated with hematological and biochemical parameters

Parameters	SCALU (n=24)		p value	SCAWH (n=38)		p value
	Mean (SD)	IL-6 Mean (SD)		Mean (SD)	IL-6 Mean (SD)	
Hb (g/dl)	7.45 (1.40)	1529.18 (1002.31)	0.2418	8.83 (1.36)	2306.07 (1829.20)	0.0637
WBC (x10 ³ /mm ³)	12.72 (4.97)	1529.18 (1002.31)	0.1662	11.52 (3.90)	2306.07 (1829.20)	0.2279
Ret (%)	9.5 (4.10)	1529.18 (1002.31)	0.3173	7.97 (3.74)	2306.07 (1829.20)	0.3550
LDH (U/l)	1089 (656.05)	1529.18 (1002.31)	0.0191	702.47 (450.22)	2306.07 (1829.20)	0.9026
IB (mg/dl)	2.73 (1.52)	1529.18 (1002.31)	0.9513	2.78 (1.74)	2306.07 (1829.20)	0.1179

Hb, hemoglobin; WBC, leukocyte count; Ret, reticulocyte; LDH, lactate dehydrogenase; IB, indirect bilirubin; SD, standard deviation. IL-6 detection limit: 4.69 pg/ml

Table 4. IL-17A levels correlated with hematological and biochemical parameters

Parameters	SCALU (n=24)		p value	SCAWH (n=38)		p value
	Mean (SD)	IL-17A Mean (SD)		Mean (SD)	IL-17A Mean (SD)	
Hb (g/dl)	7.45 (1.40)	1446.87 (1756.31)	0.9545	8.83 (1.36)	1400.16 (1755.69)	0.9597
WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	12.72 (4.97)	1446.87 (1756.31)	0.4948	11.52 (3.90)	1400.16 (1755.69)	0.8262
Ret (%)	9.5 (4.10)	1446.87 (1756.31)	0.8019	7.97 (3.74)	1400.16 (1755.69)	0.2675
LDH (U/l)	1089.57 (656.05)	1446.87 (1756.31)	0.0130	702.47 (450.22)	1400.16 (1755.69)	0.4303
IB (mg/dl)	2.73 (1.52)	1446.87 (1756.31)	0.9771	2.78 (1.74)	1400.16 (1755.69)	0.3083

Hb, hemoglobin; WBC, leukocyte count; Ret, reticulocyte; LDH, lactate dehydrogenase; IB, indirect bilirubin; SD, standard deviation. IL-17A detection limit: 3.91 pg/ml.

Table 5. IL-22 levels correlated with hematological and biochemical parameters

Parameters	SCALU (n=24)		p value	SCAWH (n=38)		p value
	Mean (SD)	IL-22 Mean (SD)		Mean (SD)	IL-22 Mean (SD)	
Hb (g/dl)	7.45 (1.40)	1529.18 (1002.31)	0.2418	8.83 (1.36)	482.50 (1183.25)	0.3464
WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	12.72 (4.97)	1529.18 (1002.31)	0.1662	11.52 (3.90)	482.50 (1183.25)	0.8265
Ret (%)	9.5 (4.10)	1529.18 (1002.31)	0.3173	7.97 (3.74)	482.50 (1183.25)	0.5664
LDH (U/l)	1089 (656.05)	1529.18 (1002.31)	0.0160	702.47 (450.22)	482.50 (1183.25)	0.5292
IB (mg/dl)	2.73 (1.52)	1529.18 (1002.31)	0.9513	2.78 (1.74)	482.50 (1183.25)	0.3832

Hb, hemoglobin; WBC, leukocyte count; Ret, reticulocyte; LDH, lactate dehydrogenase; IB, indirect bilirubin; SD, standard deviation. IL-22 detection limit: 7.81 pg/ml.

SUPPLEMENTAR TABLES

Supplementary Table 1. Levels of IL-6 associated with clinical parameters in SCALU and SCAWH patients.

Clinical Parameters	SCALU (n=24)		p value	SCAWH (n=38)		p value	SCALU X SCAWH
	Yes	No		Yes	No		p value
Acute Chest Syndrome	1579 (439.8)	1511 (252.3)	0.7964	2069 (431.2)	2520 (413.5)	0.5390	0.9203
Osteonecrosis	1931 (448.5)	1342 (228.8)	0.2447	2310 (965.5)	2305 (310.8)	0.7946	0.9427
Priapism	1346 (388.8)	1938 (349.6)	0.2818	2350 (2346)	2058 (397.5)	ND	ND
Stroke	0	1529 (213.7)	ND	1964 (1448)	2335 (305.2)	0.8496	ND
Splenectomy	1199 (919.6)	1507 (229.4)	ND	3098 (0)	2285 (304.1)	ND	ND
History of Transfusions	1426 (409.4)	1489 (256.1)	0.8931	2639 (515.1)	2187 (360.8)	0.5618	0.2398

Data presented as means (standard error). ND, Non-determined.

Supplementary Table 2. Levels of IL-22 associated with clinical parameters in SCALU and SCAWH patients.

Clinical Parameters	SCALU (n=24)		p value	SCAWH (n=38)		p value	SCALU X SCAWH
	Yes	No		Yes	No		p value
Acute Chest Syndrome	73.74 (31.99)	172.8 (56.53)	0.5163	362.7 (169.5)	590.3 (334.5)	0.5976	0.2118
Osteonecrosis	203.9 (100.2)	109.2 (33.64)	0.8158	1131 (1051)	361 (125.7)	0.7480	0.6953
Priapism	134.4 (84.82)	244.8 (119.2)	0.4103	829.6 (518.7)	66.67 (12.82)	0.1795	0.2302
Stroke	83.19 (0)	81.74 (19.72)	ND	193 (92.58)	507.3 (208.0)	0.5160	ND
Splenectomy	35.09 (27.27)	152.4 (44.20)	ND	6385 (0)	323.0 (109.7)	ND	ND
History of Transfusions	341.5 (161.9)	105.3 (32.90)	0.0555	231.1 (90.35)	572.3 (257.7)	0.5495	ND

Data presented as means (standard error). ND, Non-determined.

7 DISCUSSÃO

A visão clássica da anemia falciforme foi focada em seu defeito genético primário acarretando a polimerização da hemoglobina e causando deformidade nos eritrócitos, tornando-os rígidos, obstruindo o fluxo sanguíneo e produzindo danos teciduais agudos e crônicos devido a baixa perfusão (Platt, 2005). Uma visão mais completa permite que estas hemácias densas, rígidas e oxidadas seja um processo que não só obstrui o fluxo sanguíneo quanto provoca respostas inflamatórias (Kaul, 2000). Marcadores sorológicos permitiram uma evidencia do estado crônico da inflamação na anemia falciforme (Wun, 2001).

A inflamação promove aderência endotelial de hemácias falcizadas, leucocitose na ausência de infecção, comuns na AF e predispondo para acidente vascular cerebral, síndrome torácica aguda e mortalidade em geral. Uma redução dos leucócitos, e da inflamação poderia explicar parcialmente os efeitos benéficos da hidroxiuréia nesta doença (De Franceschi, 2009).

Nossas correlações com as citocinas relacionadas a via Th17 não mostraram diferenças entre os níveis de detecção de IL-6, IL-17A, IL-22 e IL-23 no soro de pacientes AF e controles. Em último caso nossos resultados poderiam estar relacionados com uma inflamação específica no local das úlceras ou ao tempo de vida biológico destas citocinas presente no soro (Tarrant, 2010). Nos entanto, os níveis de IL-17A obtidos de células estimuladas poderiam sugerir o possível envolvimento desta de células Th17 e consequentemente a participação desta citocina com eventos clínicos na AF (Vilas-Boas, 2010).

Em relação às associações entre os níveis de IL-17A com dados clínicos, um resultado interessante foi encontrado em nosso estudo. Nós encontramos relação entre os níveis de IL-17A em relação a síndrome torácica aguda (STA) apenas nos pacientes AFUMI. A STA é uma das mais frequentes complicações na AF, bem como a 2º maior causa de mortalidade em indivíduos falciformes partir dos 2 anos de idade (Vichinsky, 2000). Dados do Clinical Course of Sickle Cell Disease Cooperative Study indica que a STA acomete 10.5 a cada 100

pacientes ao ano (Castro 1994), onde agentes infecciosos são responsáveis por mais de 1 terço dos casos. Uma extensiva terapia com antibióticos é geralmente utilizada neste caso, mesmo quando a infecção não possui uma etiologia clara (Emre 1995).

O acidente vascular cerebral também é uma das consequências mais graves na AF e a mais debilitante. Alguns artigos apontam que a inflamação desempenha um papel comparado a viscosidade para o desenvolvimento de acidente vascular cerebral em grandes vasos (Frenette, 2004; Verduzco, 2009). Neste sentido, um estudo recente em modelos murinos relatou o envolvimento de IL-17 para induzir os neutrófilos a regiões isquêmicas no acidente vascular cerebral. A inibição da IL-17A teve um efeito preventivo sobre o desenvolvimento do acidente vascular encefálico (Gelderblom, 2012). Os nossos resultados, no entanto, demonstraram níveis relativamente elevados de IL-17A em pacientes AF sem história de AVC, mas, devido ao pequeno número de pacientes pertencente aos grupos analisados, uma inferência estatística segura não pode ser realizada.

Vilas-Boas e colaboradores (2010) mostraram que os pacientes que foram submetidos à esplenectomia devido ao quadro de sequestro esplênico, tinham reduzido seus níveis de citocinas tipo 1. Os nossos resultados apontam para um mesmo comportamento em citocinas da via Th17, embora não tenha sido estatisticamente significativo.

Outro ponto crucial na AF é a hemólise, um mecanismo patológico levando a manifestações cardiovasculares, pulmonares, gastrintestinais, renais em diversas doenças (Rother, 2005). Tais complicações têm sido atribuídas ao óxido nítrico vascular (NO) por meio de diminuição no plasma devido ao consumo pela arginase 1 de células vermelhas hemolisadas (Reiter, 2002; Morris, 2005). Esses fatores de risco são putativos para a morbidade e mortalidade na AF. As UMIs estão também associados com marcadores de hemólise que conduzem à especulação de que estas, e talvez outras manifestações da doença, como AVC, podem também ser uma consequência

de hemólise induzida por deficiência do ON (Gladwin, 2004; Kato, 2006; Nolan, 2006).

Taylor et al. (2008) lançou a hipótese de que o grau de hemólise é um determinante chave que influenciaria no espectro de complicações que refletem a gravidade da vasculopatia na AF. Dois terços da hemólise ocorrem extravascularmente e um terço restante, intravascularmente. Juntamente com a contagem de reticulócitos, bilirrubina indireta, e haptoglobina, o LDH tem sido utilizado como um marcador de hemólise. O LDH em soro também é geralmente elevado na anemia falciforme em condições estáveis (SS). Estas taxas hemolíticas aumentam ainda mais durante a crise vaso-oclusiva dor (CVO). Os nossos resultados revelaram que os níveis de LDH foram positivamente correlacionados com a IL-6, IL-17A e IL-22 em pacientes AFUMI.

Este evento isquêmico envolve interações entre eritrócitos, leucócitos e células endoteliais (Makis et al., 2000; Karayalcin et al., 1981). Embora os níveis de hemoglobina, reticulócitos, leucócitos e bilirrubina sejam anormais em comparação com controles saudáveis, os nossos resultados indicaram que não houve correlação positiva relacionada aos níveis de IL-6, IL-17A, IL-22 e IL-23.

Outra causa presente nos pacientes AF com UMI são infecções secundárias consideradas inevitáveis e de importância na persistência das úlceras (Carache et al., 1981). *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*, β -hemolytic *streptococci*, e *salmonellae* foram comumente encontrados em estudos na África (Ankra et al., 1992; Adedeji et al., 1987; Oluwasanmi et al., 1980), e anaeróbios encontrados em mais da metade dos isolamentos em série coletados a partir das úlceras destes pacientes (Ademiluyi, 1988). Devido à presença de correlações significativas destas citocinas relacionadas à via Th17 observada apenas nos pacientes AFUMI, talvez haja uma associação direta com a imunidade contra patógenos extracelulares nestes pacientes.

8 CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou que a IL-17A presente nos pacientes AFUMI sem histórico de STA sugeriram que esta citocina poderia exercer um papel preventivo no desenvolvimento da STA, visto que 1/3 deste sintoma é acarretado por infecções.

A presença da IL-6, IL-17A e IL-22 acompanharam os níveis de LDH apenas entre os pacientes AFUMI. Estes dados sugeriram que a presença destas citocinas poderia servir como indicadores adicionais à hemólise entre os pacientes com úlcera de membros inferiores.

Por outro lado, devido a significância estatística ter sido encontrada apenas entre os pacientes falciformes com UMI em relação às associações com a clínica e os parâmetros laboratoriais, é possível que a presença destas citocinas esteja mais diretamente ligada ao combate a patógenos pois, as infecções nas úlceras são frequentes e representam um fator de persistência das mesmas.

9 REFERÊNCIAS

1. ABBAS, A.K; LICHTMAN, A.H; PILLAI, S. Imunologia celular e molecular. 6 Ed. Elsevier, 2008. 48p.
2. ABOUD, M.R.; TAYLOR, E.C.; HABIB, D.; DANTZLER-JOHNSON, T.; JACKSON, S.M.; XU, F.; LAVER, J.; BALLAS, S.K. Elevated serum and bronchoalveolar lavage fluid levels of interleukin 8 and granulocyte colony-stimulating factor associated with the acute chest syndrome in patients with sickle cell disease. Br J Haematol 2000; 111(2): 482-90.
3. ASARE, K.; GEE, B.E.; STILES, J.K.; WILSON N.O.; DRISS, A.; QUARSHIE, A.; ADAMS, R.J.; KUTLAR, A.; HIBBERT, J.M. Plasma interleukin-1beta concentration is associated with stroke in sickle cell disease. Cytokine. 2010 Jan; 49(1):39-44. Epub 2009 Nov 8.
4. AWASTHI, A.; KUCHROO, V.K. Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. Int Immunol. May;21(5):489-98, 2009.

5. BAO, B.; PRASAD, A.S.; BECK, F.W.; SNELL, D.; SUNEJA, A.; SARKAR, F.H.; DOSHI, N.; FITZGERALD, J.T.; SWERDLOW, P. Zinc supplementation decreases oxidative stress, incidence of infection, and generation of inflammatory cytokines in sickle cell disease patients. *Transl Res.* 2008; 152(2): 67-80.
6. BELCHER, J. D.; MARKER, P. H.; WEBER, J. P.; HEBBEL, R. P.; VERCELLOTTI, G. M. Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vasoocclusion. *Blood*, v.96, n.7, p.2451-2459, 2002.
7. BOURANTAS, K.L.; DALEKOS, G.N.; MAKIS, A.; CHAIDOS, A.; TSIARA, S.; MAVRIDIS, A. Acute phase proteins and interleukins in steady state sickle cell disease. *Eur J Haematol.* 1998 Jul; 61(1):49-54.
8. BRITTENHAM, G.M.; SCHECHTER, A.N; NOGUCHI, C.T. Hemoglobin S polymerization: primary determinant of the hemolytic and clinical severity of the sickling syndromes. *Blood* 1985; 65(1):183-9.
9. CASTRO, O.; BRAMBILLA, D.J.; THORINGTON, B.; REINDORF, C.A.; SCOTT, R.B.; GILLETTE, P. et al. The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors: the Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood* 1994; 84: 643–9.
10. CERQUEIRA, B.A.; BOAS, W.V.; ZANETTE, A.D.; REIS, M.G.; GONCALVES, M.S. Increased concentrations of IL-18 and uric acid in sickle cell anemia: contribution of hemolysis, endothelial activation and the inflammasome. *Cytokine* 2011; 56(2): 471-6
11. CHIANG, E.Y.; FRENETTE, P.S. Sickle cell vaso-occlusion. *HematolOncolClin North Am*, v.19, n.5, p.771-84, 2005.
12. CHIES, J.A.B.; NARDI, N.B. Sickle cell disease: a chronic inflammatory condition. *Med Hypotheses.* 2001 Jul;57(1):46-50.
13. CONRAN, N.; FRANCO-PENTEADO, C.F.; COSTA F.F. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. *Hemoglobin*, v.33, n.1, p.1-16, 2009.
14. CONRAN, N.; ORESKO-SANTOS, C.; ACOSTA, H. C.; FATTORI, A.; SAAD, S. T.; COSTA, F. F. Increased soluble guanylatecyclase activity in

- the red blood cells of sickle cell patients. *Br J Haematol*, v.124, n.4, p.547-54, 2004.
15. COVAS, D.T.; DE LUCENA ANGULO, I.; VIANNA BONINI PALMA, P.; ZAGO, M.A. Effects of hydroxyurea on the membrane of erythrocytes and platelets in sickle cell anemia. *Haematologica*, v.89, n.3, p.273-280, 2009.
 16. DE FRANCESCHI L. Pathophysiology of sickle cell disease and new drugs for the treatment. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2009: 20.
 17. DE FRANCESCHI, L.; CORROCHER, R. Established and experimental treatments for sickle cell disease. *Haematologica*, v.89, n.3, p.348-56, 2004.
 18. EMRE, U., MILLER, S.T., GUTIEREZ, M., STEINER, P., RAO, S.P., RAO, M. Effect of transfusion in acute chest syndrome of sickle cell disease. *J Paediatr* 1995: 127: 901-4.
 19. FRANCIS, R.B.JR, HAYWOOD L.J. Elevated immunoreactive tumor necrosis factor and interleukin-1 in sickle cell disease. *J Natl Med Assoc*. 1992 Jul;84(7):611-5.
 20. FRENETTE PS. Sickle cell vasoocclusion: heterotypic, multicellular aggregations driven by leukocyte adhesion. *Microcirculation* 2004: 11(2): 167-177.
 21. FRENETTE, P. S. Sickle cell vaso-occlusion: multistep and multicellular paradigm. *Curr Opin Hematol*, v.9, n.2, p.101-6, 2002.
 22. GARRIDO, V.T.; PROENÇA-FERREIRA, R.; DOMINICAL, V.M.; TRAINA, F.; BEZERRA, M.A.; DE MELLO, M.R.; COLELLA, M.P.; ARAÚJO, A.S.; SAAD, S.T.; COSTA, F.F.; CONRAN, N. Elevated plasma levels and platelet-associated expression of the pro-thrombotic and pro-inflammatory protein, TNFSF14 (LIGHT
 23. GELDERBLOM, M.; WEYMAR, A.; BERNREUTHER, C.; VELDEN, J.; ARUNACHALAM, P.; STEINBACH, K.; ORTHEY, E.; ARUMUGAM, T.V.; LEYPOLDT, F.; SIMOVA, O.; THOM, V.; FRIESE, M.A.; PRINZ, I.; HÖLSCHER, C.; GLATZEL, M.; KORN, T.; GERLOFF, C.; TOLOSA, E., MAGNUS, T. Neutralization of the IL-17 axis diminishes neutrophil invasion and protects from ischemic stroke. *Blood* 2012: 18: 3793-802.

24. GLADWIN, M.T.; SACHDEV, V.; JISON, M.L.; SHIZUKUDA, Y.; PLEHN JF, et al. Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease. *N Engl J Med* 2004; 350: 886–895.
25. GONÇALVES, M. S.; QUEIROZ, I. L.; CARDOSO, S. A.; ZANETTI, A.; STRAPAZONI, A. C.; ADORNO, E.; ALBUQUERQUE, A.; SANT'ANA, A.; DOS REIS, M. G.; BARRAL, A.; BARRAL NETTO, M. Interleukin 8 as a vaso-occlusive marker in Brazilian patients with sickle cell disease. *Braz J Med Biol Res*, v.34, n.10, p.1309-1313; 2001.
26. GRAIDO-GONZALEZ, E.; DOHERTY, J.C.; BERGREEN, E.W.; ORGAN G.; Telfer M.; McMillen M.A. Plasma endothelin-1, cytokine, and prostaglandin E2 levels in sickle cell disease and acute vaso-occlusive sickle crisis. *Blood*. 1998 Oct 1;92(7):2551-5.
27. HALABI-TAWILL, M.; LIONNET, F.; GIROT, R.; BACHMEYER, C.; LÉVY, P.P.; ARACTINGI, S. Sickle cell leg ulcers: a frequently disabling complication and a marker of severity. *Br J Dermatol*. 2008 Feb;158(2):339-44. Epub 2007 Nov 28.
28. HARRINGTON, L. E. et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*, v.6, n.11, p.1123-1132, 2005.
29. HOBBS, M.V.; ERNST, D.N. T cell differentiation and cytokine expression in late life. *Dev Comp Immunol* 1997; 21(6):461-70.
30. KARAYALCIN, G.; LANZKOWSKY, P.; KARI, A.B. Serum alpha-hydroxybutyrate dehydro-genase levels in children with sickle cell disease. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1981; 3(2): 169-171.
31. KASSCHAU, M. R.; BARABINO, G. A.; BRIDGES, K. R.; GOLAN, D. E. Adhesion of sickle neutrophils and erythrocytes to fibronectin. *Blood*, v.87, n.2, p.771-80, 1996.
32. KAUL, D.K., HEBBEL, R.P. Hypoxia/reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice. *J Clin Invest* 2000; 106(3): 411-20.
33. KUVIBIDILA, S.; GARDNER, R.; ODE, D.; YU, L.; LANE, G.; WARRIER R.P. Tumor necrosis factor alpha in children with sickle cell disease in stable condition. *J Natl Med Assoc*. 1997 Sep;89(9):609-15.

34. LANARO, C.; FRANCO-PENTEADO, C. F.; ALBUQUEQUE, D. M.; SAAD, S. T.; CONRAN, N.; COSTA F. F. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. *JLeukocBiol*, v.85, n.2, p.235-42, 2009.
35. LARD, L. R.; MUL, F. P.; DE HAAS, M.; ROOS, D.; DUIJS, A. J. Neutrophil activation in sickle cell disease. *J LeukocBiol*, v.66, n.3, p.411-415, 1999.
36. LUM A.F.; WUN T.; STAUNTON D, SIMON S.I.; Inflammatory potential of neutrophils detected in sickle cell disease. *Am J Hematol*. 2004 Jun; 76(2):126-33.
37. MAKIS, A. C.; HATZIMICHAEL, E. C.; BOURANTAS, K. L. The role of cytokines in sickle cell disease. *Ann Hematol*, v.79, n.8, p.407-413, 2000.
38. MENESES, J.V.L.; RIBEIRO, I.L.F.; GUEDES, A.; SOBRINHO, V.A.F.P.C.O. SADIGURSKY; DALTRO, G. Maleolar ulcers in sickle cell disease patients: clinical and operator management. (2010) *Gaz. Méd. Bahia*. 80(3), 89-94.
39. MILLER, S. T.; SLEEPER, L. A.; PEGELOW, C. H.; ENOS, L. E.; WANG, W. C.; WEINER, S. J.; WETHERS D. L.; SMITH, J.; KINNEY, T. R. Prediction of adverse outcomes in children with sickle cell disease. *N Engl J Med*, v.342, n.2, p.83-89, 2000.
40. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Educação em Saúde. In: Autocuidado na Doença Falciforme. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_educacao_saude_volume1.pdf>. Acesso em: 16 de Jul. 2010.
41. MINNITI C.P.; TAYLOR J.G. 6TH.; HILDESHEIM M, O'NEAL. P.; WILSON, J.; CASTRO, O.; GORDEUK, V.R.; KATO GJ. Laboratory and echocardiography markers in sickle cell patients with leg ulcers. *Am J Hematol*. 2011 Aug;86(8):705-8. doi: 10.1002/ajh.22065. Epub 2011 May 31.
42. MOHAN, J.S.; VIGILANCE, J.E.; MARSHALL, J.M.; HAMBLETON, I.R.; REID, H.L; SERJEANT, G.R. Abnormal venous function in patients with homozygous sickle cell (SS) disease and chronic leg ulcers. *ClinSci (Lond)*. 2000 Jun; 98(6):667-72.

43. MORRIS, C.R.; KATO, G.J.; POLJAKOVIC, M.; WANG, X.; BLACKWELDER, WC, et al. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *JAMA* 2005; 294: 81–90.
44. MUSA B.O.; ONYEMELUKWE G.C.; HAMBOLU J.O.; MAMMAN A.I.; ISA A.H. Pattern of serum cytokine expression and T-cell subsets in sickle cell disease patients in vaso-occlusive crisis. *Clin Vaccine Immunol.* 2010 Apr; 17(4):602-8. Epub 2010 Feb 3.
45. NOLAN, V.G.; WYSZYNSKI, D.F.; FARRER, L.A.; STEINBERG, M.H.; Hemolysis associated priapism in sickle cell disease. *Blood* 2005; 106: 3264–7.
46. NOLAN, V.G.; ADEWOYE, A.; BALDWIN, C.; WANG, L.; MA, Q.; WYSZYNSKI, D.F.; FARRELL, J.J.; SEBASTIANI, P.; FARRER, L.A.; STEINBERG, M.H.. Sickle cell leg ulcers: associations with haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and genes of the TGF-beta/BMP pathway. 2006 Jun;133(5):570-8.
47. OKPALA, I. Leukocyte adhesion and the pathophysiology of sickle cell disease. *Curr Opin Hematol*, v.13, n.1, p.40-44, 2006.
48. PARK, H. et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*, v.6, n.11, p.1133-1141, 2005.
49. PATHARE, A.; AL KINDI, S.; ALNAQDY, A.A.; DAAR, S.; KNOX-MACAULAY, H.; DENNISON, D. Cytokine profile of sickle cell disease in Oman. *Am J Hematol.* 2004 Dec; 77(4):323-8.
50. PLATT OS. Preventing stroke in sickle cell anemia. *N Engl J Med* 2005; 353(26): 2743-5.
51. PLATT, O.S. Sickle cell anemia as an inflammatory disease. *J Clin Invest* 2000; 106(3):337-8.
52. POILLON, W.N.; KIM, B.C.; CASTRO, O. Intracellular hemoglobin S polymerization and the clinical severity of sickle cell anemia. *Blood* 1998; 91(5):1777-83.
53. PROTONOTARIOU, E.; MALAMITSI-PUCHNER, A.; RIZOS, D.; SARANDAKOU, A.; MAKRAKIS, E.; SALAMOLEKIS, E. Alterations in

- Th1/Th2 cytokine concentrations in early neonatal life. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2003; 14(6):407-10.
54. QARI, M.H.; DIER, U.; MOUSA, S.A. Biomarkers of inflammation, growth factor, and coagulation activation in patients with sickle cell disease. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2012 Mar-Apr;18(2):195-200.
 55. RAGHUPATHY, R.; HAIDER, M.Z.; AZIZIEH, F.; D'SOUZA, T.M.; ABDELSALAM, R.; ADEKILE, A.D. Tumor necrosis factor-alpha is undetectable in the plasma of SS patients with elevated Hb F. *Am J Hematol.* 2000 Jun;64(2):91-4.
 56. REITER, C.D.; WANG, X.; TANUS-SANTOS, J.E.; HOGG, N.; CANNON RO, 3RD, et al. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med* 2002; 8: 1383–1389.
 57. RODRIGUES, L.; COSTA F.F.; SAAD S.T.; GROTTTO, H.Z. High levels of neopterin and interleukin-3 in sickle cell disease patients. *J Clin Lab Anal.* 2006;20(3):75-9.
 58. ROTHER, R.P.; BELL, L.; HILLMEN, P.; GLADWIN, M.T. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA* 2005; 293: 1653–1662.
 59. SERJEANT, G.R.; SERJEANT, B.E.; MOHAN, J.S.; CLARE, A. Leg ulceration in sickle cell disease: medieval medicine in a modern world. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2005 Oct;19(5):943-56, viii-ix.
 60. SERJEANT, B. E.; HARRIS, J.; THOMAS, P.; SERJEANT, G. R. Propionyl-L-carnitine in chronic leg ulcers of homozygous sickle cell disease; a pilot study. *J Am Acad Dermatol*, v. 37, n.3, p.491–493, 1997.
 61. SHEN, F.; GAFFEN, S. L. Structure-function relationships in the IL-17 receptor: implications for signal transduction and therapy. *Cytokine*, v.41, n.2, p.92-104, 2008.
 62. SOLOVEY, A. A.; SOLOVEY, A. N.; HARKNESS, J.; HEBBEL, R. P. Modulation of endothelial cell activation in sickle cell disease: a pilot study. *Blood*, v.97, n.7. p.1937-1941, 2001.
 63. SOLOVEY, A.; LIN, Y.; BROWN, P.; CHOONG, S.; WAYNER, E.; HEBBEL, R. P. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. *N Engl J Med*, v. 337, n.22, p. 1584-1590, 1997.

64. SPOLSKI, R.; LEONARD, W.J. Cytokine mediators of Th17 function. *Eur J Immunol.* 2009; 39(3):658-61.
65. STEINBERG, M. H. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. *Scientific World Journal*, v.8, p. 1295-1324, 2008.
66. STUART, M. J.; NAGEL, R. L. Sickle-cell disease. *Lancet*, v.364, n.9442, p.1343-60, 2004.
67. TARRANT, J.M.; Blood cytokines as biomarkers of in vivo toxicity in preclinical safety assessment: considerations for their use. *Toxicol Sci.* 2010. 117(1):4-16.
68. TAYLOR, J.G.TH; NOLAN, V.G.; MENDELSON, L.; KATO, G.J.; GLADWIN, M.T.; STEINBERG, M.H. Chronic hyper-hemolysis in sickle cell anemia: association of vascular complications and mortality with less frequent vasoocclusive pain. *PLoS One.* 2008: 7: 3(5): 2095.
69. TAYLOR S.C.; SHACKS S.J.; QU Z. In vivo production of type 1 cytokines in healthy sickle cell disease patients. *J Natl Med Assoc.* 1999 Nov;91(11):619-24.
70. TAYLOR S.C.; SHACKS S.J.; QU Z.; WILEY P. Type 2 cytokine serum levels in healthy sickle cell disease patients. *J Natl Med Assoc.* 1997 Nov; 89(11):753-7.
71. TAYLOR, S.C.; SHACKS, S.J.; MITCHELL, R.A.; BANKS, A. Serum interleukin-6 levels in the steady state of sickle cell disease. *J Interferon Cytokine Res* 1995 15(12):1061-4.
72. VERDUZCO LA NATHAN DG. Sickle cell disease and stroke *Blood* 2009: 114: 5117-5125.
73. VICHINSKY, E.P.; NEUMAYR, L.D.; EARLES, A.N. et al. Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. *N Engl J Med* 2000: 342: 1855–65.
74. VILAS-BOAS, W.; CERQUEIRA, B.A.; ZANETTE, A.M.; REIS, M.G.; BARRAL-NETTO, M.; GONCALVES, M.S. Arginase levels and their association with Th17-related cytokines, soluble adhesion molecules (sICAM-1 and sVCAM-1) and hemolysis markers among steady-state

- sickle cell anemia patients. *Ann Hematol.* 2010 Sep;89(9):877-82. Epub 2010 Apr 20.
75. VILAS-BOAS, W.; CERQUEIRA, B.A.V.; PITANGA, T.N.; SEIXAS, M.O.; MENEZES, J.; SOUZA, C.C.; ADORNO, EV, GONCALVES MS. Sickle cell disease: Only one road, but different pathways for inflammation *Advances in Bioscience and Biotechnology* 2012: 3: 538-550
76. WUN, T.; CORDOBA, M.; RANGASWAMI, A.; CHEUNG, A.W.; PAGLIERONI, T. Activated monocytes and platelet-monocyte aggregates in patients with sickle cell disease. *Clin Lab Haematol.* 2002 Apr;24(2):81-8.
77. WUN, T. The Role of Inflammation and Leukocytes in the Pathogenesis of Sickle Cell Disease; *Haemoglobinopathy. Hematology* 2001: 5(5): 403-412.
78. XU, L.; KITANI, A.; FUSS, I; STROBER, W. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol*, v.178, n.11, p.6725-6729, 2007.
79. ZAGO, M. A.; PINTO, A.C.S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. *Rev. bras. hematol. Hemoter*, v.29, n.3, p.207-214, 2007.

11 APÊNDICES

APÊNDICE I

Termo de consentimento livre esclarecido para cidadãos alfabetizados

« Estudo da via Th17 em pacientes portadores de anemia falciforme com úlcera maleolar: descoberta de novos alvos terapêuticos »

Nós o convidamos a participar de uma pesquisa que visa estudar o que está alterado no organismo de pacientes portadores de anemia falciforme com úlcera maleolar. Como pesquisadores responsáveis deste estudo, nosso objetivo é melhorar o conhecimento sobre a doença permitindo o desenvolvimento de novos tratamentos para os pacientes portadores desta doença. Nesta pesquisa só será realizado testes com as células presentes no seu sangue, após este ter sido coletado por profissionais competentes.

É importante ressaltar que:

1. Sua participação é inteiramente **voluntária**;
2. Você terá ressarcimento de despesas, como transporte ou alimentação, durante a participação na pesquisa;
3. Você pode deixar de participar do estudo a qualquer momento que quiser;
4. Nós solicitaremos novamente sua aprovação (verbal) no momento de cada coleta;
5. Suas informações nunca serão divulgadas, ou seja, permanecerão confidenciais.

A anemia falciforme é uma doença herdada causada por uma mutação de ponto no gene da globina β . Essa mutação resulta em uma hemoglobina anormal. Esta doença aumentada a ocorrência de complicações como artralgia (dores musculares), crises dolorosas, dores abdominais, necrose asséptica de cabeça de fêmur, lesões de retina, acidente vascular cerebral e o desenvolvimento de úlceras maleolares. No estado de Pernambuco, a anemia falciforme afeta 1/1.400 nascidos vivos. O Hospital de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco tem cadastrado atualmente 1.500 pacientes com doença falciforme, destes estima-se que 10% desenvolvem úlcera maleolar.

Em 2005, foi descoberta uma nova via dos linfócitos T, as Th17, envolvidas no aumento da gravidade dos processos inflamatórios crônicos. O papel destas células na anemia falciforme ainda não foi esclarecido. Desta forma, é necessário a realização deste projeto de pesquisa para identificar o envolvimento dessa via tanto em pacientes com anemia falciforme com úlceras maleolares quanto sem úlceras.

Nós solicitamos a sua colaboração e participação neste estudo porque você é **portador de anemia falciforme com ou sem úlcera maleolar ou por você ser um voluntário não portador desta doença**. Este estudo inclui a participação de 80 indivíduos.

Para este estudo, precisamos coletar algumas células de sangue. A coleta de sangue é feita no braço e a quantidade coletada é equivalente a duas colheres de sopa (10-15 ml). A coleta de sangue pode ser desconfortável e o braço pode ficar um pouco dolorido e apresentar hematoma que é uma área arroxeadas no local da coleta. Antes de iniciar a coleta, nós limparemos o seu braço com álcool, e todo material usado na coleta é descartável. A coleta será feita por profissionais treinados e competentes e orientados para reduzir os riscos.

Caso um novo alvo para fármaco seja descoberto, o desenvolvimento de um novo fármaco será priorizado. Desta forma, os pacientes portadores de anemia falciforme poderão ser beneficiados.

Os resultados deste estudo serão apresentados em congressos, conferências ou em revistas médicas, mas não aparecerá seu nome. Suas informações nunca serão divulgadas, permanecerão confidenciais. Os dados da pesquisa serão arquivados com o pesquisador responsável do projeto.

Você tem alguma pergunta sobre a sua participação neste estudo?

Se você tiver alguma pergunta mais tarde, poderá conversar com um dos membros da nossa equipe, podendo contatar:

Profa. Dr. Maira Galdino da Rocha Pitta, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE. E-mail: mgrpitta@gmail.com. Telefone/Fax: 55 (81) 2126-8346

Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE. E-mail: macbezerra@bol.com.br. Telefone/Fax: 55 (81) 2126-8535.

Assim como, o coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/CCS, o Professor **Dr. Geraldo Bosco Lindoso Couto**, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE. Telefone/Fax: 55 (81) 2126-8588.

Você ficará com uma cópia deste documento.

Nome do responsável pela coleta de sangue: _____

Se você aceitar participar deste estudo, por favor, preencha o formulário abaixo.

Nome: _____

RG: _____ **Data:** _____

Endereço: _____

Assinatura: _____

Testemunha 1: _____

RG: _____ **Data:** _____

Testemunha 2: _____

RG: _____ **Data:** _____

Assinatura dos envolvidos diretamente no Projeto:

Profa. Dr. Maira Galdino da Rocha Pitta
Bezerra
Pesquisador Responsável

Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti
Dr. Aderson da Silva Araújo

APÊNDICE II

Termo de consentimento livre esclarecido para cidadãos não-alfabetizados

Por favor, leia as informações a seguir para o sujeito da pesquisa, preferencialmente na presença de terceiros, assegurando-se que as informações foram todas compreendidas e permitam ao voluntário a plena liberdade entre escolher participar ou não do estudo.

Nós o convidamos a participar de uma pesquisa que visa estudar o que está alterado no organismo de pacientes portadores de anemia falciforme com úlcera maleolar. Como pesquisadores responsáveis deste estudo, nosso objetivo é melhorar o conhecimento sobre a doença permitindo o desenvolvimento de novos tratamentos para os pacientes portadores desta doença. Nesta pesquisa só será realizado testes com as células presentes no seu sangue, após este ter sido coletado por profissionais competentes.

É importante ressaltar que:

6. Sua participação é inteiramente **voluntária**;
7. Você terá ressarcimento de despesas, como transporte ou alimentação, durante a participação na pesquisa;
8. Você pode deixar de participar do estudo a qualquer momento que quiser;
9. Nós solicitaremos novamente sua aprovação (verbal) no momento de cada coleta;
10. Suas informações nunca serão divulgadas, ou seja, permanecerão confidenciais.

A anemia falciforme é uma doença herdada causada por uma mutação de ponto no gene da globina β . Essa mutação resulta em uma hemoglobina anormal. Esta doença aumentada a ocorrência de complicações como artralgia (dores musculares), crises dolorosas, dores abdominais, necrose asséptica de cabeça de fêmur, lesões de retina, acidente vascular cerebral e o desenvolvimento de úlceras maleolares. No estado de Pernambuco, a anemia falciforme afeta 1/1.400 nascidos vivos. O Hospital de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco tem cadastrado atualmente 1.500 pacientes com doença falciforme, destes estima-se que 10% desenvolvem úlcera maleolar.

Em 2005, foi descoberta uma nova via dos linfócitos T, as Th17, envolvidas no aumento da gravidade dos processos inflamatórios crônicos. O papel destas células na anemia falciforme ainda não foi esclarecido. Desta forma, é necessário a realização deste projeto de pesquisa para identificar o envolvimento dessa via tanto em pacientes com anemia falciforme com úlceras maleolares quanto sem úlceras.

Nós solicitamos a sua colaboração e participação neste estudo porque você é **portador de anemia falciforme com ou sem úlcera maleolar ou por você ser um voluntário não portador desta doença**. Este estudo inclui a participação de 80 indivíduos.

Para este estudo, precisamos coletar algumas células de sangue. A coleta de sangue é feita no braço e a quantidade coletada é equivalente a duas colheres de sopa (10-15 ml). A coleta de sangue pode ser desconfortável e o braço pode ficar um pouco dolorido e apresentar hematoma que é uma área arroxeadada no local da coleta. Antes de iniciar a coleta, nós limparemos o seu braço com álcool, e todo material usado na coleta é descartável. A coleta será feita por profissionais treinados e competentes e orientados para reduzir os riscos.

Caso um novo alvo para fármaco seja descoberto, o desenvolvimento de um novo fármaco será priorizado. Desta forma, os pacientes portadores de anemia falciforme poderão ser beneficiados.

Os resultados deste estudo serão apresentados em congressos, conferências ou em revistas médicas, mas não aparecerá seu nome. Suas informações nunca serão divulgadas, permanecerão confidenciais. Os dados da pesquisa serão arquivados com o pesquisador responsável do projeto.

Você tem alguma pergunta sobre a sua participação neste estudo?

Se você tiver alguma pergunta mais tarde, poderá conversar com um dos membros da nossa equipe, podendo contatar:

Profa. Dr. Maira Galdino da Rocha Pitta, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE. E-mail: mgrpitta@gmail.com. Telefone/Fax: 55 (81) 2126-8346

Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE. E-mail: macbezerra@bol.com.br. Telefone/Fax: 55 (81) 2126-8535.

Assim como, o coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/CCS, o Professor Dr. Geraldo Bosco Lindoso Couto, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE. Telefone/Fax: 55 (81) 2126-8588.

Você ficará com uma cópia deste documento.

Nome do responsável pela coleta de sangue: _____

Se você aceitar participar deste estudo, por favor responda o formulário abaixo.

Eu _____, **a rogo de** _____

_____, **assino o presente termo de consentimento.**

RG: _____ **Data** _____

Endereço: _____

Testemunha 1: _____

RG: _____ **Data:** _____

Testemunha 2: _____

RG: _____ **Data:** _____

**Impressão Digital do
Paciente**

Assinatura dos envolvidos diretamente no Projeto:

**Profa. Dr. Maira Galdino da Rocha Pitta
Bezerra
Pesquisador Responsável**

**Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti
Dr. Aderson da Silva Araújo**

APÊNDICE III – Questionário Clínico

Dados Pessoais:

Código: _____

Nome do Paciente: _____ Tipo de Sangue _____

Nº de Prontuário: _____

Data de Nascimento: ____/____/____

Contato: _____

Tratamentos e Manifestações Clínicas

Observações Relevantes:

Úlceras Maleolares		Sim		Não	
Hidroxiuréia		Sim		Não	
Acido Fólico		Sim		Não	
NACF (Osteonecrose)		Sim		Não	
STA		Sim		Não	
Priapismo		Sim		Não	
AVC		Sim		Não	
Esplenectomizado		Sim		Não	
Transfusão		Sim		Não	
Hepatite		Sim		Não	
Doenças Secundárias		Sim		Não	
Outros Medicamentos		Sim		Não	

Observações Adicionais:

APÊNDICE IV

ARTIGO 2

MINI-REVIEW: PROGRESS AND CHALLENGES ABOUT CYTOKINES PROFILE IN SICKLE CELL DISEASE

Rafael Ramos da Silva^a, Michelly Cristiny Pereira^a, Moacyr Jesus Barreto Melo Rêgo^a,
Maira Galdino da Rocha Pitta^a

^aLaboratory of Immunomodulation and Novel Therapeutic Approaches (LINAT/NUPIT), Research Center for Therapeutic Innovation (NUPIT), UFPE, Recife, Brazil.

*Corresponding author: Tel.: +55 81 9671-7788. E-mail: mgrpitta@gmail.com
Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), Diretoria de Inovação e Empreendedorismo. Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Rua Thereza Amélia, s/n, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil. ZIP code: 50670-901.

ABSTRACT

Sickle cell disease (SCD) is a heritable disease characterized by an alteration in hemoglobin S allele that could allow abnormal hemoglobin polymerization leading to a symptomatic disorder. This hemoglobinopathy generates chronic hemolysis, occlusion of microcirculation, frequent infections and other symptoms which can result in premature death. Many studies have showed that cytokines are directed involved in all these symptoms. In this review, we aimed to provide an overview of cytokines related to sickle cell disease in steady state or crisis condition.

INTRODUCTION

Sickle cell disease is an inherited disorder of hemoglobin (Hb) synthesis, resultant by a single nucleotide substitution at sixth codon of the β -globin gene, leading to the production of a defective form of Hb, Hb S. The Hb S gene origins from Africa and its global dissemination occurred by vagaries of war, Atlantic and Arab slave trades in the diasporas and miscegenation with other ethnicities [1,2]. This mutation changes the behavior of haemoglobin molecules, which tend to polymerise on deoxygenation,

damaging red blood cells [3,4]. As a consequence sickle erythrocyte become deformed with characteristic sickle shape, causing vaso-occlusive phenomena [5,6]. Patients with homozygosis for hemoglobin S (HbS) is denominated sickle cell anemia (SCA) and with patients that has heterozygosis for HbS or HbSC and β -thalassaemia form a single group referred to as having sickle cell disease (SCD) [7]. Polymerisation tendencies of mixtures of HbS and several Hb variants show that residues 22, 80, and especially 87 of the γ chain are implicated in intermolecular contact sites that stabilize the deoxygenated-HbS polymers [8]. SCD patients with heterozygosity for haemoglobin S and haemoglobin C can have similar complications, although not identical [9].

Previously, sickle cell disease complications were thought to arise from decreased organ perfusion and consequent tissue infarction, solely brought about as a result of mechanical obstruction of the microvasculature by rigid, sickled red blood cells [10,11], however, research has revealed that the pathophysiology of sickle cell disease is far more complex.

The vaso-occlusive described in the pathogenesis of the disease is known to constitute a complex multifactorial process involving different type cells interactions that produces clinical effects associated with inflammation [12]. Sickle cell crisis refer to attacks of pain, at various levels of severity during the lifetime of the patient and the painful vaso-occlusive crisis (VOC) is the most common, characterized by leukocytosis, fever, susceptibility to infection, tenderness and joint effusions [1, 13,14]. On the other hand, steady state patients normally was defined as a crisis-free period for at least three weeks after the previous clinical event and three or more months since the last blood transfusion [15].

Experimental evidence shows that cytokines are elevated in sera of sickle cell patients, like tumor necrosis factor α (TNF) and interleukins IL-1 β , IL-4, IL-6 and IL-8 [16,17]. In SCD, the release of cytokines increases during inflammation in response to endothelial cell activation, infections and other injurious agents [6,18]. Therefore, inflammation plays an important role in the pathophysiology of vaso-occlusion in SCD. Patients even in steady-state show cytokine production and a significant endothelial cell activation [15,19,20]. In this article we review cytokines in sickle cell disease, seeking to highlight the role of those with the pathophysiology of SCD in steady state and in crisis.

Cytokines in Vaso-Occlusive Crises (VOC) patients

The vaso-occlusive process in sickle cell disease comprise a multi-step process involving interactions between sickle red cells, endothelial cells, leukocytes, platelets and plasma proteins. SCD patients in VOC has a decreased organ perfusion, consequently they may have tissue infarction, and, together with hemolysis, these patients could develop clinical complications like intermittent painful vaso-occlusive episodes, splenic autoinfarction, infection, acute chest syndrome, stroke, pulmonary hypertension and a shortened lifespan [14]. All these symptoms characteristic of vaso-occlusive crises (VOC) accounts for most of the morbidity and mortality associated with blockage of blood flow [21]. Continuous vaso-occlusion associated with ischemia–reperfusion and consequent vascular endothelial cell activation and injury induce a continuous inflammatory response in the SCD individual that is propagated by elevated levels of circulating inflammatory cytokines, a decreased nitric oxide bioavailability and oxidative stress [22]. Several studies reveal the involvement of the cytokines IL-2, IL6, IL-4, IL-8, TNF and IL-10 in VOC patients (Fig 1) [16,23,24]. A study performed by Francis et al. (1992) showed that plasma TNF was elevated (13 of the 19; 68%) in crisis patients (adults) and IL-1 α also was elevated (16%) in all of whom that had elevated TNF. No correlation was found between TNF or IL-1 α and either the overall severity of vaso-occlusive disease or with the presence of specific complications (leg ulcers, aseptic necrosis of the bone or proliferative retinopathy) [16].

The study of Graido-Gonzalez et al (1998) also investigated plasma levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, antiinflammatory cytokine IL-10 and vasoactive mediators such as prostaglandin E2 (PGE2) and endothelin-1 (ET-1), a potent vasoconstrictor released by endothelial cells in asymptomatic sickle cell disease and during pain crisis. Plasma levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, and IL-10 were not different between healthy controls and sickle cell patients, although a trend was observed in which TNF and IL-10 remained higher than controls during and after crisis. It was not observed difference between the levels in crisis and those of the same patients at postcrisis follow-up. The authors argued that these cytokines may play a role at the tissue level in crisis, where autocrine and paracrine effects predominate, justifying the lack of significance in serum. On the other hand, ET-1 and PGE2 serum levels were significantly elevated in patients in crisis and post crisis compared to healthy controls. Therefore it is suggested that the presence of

vasoconstriction (ET-1) and inflammation (PGE2) mediators may play an important role in the mechanisms of inflammation and ischemia that initiate and sustain the pain crises [24].

Other study investigated TNF levels in crisis SCD patients from Kuwait. None of the SS children patients in crisis had detectable plasma levels. Following phytohaemagglutinin (PHA) stimulation most subjects responded with high levels of TNF- α , with the median level among the crisis SS patients being higher than that in the controls. The stimulation with PHA reflect the in vivo situation in which activation of leukocytes would lead to higher levels of TNF in SCD patients. Interestingly to note that all these children analyzed have elevated Hb F levels [25].

The study of Wun et al. (2002) evaluated intracellular cytokine expression by flow cytometry that was used as a measure of monocyte activation. Unstimulated monocytes from patients with SCD expressed (both painful and steady-state included) more IL-1 β and TNF when compared to African-American and Caucasian controls ($P < 0.001$, Kruskal–Wallis). However, the percentage of monocytes from SCD patients expressing TNF and IL-1 β during painful crisis was not different to the percentage of those not in crisis. The group stated that the small sample size the power to detect differences between crisis and noncrisis values is below 80% [23].

Pathare and coworkers (2004) assessed the cytokine profile of sickle cell disease patients in steady state and in vaso-occlusive crisis. Cytokines including IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, TNF- α , and IFN- γ were measured in plasma of SCD patients and it was observed that the mean serum IL-1 β was significantly high in the group of VOC compared to control group. SCD patients in crisis showed elevated levels of TNF when compared with steady state and controls but it was not significant. The mean serum level of IL-2 showed no significant variation among groups analyzed. The mean serum level of IL-8 also showed a progressive rise in VOC patients compared to controls ($p < 0.05$). Serum TNF and IFN- γ levels in the control group was lower compared to crisis patients but it was not found significance. Using a significant number of patients ($n = 34$ for VOC patients; $n = 20$ for healthy controls) this study showed the important role of IL-6 (type II) and IL-8 (type I) that were significantly elevated in SCD patients in crisis when compared to controls. Besides IL-6 (type II) was also significantly elevated in SCD patients in crisis as compared to the steady-state SCD patients. Elevated levels of proinflammatory cytokines like TNF- α , IL-6, and IL-8 may be related to an anti-infectious response in

acute crisis SCD patients. However, in more than 60% of these patients, no infection was diagnosed. So, the group suggested that the mechanism underlying the elevated levels of cytokines in this group of patients, may be caused by tissue ischemia itself [17].

Other study of Musa et al. (2010) investigated cytokines (IL-2, IL-4, and IL-10) in the sera of SCD patients in vaso-occlusive crisis (VOC), comparing those with stable SCD patients and with normal healthy people who served as controls. The VOC group was notable for remarkably elevated levels of IL-4, among the three cytokines tested, compared with controls. Patients with VOC also differed from stable SCD patients and healthy controls by having notably lower IL-10 levels, as well as the lowest ratio of CD4 to CD8 T cells. IL-2 levels did not differ between VOC and stable SCD patients, but healthy people had significantly lower IL-2 levels than both the VOC and SCD groups. The results demonstrated coexisting levels, both high and low, of TH1- and TH2-type cytokines, as well as diminished levels of T-cell subsets in VOC [13].

The investigation of Qari et al. (2012) examined the role of various proinflammatory cytokines, chemokines, growth factors, and coagulation parameters in patients with SCD during active crisis at admission and prior to the administration of analgesic and at steady state as compared to age-matched, healthy volunteers. Plasma TNF levels were significantly elevated in patients either during painful crisis or at steady state, as compared to levels in patients of the healthy, age-matched control group. Surprisingly, TNF levels were significantly higher at steady state as compared to levels during painful crisis. Plasma interleukin 1 β (IL-1 β) and IL-6 followed the same trend as TNF- α . IL-8 plasma levels in patients with SCD did not change between patients with SCD (painful crisis or at steady state), with a 30- to 50-fold increase above that of healthy controls. IL-10 plasma levels were modestly elevated by 1.5- to 2-fold in patients with SCD either during painful crisis or at steady state as compared to that of healthy, age-matched control group. Plasma levels of different growth factors including vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor (FGF), or hepatocyte growth factor (HGF) in patients with SCD showed a distinct rise, either during painful crisis or at steady state, with about 3-fold increase above that of healthy group [26].

Cytokines in Steady-State SCD patients

It is known that sickle erythrocytes may have direct or indirect effects upon vascular tone and that local control of vascular tone is abnormal not only during sickle cell crisis, but also in the steady state course of the SCD. Increased levels of cytokines also are not exclusive to patients in crisis, as has been proven by several studies [17, 27] which will be reviewed below.

Francis and coworkers (1992) evaluated plasma tumor necrosis factor (TNF- α) and IL-1 α to determine if these cytokines would be involved in the pathogenesis of adults SCD. Plasma TNF was elevated in 86% (18 of the 21) of steady-state patients and undetectable in all eight controls. Plasma IL-1 α was elevated in three subjects in the steady state (14%). These results were not significant and the group claimed that it may be underestimated the true frequency of elevated cytokines in sickle cell disease because of the relative insensitivity of ELISA assays. Besides, major physiologic effects are produced by concentrations of cytokines too low to be detected by ELISA [16].

IL-6 cytokine was evaluated during the steady state of SCD patients by Taylor and coworkers in 1995. Serum IL-6 levels were assessed via ELISA and the results revealed significantly higher circulating levels of the cytokine in the SCD patients (n=27) compared with the healthy controls (n=19) [28].

In another study by Taylor et al (1997), type 2 cytokine serum levels in steady state sickle cell disease patients were also evaluated in order to prove that even in subclinical conditions the cytokines expression could be relevant in these patients. The data reveals that 6 (13%) of 45 SCD patients showed elevated IL-4 serum levels and only 1 (2%) of 45 controls. Elevated levels of IL-6 were detected in 35 (78%) of 45 SCD serums and 12 (41%) of 29 normal controls. Increased levels of IL-10 were shown in 13 (41%) of 32 SCD samples and only 1 (4%) of 25 normal samples. The group suggests that high circulating levels IL-4, IL-6, and IL-10 in the steady state SCD patients may represent chronic polyclonal activation of B cells or defective regulation of antibodies. Consequently, it may be deleterious to both cell-mediated and humoral responses in SCD, with resultant increased risk morbidity [29].

An interesting study was conducted to determine TNF concentration in children (n=101) with sickle cell disease (SCD) in steady state and whether high TNF levels are more likely to be present in children with growth deficits, infection, or pain crisis. The mean TNF levels from children with SCD were significantly higher (two-and-a-half

times) than were those of control children or adults controls. In the overall study population as well as in children with SS Hb, those who suffered from infection had a higher mean TNF concentration than those without infection. Interestingly, the difference was only statistically significant for children with SS Hb but not for the overall population of SCD or other Hb phenotypes. Although there was no significant difference children who had high levels of TNF had weight (46% versus 31% of normal) and height (50% against 28.6% of normal) deficits than children who had normal levels. With the study it was suggested that the most children with SCD in steady state have normal TNF concentrations [30].

In 1998, Bourantas and coworkers conducted a similar study to that of Taylor and Francis, however evaluating more parameters. This group did dosages of many serum cytokines (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α) in SCD steady-state patients and healthy controls of children and adults. Among the cytokines assayed in this study, only IL-6 and sIL-2R was significantly elevated compared to healthy controls. The other evaluated cytokines were not detectable in serum of SCD patients. The data observed by the group suggested that the expression of acute phase proteins result from subclinical inflammatory processes in vaso-occlusive events in which the IL-6 may play an important role. These latter observation, in association with the increased sIL-2R levels in the circulation of patients with sickle cell disease, provides some evidence that cellular immune activation is present in these patients, even in the steady state of the disease [15].

Taylor and colleagues (1999) made another evaluation of cytokines in serum from steady state sickle cell disease patients (children and adults). Interleukins (IL)-1, 2, 12, and interferon (IFN)- γ , along with soluble IL-2 receptor (sIL-2R) were measured to detect *in vivo* type 1 cytokines production. No significant detectable levels of IL-1 or IL-12 were found in the sera of either group of patients. Significantly elevated levels of IFN- γ were measured in 20 (33%) of 60 SCD patients and 21 (36%) of 58 controls. Interestingly, in the older age group (18-45 years), the SCD individuals had much higher levels of sIL-2R than control subjects. This result corroborates the study of Bourantas (1998) and high circulating levels of type 2 cytokines (IL-6, IL-10) previously mentioned by Taylor et al (1997) may partially explain the high sIL-2R levels. IL-10 is a potent inhibitor of type 1 cytokines and IL-6 mediates B-cell differentiation into plasma cells and antibody

secretion favoring humoral immunity. Consequently, these cytokines can also increase IL-2 and sIL-2R expression [31].

In 2000, Raghupathy and coworkers estimated TNF level in the plasma and in supernatants following peripheral blood mononuclear cell (PBMC) activation with phytohaemagglutinin (PHA) from Kuwait SCD patients. None of children with SCD (either in steady state or crisis) had detectable plasma TNF. However mitogen-activated PBMC responded with high levels of TNF, with the median level among the steady-state patients being significantly higher than that in the controls (both the acutely ill and healthy). This result reflects the *in vivo* situation in which activation of leukocytes (e.g., bacterial antigens) would lead to higher levels of TNF in SCD patient [25].

As cited above, Wun and coworkers evaluated the expression of TNF and IL-1 β in monocytes of SCD patients (children and adults) in steady state, in crisis, unstimulated or stimulated with lipopolysaccharide (LPS). There was no difference in the percentage of monocytes expressing cytokine between patients in steady state and those in crisis. In response to LPS, it was not found difference between patients and controls in the proportion of their monocytes that produced IL-1 β . In contrast, a lower percentage of monocytes from patients with SCD expressed TNF in response to LPS. Blood was also assayed for the presence of platelet–monocyte aggregates (PMAs), as platelet adherence is one possible mechanism for monocyte activation. They observed an increased circulating PMAs and monocyte activation in patients with SCD in steady state [23].

It was also cited above, the study by Pathare and coworkers that assessed the cytokine profile of sickle cell disease patients also in steady state. Cytokines including IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, TNF- α , and IFN- γ were measured in plasma of SCD patients. It was demonstrated that SCD patients in steady state showed a significant elevation in IL-1 β , IL-6, and IFN- γ as compared to normal subjects. They concluded that in steady state, type II proinflammatory cytokines are elevated, whereas in crisis, an additional augmentation of type I cytokines occurs, with persistent elevation of type II cytokines, emphasizing the role of perturbed endothelium and activated monocytes in the pathophysiology of vaso-occlusion in sickle cell crisis [17].

The study by Rodriguez et al. (2006) evaluated in turn interleukin-3 (IL-3), interferon- γ (IFN- γ), and neopterin (NP) levels in steady-state SCD patients order to verify the possible action of those cytokines and NP on iron metabolism and hematopoiesis. Serum IL-3 and NP levels were higher in SCD patients than in controls, whereas IFN- γ concentration did not differ between groups. It is known that IL-3 stimulates hematopoiesis whereas IFN- γ and TNF are inhibitory factors of erythropoiesis. Neopterin is in turn considered a useful marker of immunological activation and is produced by monocytes/macrophages stimulated by IFN- γ . The results of this study suggest that IL-3 stimulates hematopoiesis and even in steady state, SCD patients have macrophage/monocyte activation (represented by high levels of NP) that probably contributes to their chronic inflammatory condition [32].

Lanaro et al. (2009) determined the plasma levels (IL-8, IL-10, TNF- α , PGE₂) and leukocyte gene expressions (TNF, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ) of cytokines and inflammatory mediators in steady-state SCD patients and determined whether HU therapy is associated with alterations in these levels. Plasma levels and mRNA expression of TNF and the chemokine IL-8 were elevated significantly in steady-state SCA patients compared with healthy subjects. No significant difference was observed between the levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in SCD and controls. Plasma PGE₂ was also elevated significantly in SCA patients. The mRNA gene expressions of the cytokines IL-10 and IFN- γ were not significantly different in the monocytes of SCA patients when compared with control. In relation to neutrophils, the gene expressions of IL-8, IFN- γ , iNOS, and HO-1 were significantly higher in SCA patients, compared with those of healthy controls. Patients on HU therapy presented significantly lower plasma levels of TNF when compared with steady-state SCA patients whereas IL-10 plasma levels were higher in SCA patients receiving HU. The same profile was observed to mRNA expression in which patients on HU demonstrated lower iNOS, IL-8, IFN- γ and higher IL-10 neutrophil gene expressions [33].

The study by Abboud and coworkers (2000) had shown association between cytokines expressions and clinic symptoms in SCD. The research was conducted to determine whether IL-8 and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) play a role in the development of acute chest syndrome (ACS) in adults and children with sickle cell disease. The number of patients with detectable serum levels of IL-8 and the mean serum

was significantly higher among patients with ACS than in the control group. Serum levels of IL-1 β and TNF were not significantly different between the two groups whereas G-CSF were undetectable in both groups. IL-8 and G-CSF levels were high in bronchoalveolar lavage from ACS children compared with levels described in healthy adult controls, suggesting that these cytokines may play a role in the development of the ACS and the complications associated with it [34].

The study of Asare et al. (2010) also had the goal to identify plasma inflammatory proteins that are associated with and could predict development of stroke in SCD children with abnormal cerebral blood flow. It was evaluated circulating levels of 27 inflammatory proteins [IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, eotaxin, fibrocyte growth factor (FGF) basic protein, granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), granulocyte monocyte-colony stimulating factor (GM-CSF), IFN- γ , 10 kDa interferon-gamma-induced protein (IP-10), MCP-1, MIP-1 α , macrophage inflammatory protein-1beta (MIP-1 β), platelet derived growth factor-bb (PDGF-bb), regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted (RANTES), TNF and vascular endothelial growth factor (VEGF)], using a commercially available multiplex calorimetric bead-based protein array system. The results revealed IL-1 β as the only inflammatory protein, among those measured, which could protect against stroke development. The steady-state patients had elevated median concentrations of IL-1 β and MIP-1 β compared with the other groups. The data indicate that IL-1 β is a good biomarker for predicting the likelihood of completed stroke in HbSS individuals with abnormal cerebral blood flow [35].

The Vilas-Boas' group evaluated serum arginase levels in steady state SCA patients and associated with biochemical hemolysis markers and cytokines involved in Th17 response (IL-23, IL-17, and TGF-beta. Among the studied cytokines, there is no association between IL-23 and IL-17 concentrations with arginase levels. Only TGF- β is associated with arginase, in which SCD individuals with increased levels of TGF- β had the highest levels of serum arginase [36].

Other group analyzed IL-18 in steady-state SCD patients and found that increased serum levels of this cytokine are associated with high levels of LDH, indirect bilirubin, uric acid levels and erythroid precursors. These findings suggest probable influences of IL-18 and uric acid in the vascular occlusion pathophysiology in SCA [37].

In 2012, Garrido et al. evaluated whether TNFSF14 production is altered in SCD and whether platelets contribute to this production. TNFSF14 is recently-identified pro-thrombotic and pro-inflammatory tumour necrosis factor (TNF)-superfamily cytokine that has a potent activating effect on endothelial cells. It was observed that mean plasma TNFSF14 was significantly increased in SCA (steady state) compared to controls and correlated with platelet activation [38].

There is evidence that a chronic inflammation condition exists in SCD patients even in steady state [32]. This statement is evident in the present review in which we can observe a large number of cytokines involved in steady state condition (Figure 1). It is believed that there are significant subclinical microvascular occlusions in steady state. Tissue ischemia with necrosis are induced by the enhanced adhesiveness of sickle reticulocytes and reversibly sickled erythrocytes to the vascular endothelium, along with the associated chronic endothelial activation and injury and by the production of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α) [17]. Probably the degree of stimulation and production of cytokines is not high enough to trigger clinically evident vaso-occlusions in the steady state in clinical moment evaluated. This balance can be very easily altered and the crisis can be induced in these patients anytime.

Cytokines: Progress and Challenges

It was demonstrated in several studies that TNF levels were elevated in VOC patients compared to healthy controls. These results were significant in some studies [23,26,28] but in others not, although a trend was observed [17,24]. Surprisingly, we observed contradictory results when comparing TNF level in steady state patients. For example, Qari et al. have shown reduced TNF concentration in crisis patients compared to steady state whereas the opposite was shown by Pathare group. These differences can be explained by the sample size or even the different origin of populations. Other cytokines like IL-1 β and IL-8 had consistent results in which was found significantly higher levels in VOC patients compared to controls [17,23,26].

Many studies have shown the role of cytokines even in the stable condition of the disease (steady state). IL-6, TNF, sIL-2R levels were significantly elevated in several studies, confirming the role of these cytokines in this stage of the disease [15-17, 28-31].

Some associations were also found like high levels of IL-8 and G-CSF with predisposition of ACS and a high IL-1 β as a protector factor against stroke.

Thus it is evident the role of many cytokines in SCD, demonstrating the importance of further studies to better understand the mechanisms involving these cytokines in addition to new drugs that can modulate the expression of the same in steady-state or crisis stage.

Before Hydroxyurea (HU) approval by the U.S. Food and Drug Administration, the therapies used for treatment were blood cell transfusions, narcotics, antibiotics, and intravenous fluids. However none of these therapies modify the underlying pathophysiology of the disease. Since its approval for the treatment of sickle cell disease in 1998, HU has been the only approved disease-modifying drug for treatment of sickle cell disease [39,40]. Its efficacy is attributed to ability to increase fetal hemoglobin and studies have shown that HU decreases white blood cell (WBC) counts, myeloperoxidase activity, cell-adhesive properties that contribute to vasoocclusion besides to reduces the pro-inflammatory cytokine TNF- α . Despite its effectiveness, HU may also have adverse effects on spermatogenesis and may cause neutropenia, thrombocytopenia, splenic sequestration and rare cases of leukemia. Therefore, it is important to search for alternative drugs more effective in the treatment of many clinical symptoms of sickle cell patients [4,33,41]. For example, the group of Bruce Ames has started clinical trials (Phase 2) in 2009, to determine whether alpha-lipoic acid and acetyl-L-carnitine will lower systemic inflammation in SCD patients by reducing oxidative stress, which will result in a decrease in the frequency vaso-occlusive pain of episodes and improve their quality of life [42].

In 2008, Bao and coworkers dosed TNF α , IL-1 β , IL-2 and IL-2R cytokines in plasma and in culture supernatants of PBMCs stimulated with phytohemagglutinin-p (PHA) and zinc-supplemented of SCD patients. Zinc-supplemented patients exhibited significant decreases in LPS induced tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and IL-1 β mRNAs, and TNF-induced nuclear factor of κ B-DNA binding in MNCs, compared with the placebo group. Zinc supplementation also increased relative levels of IL-2 and IL-2R mRNAs in phytohemagglutinin-p-stimulated MNCs. These data suggest that zinc may act as an antioxidant by downregulating mRNAs of TNF and IL-1 β by decreasing NF- κ B activation [43]. This and other studies testing new drugs or supplements that modulate

the expression of cytokines and proteins relevant to the inflammatory process may be one of paths of treatment for SCD patients.

Most of the aforementioned studies have explored type I and II cytokines in sickle cell disease (Table 1). There is not much information concerning Th17 and Th22 pathway in the context of SCD in literature [36]. Thus, further studies would be necessary to understand the role of cytokines in SCD, including others studies involving polymorphism in interleukins. [44] showed the impact of the -251A>T IL-8 and -308G>A TNF genes polymorphism on the clinical phenotypes of SCA patients.

PERSPECTIVES

Understanding the roles of cytokines and chemokines as vectors of inflammation may be key to providing efficacious, beneficial therapies in SCD. Although alterations in inflammatory cytokines and biomarkers have been related in many articles, reports have been conflicting, and a conclusive role for these molecules in the disease remains to be established. The identification of gene polymorphisms in cytokines may identify new biomarkers and their effects on patient outcome in SCD.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (Facepe), Instituto de Ciência e tecnologia – Inovação Farmacêutica (INCT_If).

REFERENCES

1. Stuart MJ, Nagel RL. **Sickle-cell disease**. Lancet, 2004; 364:1343-60.
2. Pagnier J, Mears JG, Dunda-Belkhodja O, Schaefer-Rego KE, Beldjord C, Nagel RL, Labie D. **Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa**. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81(6):1771-3.
3. Serjeant GR. **Sickle-cell disease**. Lancet 1997; 350(9079):725-30.
4. Steinberg MH. **Management of sickle cell disease**. N Engl J Med. 1999; 340(13):1021–1030.

5. Bun, H.F. and Forget, B.G. **Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects.** W.B. Saunders, Philadelphia, 1986.
6. Pathare A, Kindi SA, Daar S, Dennison D. **Cytokines in sickle cell disease.** Hematology 2003; 8(5):329-37.
7. Kohne E. **Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment.** Dtsch Arztebl Int 2011; 108(31-32): 532-40.
8. Nagel RL, Bookchin RM, Johnson J, et al. **Structural bases of the inhibitory effects of hemoglobin F and hemoglobin A2 on the polymerization of hemoglobin S.** Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76:670–72.
9. Wun T. **The Role of Inflammation and Leukocytes in the Pathogenesis of Sickle Cell Disease; Haemoglobinopathy.** Hematology 2001; 5(5): 403-412.
10. Eaton WA, Hofrichter J. **Hemoglobin S gelation and sickle cell disease.** Blood. 1987; 70(5): 1245–1266.
11. Mozzarelli A, Hofrichter J, Eaton WA. **Delay time of Hemoglobin S polymerization prevents most cells from sickling in vivo.** Science. 1987; 237(4814):500–506.
12. Chiang EY, Frenette PS. **Sickle cell vaso-occlusion.** Hematol-Oncol Clin North Am 2005; 19(5):771–784.
13. Musa BO, Onyemelukwe GC, Hambolu JO, Mamman AI, Isa AH. **Pattern of serum cytokine expression and T-cell subsets in sickle cell disease patients in vaso-occlusive crisis.** Clin Vaccine Immunol 2010; 17(4):602-8.
14. Madigan C, Malik P. **Pathophysiology and therapy for haemoglobinopathies. Part I: sickle cell disease.** Expert Rev Mol Med 2006; 8(9):1-23.
15. Bourantas KL, Dalekos GN, Makis A, Chaidos A, Tsiara S, Mavridis A. **Acute phase proteins and interleukins in steady state sickle cell disease.** Eur J Haematol 1998; 61(1):49-54.
16. Francis RB Jr, Haywood LJ. **Elevated immunoreactive tumor necrosis factor and interleukin-1 in sickle cell disease.** J Natl Med Assoc 1992; 84(7):611-5
17. Pathare A, Al Kindi S, Alnaqdy AA, Daar S, Knox-Macaulay H, Dennison D. **Cytokine profile of sickle cell disease in Oman.** Am J Hematol 2004; 77(4):323-8.
18. Makis AC, Hatzimichael EC, Bourantas KL. **The role of cytokines in sickle cell disease.** Ann Hematol 2000; 79(8):407-13.

19. Singhal A, Doherty JF, Raynes JG, McAdam KP, Thomas PW, Serjeant BE, Serjeant GR. **Is there an acute-phase response in steady-state sickle cell disease?** Lancet.1993; 341(8846):651-3.
20. Croizat H. **Circulating cytokines in sickle cell patients during steady state.** Br J Haematol 1994; 87(3):592-7.
21. Hillery CA. **Potential therapeutic approaches for the treatment of vaso-occlusion in sickle cell disease.** Curr Opin Hematol 1998; 5(2):151-5.
22. Conran N, Franco-Penteado CF, Costa FF. **Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion.** Hemoglobin. 2009; 33(1): 1-16.
23. Wun T, Cordoba M, Rangaswami A, Cheung AW, Paglieroni T. **Activated monocytes and platelet-monocyte aggregates in patients with sickle cell disease.** Clin Lab Haematol. 2002; 24(2):81-8.
24. Graido-Gonzalez E.; Doherty J.C.; Bergreen E.W.; Organ G.; Telfer M.; McMillen M.A. **Plasma endothelin-1, cytokine, and prostaglandin E2 levels in sickle cell disease and acute vaso-occlusive sickle crisis.** Blood 1998; 92(7):2551-5.
25. Raghupathy R.; Haider M.Z.; AZIZIEH F.; D'souza T.M.; Abdelsalam R.; Adekile A.D. **Tumor necrosis factor-alpha is undetectable in the plasma of SS patients with elevated Hb F.** Am J Hematol. 2000 Jun;64(2):91-4.
26. Qari MH, Dier U, Mousa SA. **Biomarkers of inflammation, growth factor, and coagulation activation in patients with sickle cell disease.** Clin Appl Thromb Hemost 2012; 18(2):195-200.
27. Blei F, Faucher T, Guarini L: **Elevated levels of circulating molecules of potential endothelial origins in sickle cell disease.** Blood 1994; 84:409.
28. Taylor SC, Shacks SJ, Mitchell RA, Banks A. **Serum interleukin-6 levels in the steady state of sickle cell disease.** J Interferon Cytokine Res 1995 15(12):1061-4.
29. Taylor SC, Shacks SJ, Qu Z, Wiley P. **Type 2 cytokine serum levels in healthy sickle cell disease patients.** J Natl Med Assoc. 1997; 89(11):753-7.
30. Kuvibidila S.; Gardner R.; Ode D.; Yu L.; Lane G.; Warriar R.P. **Tumor necrosis factor alpha in children with sickle cell disease in stable condition.** J Natl Med Assoc 1997; 89(9):609-15

31. Taylor SC, Shacks SJ, Qu Z. **In vivo production of type 1 cytokines in healthy sickle cell disease patients.** J Natl Med Assoc. 1999; 91(11):619-24.
32. Rodrigues I, Costa F.F.; Saad s.t.; Grotto H.Z. **High levels of neopterin and interleukin-3 in sickle cell disease patients.** J Clin Lab Anal 2006; 20(3):75-9.
33. Lanaro C, Franco-Penteado CF, Albuquerque DM, Saad ST, 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 Feb;85(2):235-42.
34. Abboud MR, Taylor EC, Habib D, Dantzler-Johnson T, Jackson SM, Xu F, Laver J, Ballas SK. **Elevated serum and bronchoalveolar lavage fluid levels of interleukin 8 and granulocyte colony-stimulating factor associated with the acute chest syndrome in patients with sickle cell disease.** Br J Haematol 2000; 111(2): 482-90.
35. Asare K, Gee B.E.; Stiles J.K.; Wilson N.O.; Driss A, Quarshie A, Adams R.J.; Kutlar A, Hibbert J.M. **Plasma interleukin-1beta concentration is associated with stroke in sickle cell disease.** Cytokine 2010; 49(1):39-44.
36. Vilas-Boas W, Cerqueira BA, Zanette AM, Reis MG, Barral-Netto M, Goncalves MS. **Arginase levels and their association with Th17-related cytokines, soluble adhesion molecules (sICAM-1 and sVCAM-1) and hemolysis markers among steady-state sickle cell anemia patients.** Ann Hematol. 2010, 89(9):877-82.
37. Cerqueira BA, Boas WV, 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 56(2):471-6.
38. Garrido VT, Proença-Ferreira R, Dominical VM, Traina F, Bezerra MA, de Mello MR, Colella MP, Araújo AS, Saad ST, Costa FF, Conran N. **Elevated plasma levels and platelet-associated expression of the pro-thrombotic and pro-inflammatory protein, TNFSF14 (LIGHT), in sickle cell disease.** Br J Haematol. 2012; 158(6):788-97.
39. Lanzkron S, Strouse JJ, Wilson R, Beach MC, Haywood C, Park H, Witkop C, Bass EB, Segal JB. **Systematic review: Hydroxyurea for the treatment of adults with sickle cell disease.** Ann Intern Med 2008. 148(12):939-55. .

40. Platt OS. **Hydroxyurea for the treatment of sickle cell anemia.** N Engl J Med. 2008; 27;358(13):1362-9.
41. Strouse JJ, Lanzkron S, Beach MC, Haywood C, Park H, Witkop C, Wilson RF, Bass EB, Segal JB. **Hydroxyurea for sickle cell disease: a systematic review for efficacy and toxicity in children.** Pediatrics 2008; 122(6):1332-42.
42. Children's Hospital & Research Center Oakland. **“Antioxidant Therapy to Reduce Inflammation in Sickle Cell Disease”.** Clinical Trials, 20 Jan 2010. Web. 01 Feb. 2013.
43. Bao B, Prasad AS, Beck FW, Snell D, Suneja A, Sarkar FH, Doshi N, FitzgeraldJT, Swerdlow P. **Zinc supplementation decreases oxidative stress, incidence of infection, and generation of inflammatory cytokines in sickle cell disease patients.** Transl Res 2008; 152(2):67-80.
44. Cajado C, Cerqueira BA, Couto FD, Moura-Neto JP, Vilas-Boas W, Dorea MJ, Lyra IM, Barbosa CG, Reis MG, Goncalves MS. **TNF-alpha and IL-8: serum levels and gene polymorphisms (-308G>A and -251A>T) are associated with classical biomarkers and medical history in children with sickle cell anemia.** Cytokine 2011; 56(2):312-7.

TABLES

Table 1. An historical review of cytokines in sickle cell patients during steady-state or in vaso-occlusive crisis (VOC)

Article	Sample	Clinical Stage	Cytokines	Year
Francis et al.	Plasma	SS; VOC	TNF e IL-1 α	1992
Taylor et al.	Serum	SS	IL-6	1995
Taylor et al.	Serum	SS	IL-4, IL-6, IL-10	1997
Kubividila et al.	Plasma	SS	TNF- α	1997
Bourantas et al.	Serum	SS	TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10	1998
Graido-Gonzales et al.	Plasma	VOC	TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, e IL-10	1998
Taylor et al.	Serum	SS	IL-1, 2, 12, e IFN- γ	1999
Abboud et al.	Serum	SS; ACS	G-CSF, IL-1 β , TNF- α , IL-8	
Ragupathy et al.	Plasma	SS	TNF- α	2000
Wun et al.	CCS	SS; VOC	TNF α e IL-1 β	2002
Pathare et al.	Serum	SS; CVO	IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, TNF- α e IFN- γ	2004
Rodrigues et al.	Serum	SS	IFN- γ , IL-3	2006
Bao et al.	Plasma; CCS	SS	TNF- α , IL-1, IL-2	2008
Lanaro et al.	Plasma; CCS	SS	TNF- α , IL-8, IL-10	2009
Asare et al.	Plasma	SS	IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, G-CSF, GM-CSF	2010
Musa et al.	Serum	SS; VOC	IL-2, IL-4, e IL-10	2010
Vilas-Boas et al.	Serum	SS	TGF- β , IL-17, IL-23	2010
Cerqueira et al.	Serum	SS	IL-18	2011
Garrido et al.	Plasma	SS	TNFSF14	2012
Qari	Plasma	SS;VOC	IL-1 β , IL-6, IL-8	2012

CCS, cellular culture supernatant; SS, steady-state, VOC, vaso-occlusive crisis.

FIGURES

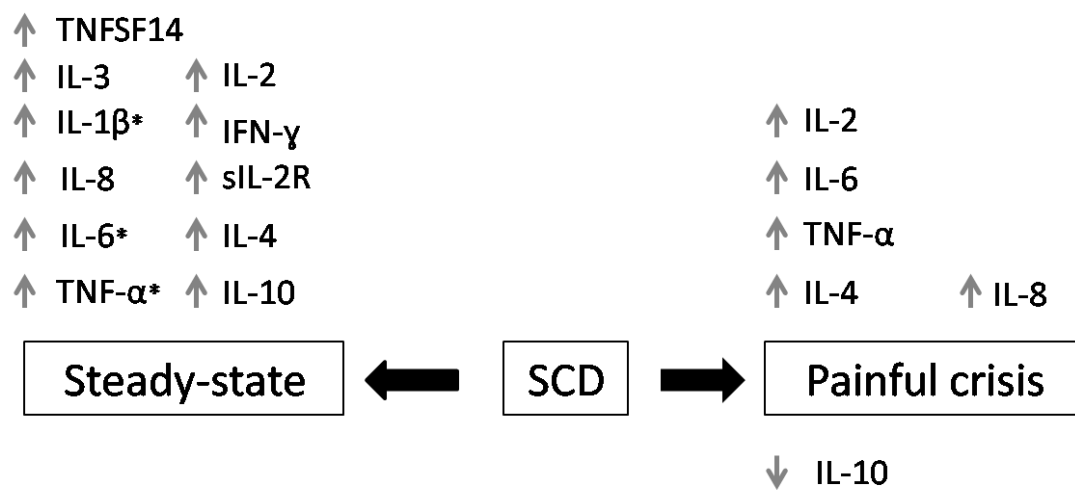


Figure 1. Cytokines related to SCD in steady state or in painful crisis (VOC). The IL-6, TNF and IL-1β level are much higher at SCD patients during steady state than during painful crisis (Qari et al., 2012).

12 ANEXO

Author's personal copy

Cytokine 65 (2014) 143–147



Contents lists available at ScienceDirect

Cytokine

journal homepage: www.journals.elsevier.com/cytokine

Evaluation of Th17 related cytokines associated with clinical and laboratorial parameters in sickle cell anemia patients with leg ulcers



Rafael Ramos da Silva^a, Michelly Cristiny Pereira^a, Moacyr Jesus Barreto Melo Rêgo^a,
Betania Lucena Domingues Hatzlhofer^d, Aderson da Silva Araújo^c, Marcos André Cavalcanti Bezerra^d,
Ivan da Rocha Pitta^{a,b}, Maira Galdino da Rocha Pitta^{a,*}

^aLaboratory of Immunomodulation and Novel Therapeutic Approaches (LINAT), Research Center for Therapeutic Innovation (NUPIT), UFPE, Recife, Brazil

^bLaboratory of Planning and Synthesis of Drugs (LPSF), Research Center for Therapeutic Innovation (NUPIT), UFPE, Recife, Brazil

^cHematology and Hemotherapy Foundation of Pernambuco, Recife, Brazil

^dLaboratory of Hematology, Central Laboratory, UFPE, Recife, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 March 2013

Received in revised form 18 November 2013

Accepted 24 November 2013

Available online 25 December 2013

Keywords:

Sickle cell anemia

Leg ulcer

Cytokines

Inflammation

Hemolysis

ABSTRACT

Leg ulcers (LUs) represent one of the main causes of morbidity in sickle cell anemia (SCA). This manifestation has been related to hemolysis, infections predisposition and inflammation that leads cytokines secretion. In this context, our study aimed to evaluate Th17 related cytokines (IL-6, IL-17A, IL-22 and IL-23) in serum and peripheral mononuclear cells culture supernatants with and without lymphoproliferative stimulation (anti-human CD3 and anti-human CD28). The cytokines levels were also correlated to clinical, hematological and biochemical parameters in SCA patients with and without LUs history (SCALU and SCAWH) as well as in healthy controls. In SCALU patients, high levels of IL-17A were associated with absence of acute chest syndrome (ACS, $p = 0.0328$). The other clinical parameters analyzed (osteonecrosis, stroke, priapism, splenectomy and blood transfusions history) were not significantly related with other cytokine levels. In SCALU patients was also observed that IL-17A increased levels were associated with high levels of LDH ($p = 0.0130$), the same association pattern was found for IL-6 (0.0160) and IL-22 ($p = 0.0165$) in the SCALU group. Interestingly, we did not find statistical correlations with these parameters in SCAWH group. The other hematological parameters (hemoglobin, leucocyte and reticulocyte count) and indirect bilirubin did not show any correlation with analyzed cytokines in both groups. So, for the first time, we show that IL-17A present in SCALU patients may exert a preventive role in the ACS development. Furthermore, IL-6, IL-17A and IL-22 accompanied the LDH levels only in SCALU patients suggesting to serve as additional markers of hemolysis or to be related with immunity response against extracellular pathogens.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The leg ulcers (LUs) are a debilitating condition in sickle cell anemia (SCA). This manifestation represents one of the most important cases of morbidity in SCA patients [1]. The LUs usually develops in SCA between 10 and 30 years old and with more prevalent in African countries [2]. These ulcers usually appear in the ankle region and are characterized by slow healing, frequent local pain and a high number of recurrences [3]. The pathophysiology of LUs in SCA patients remains unclear. Mohan and coworkers argue that the cause is due to venous insufficiency in the regions where

ulcers develop, preventing normal blood flow, causing hypoxia and tissue infarction [4].

Acute chest syndrome (ACS), osteonecrosis, priapism and stroke represent complications in SCA [5] being ACS the second most common cause of hospitalization in SCA patients [6]. The ACS is characterized by fever, leucocytosis, and respiratory symptoms leading to chronic lung damages [7–9]. These clinical manifestations are involved in two main processes in sickle cell disease: hemolysis and vascular occlusion [10]. Hemolysis leads to cardiovascular, pulmonary, gastrointestinal and renal manifestations [11]. Besides that, leg ulcers were also related to the intensity of hemolysis [12]. These events involve vascular occlusion and inflammatory process that involve many cell types, inflammatory mediators, cell adhesion molecules, and the presence of cytokines and chemokines which recruit cells to inflammatory sites, and induce immune responses [13–15].

IL-17A is the hallmark cytokine of Th17 cells and has been shown to function as a proinflammatory cytokine that upregulates

* Corresponding author. Address: Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), Diretoria de Inovação e Empreendedorismo, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Rua Thereza Amélia, s/n, Cidade Universitária, Recife, PE 50670-901, Brazil. Tel.: +55 81 9671 7788.

E-mail address: mgrpitta@gmail.com (M.G. da Rocha Pitta).

a number of chemokines and matrix metalloproteases, leading to the recruitment of neutrophils into sites of inflammation [16]. IL-22 is a family type II cytokine that is preferentially expressed by differentiated Th17 cells [17] and thus considered as a Th17 cytokine, but it is also expressed by other cells like CD8⁺ T cells and CD11c⁺ dendritic cells as showed by Zheng and coworkers [18]. Overall, Th17 cells produce multiple effector cytokines with partially overlapping roles in immunity. IL-23 can also directly promote Th17 differentiation by increasing ROR γ t expression in combination with IL-1 β and IL-6 [19]. IL-23 is a novel member of the IL-12 cytokine family and it is composed by a unique p19 subunit and an identical p40 subunit to IL-12 whereas IL-12 drives the classical Th1 response [20,21].

Most cytokine studies in SCA have evaluated cytokines produced by Th1 cells (IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-12) that are involved in innate immunity [22–24] and produced by Th2 cells (IL-4, IL-5, IL-13) in humoral immunity [25,26]. On the other hand, there are few studies associating clinical profiles with other cytokines pathway such as Th17 [27,28]. Th17 cells differentiation is driven by TGF- β and IL-6 [29,30] and is reinforced by IL-23 [31,32]. These cells mainly secrete IL-17 (A and F) but also produce IL-9 [33], IL-21, IL-22, IL-26, and CCL20 [34].

These mediators are responsible for a number of effector functions in host defense and in several autoimmune diseases [35].

Due to the lack of studies in this context, our study analyzed if the cytokines IL-6, IL-17A, IL-22 and IL-23 were related to clinical parameters in SCA patients with LUs. For this reason, we evaluated hematological and biochemical markers to identify whether there is a relation between the Th17 related cytokines and the laboratory parameters in these patients.

2. Materials and methods

2.1. Ethical approval

Ethics approval was obtained from ethical committee from Health Science Center of Federal University of Pernambuco and Hematology and Hemotherapy Foundation of Pernambuco (protocols 483/10 and 57/10 respectively).

2.2. Patients

All SCA patient (HbSS) blood samples were obtained from January 2011 to June 2012 during regular clinical visits at the Hospital of Hematology and Hemotherapy Foundation of Pernambuco (HEMOPE), Brazil. The SCA patients were divided into two groups: patients with active LUs (SCALU) and without LUs history (SCAWH). Healthy individuals were used as controls and also collected in the same place totalizing three groups. Informed written consent and the clinical questionnaire were obtained from all patients and controls. The inclusion criteria for all patients were at a steady-state condition and the exclusion criteria was to show no other systemic diseases that could have potentially altered their inflammatory profile functions and did not receive transfusions in less than 3 months or hydroxyurea therapy. All parameters used in the study were confirmed by clinical history contained in the medical records of the institution.

2.3. Isolation and culture conditions for peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

PBMCs were isolated from fresh peripheral blood collected in sodium heparin tubes, following an adapted method described previously by English and Andersen [36]. Briefly, whole blood was laid over one layer of Ficoll–Paque Plus (density gradient of 1.077 g/L,

GE Healthcare, Little Chalfont, UK) and centrifuged at 400g for 45 min, cells were washed once in PBS (pH 7.4) and washed once more in PBS, RBC lysis buffer was used for contaminating red cells for 10 min at 4 °C (Ebioscience, San Diego, CA, USA). PBMCs were incubated at 37 °C for 48 h under two conditions: unstimulated cells and stimulated cells with anti-human CD3 and anti-human CD28 (anti-humanCD3 + anti-humanCD28, Ebioscience, San Diego, CA, USA).

2.4. Cytokines measurements in serum and PBMCs culture supernatants

Serum was obtained from blood samples that were collected and centrifuged at 1258g for 15 min, and stored at –80 °C. Commercially available ELISA kits were used to determine IL-6 (BD Biosciences, NJ, USA), IL-17A, IL-22 and IL-23 (Ebioscience, San Diego, CA, USA). These cytokines were evaluated on culture supernatants of PBMCs incubated during 48 h with or without stimulation with anti-humanCD3 + anti-humanCD28 (Ebioscience, San Diego, CA, USA). The ELISA plates were read at 450 nm and 570 nm (EL808, Biotek, VT, USA). Following the detection limits of each kit: IL-6 (4.69 pg/ml), IL-17A (3.91 pg/ml), IL-22 (7.81 pg/ml), IL-23 (15.62 pg/ml).

2.5. Blood samples, hematological and biochemical evaluation

Peripheral blood samples obtained from EDTA tubes were analyzed for complete blood count (STKS, Coulter) and reticulocyte count. Sera obtained tubes were used to analyze serum levels of indirect bilirubin and lactate dehydrogenase (Cobas Integra plus 400, Roche).

2.6. Statistical analysis

Mann–Whitney test was used to correlate cytokines levels with clinical parameters using Graphpad Prism software (Version 5.0). The Spearman correlation test was used for hematological and biochemical evaluation associated with cytokines levels using Origin software (Version 8.0). A *p* value less than 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Th17 related cytokines levels in serum and PBMCs culture supernatants

First of all, we evaluated IL-6, IL-17A, IL-22 and IL-23 cytokines levels in serum patients. Only a few SCALU and SCAWH patients had cytokine levels above the kit's detection limit (Supplementary Fig. 1). All the three analyzed groups were not significantly different regarding their cytokine levels when comparing each other (*p* > 0.05). Because of these results, the association of serum cytokines levels with clinical, hematological and biochemical parameters became unfeasible. In this sense, our analysis were focused on PBMC culture supernatant. The IL-17A levels of stimulated cells were significantly higher in SCAWH group than controls (0.0195). We also observed the IL-17A high levels in SCALU group compared with controls but they were not significant. The IL-6, IL-22 and IL-23 levels was no statistical significant in either group (Fig. 1).

3.2. Correlation between Th17 related cytokine levels with clinical profile

The levels of IL-6, IL-17A, IL-22 and IL-23 were correlated to: acute chest syndrome, osteonecrosis, priapism, stroke, splenec-

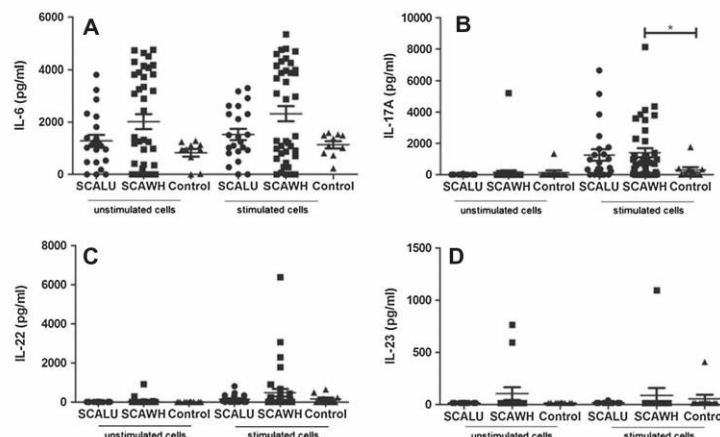


Fig. 1. Levels of IL-6, IL-17A, IL-22 and IL-23 in PBMCs culture supernatants. Data presented are means (–) and + SEM (Standard Error Mean). * p value = 0.0195. SCALU ($n = 24$), SCAWH ($n = 38$) and Control ($n = 10$).

tomy and history of transfusions. Firstly, we determined the characterization of SCA patients (Table 1). Then we compared the possibility of associations within SCALU and SCAWH groups. In SCALU patients high levels of IL-17A were associated with absence of acute chest syndrome ($p = 0.0328$). However IL-17A levels were also more expressed in SCAWH than SCALU patients with ACS historic ($p = 0.0483$). The associations of IL-17A with other parameters were not significant (Table 2). The ACS was confirmed in all cases by a new pulmonary infiltrate on Chester X-ray together with SPO_2 . The IL-6, IL-22 and IL-23 levels were not significantly associated with any clinical parameters (Supplementary Tables 1 and 2).

3.3. Correlation between supernatant Th17 related cytokine levels with laboratorial parameters

The Th17 related cytokines were correlated with value of Hb (total hemoglobin), WBC (leukocyte count), Ret (reticulocyte count), LDH (lactate dehydrogenase) and IB (indirect bilirubin). Only in SCALU patients was observed that increased levels of LDH were positively correlated with IL-6 ($p = 0.0191$, $r^2 = 0.287$), IL-17A ($p = 0.0130$, $r^2 = 0.419$) and IL-22 ($r^2 = 0.168$) (Fig. 2). The IL-23 had no positive correlation with any laboratorial parameter (data not shown). These laboratorial markers are always significantly altered comparing sickle cell anemia patients with normal controls.

4. Discussion

The classical view of sickle cell anemia has been focused on the primary genetic defect that lead to hemoglobin polymerization causing red cells deformity, becoming rigid, obstructing blood flow, and producing acute and chronic tissue damage because of poor perfusion [37]. A more complete view that allows that the sticky, stiff, oxidizing sickle red cell is an irritant process that not only obstruct blood flow but also provokes an inflammatory response are mandatory [38]. Serum markers of inflammation have provided evidence for a state of chronic inflammation in SCA patients [39]. Inflammation promotes endothelial adherence to sickle erythrocytes, leukocytosis, in the absence of infection, common in SCA patients and predicts for stroke, acute chest syndrome, and overall mortality [6].

Our results Th17 related cytokines correlation showed no differences between detecting levels of IL-6, IL-17A IL-22 and IL-23 in the serum of SCA patients and controls. In this latter case our result could be related with the nature appearing location of leg ulcers or the biological life time of these cytokines [40]. Levels of IL-17A obtained from stimulated cells could point to new hypotheses evaluation, mainly about the possible involvement of this cytokine with SCA events [27]. We associated the Th17 related cytokine levels in relation to the clinical history of each SCA group.

Vilas-Boas and coworkers [41] did not demonstrate correlation of IL-4, IL-17, IL-23 and TGF- β with clinical events in SCA patients

Table 1
Clinical parameters obtained from SCALU and SCAWH patients.

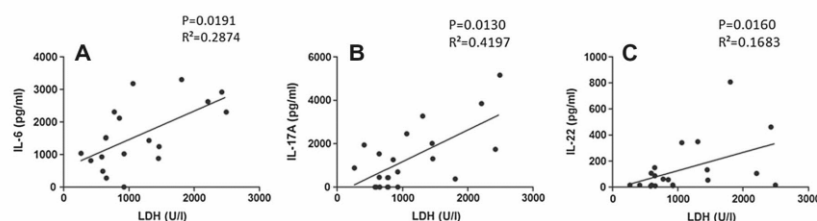
Clinical parameters	SCALU ($n = 24$)		SCAWH ($n = 42$)		Control ($n = 20$)
	n (%Yes)	n (%No)	n (%Yes)	n (%No)	
Male/female	13/11		20/22		10/10
Age	35 (21–59)		31 (18–50)		34 (21–58)
Osteonecrosis	8 (33)	16 (67)	6 (14.2)	36 (85.8)	–
Acute chest syndrome	7 (21.2)	17 (71.8)	18 (43)	24 (57)	–
Priapism ^a	5 (4.1)	8 (95.9)	3 (17)	15 (83)	–
Stroke	1 (0.2)	23 (95.8)	3 (7.2)	39 (92.8)	–
Splenectomy	2 (8)	22 (92)	1 (12)	41 (98)	–

^a The priapism percentage was considered only for men. The values represents number of patients (%) except Male/Female value are means (min–max).

Table 2

Levels of IL-17A associated with clinical parameters in SCALU and SCAWH patients.

Clinical parameters	SCALU (n = 24)		p Value	SCAWH (n = 38)		p Value	SCALU X SCAWH p Value
	Yes	No		Yes	No		
Acute chest syndrome	309.1 (124.5)	1956 (487.5)	0.0328	1156 (313.6)	1620 (464.3)	0.9650	0.0483
Osteonecrosis	1889 (697.4)	1226 (415.2)	0.5151	1292 (637.5)	1420 (320.3)	0.7793	0.9485
Priapism	1324 (430.1)	1840 (818.1)	0.9413	3981 (2349)	1240 (293.9)	0.3419	0.3929
Stroke	437.6 (0)	1491 (371.6)	ND	1945 (950.6)	1353 (300.8)	0.2131	ND
Splenectomy	633.1 (629.2)	1276 (1433)	ND	4374 (0)	1320 (280.7)	ND	ND
History of transfusions	1775 (800.3)	1104 (312.8)	0.3878	1619 (538.9)	1322 (339.8)	0.9868	1.000

Data presented as means (standard error). ND, Non-determined. The bold values indicate a statistical significance ($p < 0.05$).**Fig. 2.** Associated between of IL-6 (A), IL-17A (B) and IL-22 (C) Levels with lactate dehydrogenase values in SCALU patients.

in steady state. Our association between IL17A with clinical parameters showed an interesting result. Only in SCALU patients, the increased level of IL-17A was related with ACS. The ACS affects SCA patients older than 2 years being considered one of the most frequent complications and major cause of morbidity and mortality in SCA [7]. Data from the Clinical Course of Sickle Cell Disease Cooperative Study indicates that the ACS occurs in 10.5% of patients per year [8] where infectious agents are responsible for more than one third of cases. Extensive antibiotic therapy is usually used in this case, even when the infection does not have a clear etiology [42]. IL-17 and IL-22 synergistically act to augment the expression of genes involved in the defense against microbial pathogens such as the β -defensin2 gene in keratinocytes [17]. For example, an analysis of mycobacteria-specific Th17 cells in exposed humans revealed that most of these cells expressed either IL-22 or IL-17 but not both cytokines [43]. Consistent with this hypothesis, mice with targeted deletion of IL-17RA have significant defects in host defense. IL-17R signaling is critical for G-CSF and CXCL chemokine production, and IL-17R deficient mice exhibit a delay in neutrophil recruitment into the alveolar space hindering the immune response that would allow the destruction and expulsion of pathogens [44]. These data suggest that decreased levels of IL-17 could favor the risk to infection. Our associations compared to clinical parameters indicate that IL-17A may exert a preventive role in the development of ACS related to pathogens. Because the results were only found among patients with leg ulcers, possibly the action of related Th17 cytokines is antimicrobial due to predisposing factor of leg ulcers to local infections [45].

Taylor et al. hypothesized that the degree of hemolysis is a key determinant influencing a phenomic spectrum of complications that reflect the severity of sickle vasculopathy. In sickle cell disease two thirds of hemolysis occur extravascularly, the remaining one third of red cells hemolyze intravascularly. Along with reticulocyte count, indirect bilirubin level, and serum haptoglobin, LDH has been used as a marker of hemolysis. Serum LDH is also usually elevated in sickle cell anemia in the steady state. This robust hemolytic rate increases even more during vaso-occlusive pain crisis (VOC) [46]. Our results reveal that the LDH levels positively correlated with IL-6, IL-17A and IL-22 being favorable for hemolysis.

This hemolysis will lead to ischemic events involving interactions between erythrocytes, leukocytes and endothelium cells [15]. Although the levels of hemoglobin, reticulocytes, leukocytes and bilirubin are abnormal when compared to healthy controls, our results indicated that there was no positive correlation related to IL-17A and IL-22 levels.

It is possible to define the presence of pathogens is strongly related to the formation of biofilms. This colonization of bacteria predominantly characterize chronic wounds, with the presence of inflammatory exudate, poor healing and chronic ulcers, present in the group with sickle cell leg ulcers [47,48]. Due to the presence of cytokines related to Th17 only in SCALU patients, there may be an association between these cytokines and the role of immunity against extracellular pathogens in these patients. Thus our data together shows that IL-17A and IL-22 cytokines act as biomarkers of clinical and hematological changes in patients with ACS points out some differences between SCALU and SCAWH patients that could be correlated with different clinical and biological behavior of these patients.

Acknowledgments

This study was supported by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT_if).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2013.11.012>.

References

- [1] Serjeant GR. Leg ulceration in sickle cell anemia. Arch Int Med 1974;133:690–4.
- [2] Akinyanju O, Akinsete I. Leg ulceration in sickle cell disease in Nigeria. Trop Geogr 1974;31:87–91.
- [3] Koshy M, Entsuah R, Koranda A, Kraus AP, Johnson R, Bellvue R, et al. Leg ulcers in patients with sickle cell disease. Blood 1989;74:1403–8.

- [4] Mohan JS, Vigilance JE, Marshall JM, Hambleton IR, Reid HL, Serjeant GR. Abnormal venous function in patients with homozygous sickle cell (SS) disease and chronic leg ulcers. *Clin Sci (Lond)* 2000;98(6):667–72.
- [5] Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet* 2010;376(9757):2018–31.
- [6] Buchanan GR, DeBaun MR, Quinn CT, Steinberg MH. Sickle cell disease. *Hematology Am Soc Hematology Educ Program* 2004:35–47.
- [7] Vichinsky EP, Neumayr LD, Earles AN, et al. Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. *N Engl J Med* 2000;342:1855–65.
- [8] Castro O, Brambilla DJ, Thornton B, Reinhardt CA, Scott RB, Gillette Pet AL. The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors: the cooperative study of sickle cell disease. *Blood* 1994;84:643–9.
- [9] Powars D, Weidman J, Odom-Maryon T, Niland J, Johnson C. Sickle cell chronic lung disease: prior morbidity and the risk of pulmonary failure. *Medicine* 1998;67:66–76.
- [10] Malowany JL, Butany J. Pathology of sickle cell disease. *Semin Diagn Pathol* 2012;29(1):49–55.
- [11] 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.
- [12] Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev* 2007;21(1):37–47.
- [13] Lanaro C, Franco-Penteado CF, Albuquerque DM, Saad ST, Conran N, Costa FF. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of SCA patients and effects of hydroxyurea therapy. *J Leukoc Biol* 2009;85(2):235–42.
- [14] Napolitani G, Acosta-Rodriguez EV, Lanzavecchia A, Sallusto F. E2 enhances Th17 responses via modulation of IL-17 and IFN- γ production by memory CD4⁺T cells. *Eur J Immunol* 2009;39(5):1301–12.
- [15] Makis AC, Hatzimichael EC, Bourantas KL. The role of cytokines in sickle cell disease. *Ann Hematology* 2000;79(8):407–13.
- [16] Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 2007;25:821–52.
- [17] Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 2006;203(10):2271–9.
- [18] Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, Kasman I, Eastham-Anderson J, Wu J, et al. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 2007;445(7128):648–51.
- [19] Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel JE, et al. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TG F- β signaling. *Nature* 2010;467:967–71.
- [20] Steinman L. A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/ TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 2007;13:139–45.
- [21] Hunter CA. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol* 2005;5:521–31.
- [22] Taylor SC, Shacks SJ, Qu Z. In vivo production of type 1 cytokines in healthy sickle cell disease patients. *J Natl Med Assoc* 1999;91(11):619–24.
- [23] Kuvibidila S, Gardner R, Ode D, Yu L, Lane G, WARRIER RP. Tumor necrosis factor alpha in children with sickle cell disease in stable condition. *J Natl Med Assoc* 1997;89(9):609–15.
- [24] Francis RBJR, Haywood LJ. Elevated immunoreactive tumor necrosis factor and interleukin-1 in sickle cell disease. *J Natl Med Assoc* 1992;84(7):611–5.
- [25] Pathare A, Al Kindi S, Alnaqdy AA, Daar S, Knox-Macaulay H, Dennison D. Cytokine profile of sickle cell disease in Oman. *Am J Hematology* 2004;77(4):323–8.
- [26] Taylor SC, Shacks SJ, Qu Z, Wiley P. Type 2 cytokine serum levels in healthy sickle cell disease patients. *J Natl Med Assoc* 1997;89(11):753–7.
- [27] Vilas-Boas W, Cerqueira BA, Zannete AM, Reis MG, Barral-Netto M, Gonçalves MS. Arginase levels and their association with Th17-related cytokines, soluble adhesion molecules (sICAM-1 and sVCAM-1) and hemolysis markers among steady-state SCA patients. *Ann Hematology* 2010;89(9):877–82.
- [28] Asare K, Gee BE, Stiles JK, Wilson NO, Driss A, Quarshie A, et al. Plasma interleukin-1 β concentration is associated with stroke in sickle cell disease. *Cytokine* 2010;49(1):39–44.
- [29] Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006;441:235–8.
- [30] Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006;24(2):179–89.
- [31] Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, Chang SH, Wang D, Watovich SS, et al. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem* 2007;282:9358–63.
- [32] Zhou L, Ivanov IL, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, et al. Littman. IL-6 programs TH-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 2007;8:967–74.
- [33] Beriou G, Bradshaw EM, Lozano E, Costantino CM, Hastings WD, Orban T, et al. TGF- β induces IL-9 production from human Th17 cells. *J Immunol* 2010;185(1):46–54.
- [34] Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 2007;8(9):950–7.
- [35] Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 2009;27:485–517.
- [36] English D, Andersen BR. Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque. *J Immunol Methods* 1974;5:249–52.
- [37] Platt OS. Preventing stroke in sickle cell anemia. *N Engl J Med* 2005;353(26):2743–5.
- [38] 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.
- [39] Wun T. The role of inflammation and leukocytes in the pathogenesis of sickle cell disease. *Haemoglobinopathy Hematology* 2001;5(5):403–12.
- [40] Tarrant JM. Blood cytokines as biomarkers of in vivo toxicity in preclinical safety assessment: considerations for their use. *Toxicol Sci* 2010;117(1):4–16.
- [41] Wendell Vilas Boas, Cerqueira Bruno AV, Zanette Angela AD, Reis Mittermayer G, Gonçalves Marilda S. Cytokines and clinical events in the sickle cell anemia. *Gaz Méd Bahia* 2010;80(3):53–5.
- [42] Emre U, Miller ST, Gutierrez M, Steiner P, Rao SP, Rao M. Effect of transfusion in acute chest syndrome of sickle cell disease. *J Paediatr* 1995;127:901–4.
- [43] Scriba TJ, Kalsdorf B, Abrahams DA, Isaacs F, Hofmeister J, Black G, et al. Distinct, specific IL-17- and IL-22-producing CD4⁺ T cell subsets contribute to the human anti-mycobacterial immune response. *J Immunol* 2008;180(3):1962–70.
- [44] Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Sch-warzenberger P, et al. Requirement of interleukin 17 receptor signalling for lung CXCL chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* 2001;194:519–27.
- [45] Serjeant GR, Serjeant BE, Mohan JS, Clare A. Leg ulceration in sickle cell disease: medieval medicine in a modern world. *Hematology Oncol Clin North Am* 2005;19(5):943–56.
- [46] Taylor 6TH JG, Nolan VG, Mendelsohn L, Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Chronic hyper-hemolysis in sickle cell anemia: association of vascular complications and mortality with less frequent vasoocclusive pain. *PLoS One* 2008;3(5):e2095. 7:1–9.
- [47] James GA, Swogger E, Wolcott R, Pulcini Ed, Secor P, Sestrich J, et al. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2008;16(1):37–44.
- [48] Klaus Kirketerp-Møller, Karen Zulkowski, Garth James. Chronic wound colonization, infection, and biofilms. *Biofilm Infections* 2011:11–24.