

PÉRICLES MENDONÇA DIAS DA MOTTA

**LIBERAÇÃO DE RADICAIS LIVRES POR LEUCÓCITOS
DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

Este exemplar corresponde à versão final do exemplar da Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração Pediatria.

Campinas, 13 de junho de 2002.



Prof. Dr. Antonio Condino Neto
Orientador

CAMPINAS

2002

PÉRICLES MENDONÇA DIAS DA MOTTA

**LIBERAÇÃO DE RADICAIS LIVRES POR LEUCÓCITOS
DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de
Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente, área
de Pediatria.*

Orientador: Prof. Dr. Antonio Condino Neto

CAMPINAS

2002

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	UNICAMP
	M858L
V	EX
TOMBO BCI	51837
PROC.	16-837-02
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	16/12/02
Nº CPD	

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

CM00177094-0

BIB 10 272470

M858L Motta, Péricles Mendonça Dias da
 Liberação de radicais livres por leucócitos de pacientes com anemia falciforme / Péricles Mendonça Dias da Motta. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador : Antonio Condino Neto
 Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Óxido Nítrico. 2. Antioxidantes. 3. *Expressão Gênica. 4. *Superóxido. 5. *NADH- Oxidase. 6. *Glutaciona peroxidase. I. Antonio Condino Neto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador:

Prof. Dr. Antonio Condino Neto

Membros:

1. Prof. Dr. Antonio Condino Neto

2. Prof. Dr. Dewton de Moraes Vasconcelos

3. Profa. Dra. Paulina Sannomiya

4. Profa. Dra. Sara Terezinha Ollala Saad

5. Prof. Dr. Edson Antunes

Curso de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 2002

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado aos pacientes com anemia falciforme, que mesmo sofrendo de uma doença crônica e incapacitante, nunca perderam o entusiasmo pela vida

AGRADECIMENTOS

À minha mulher, Yara, pela compreensão e paciência;

aos colegas de laboratório: Marta, Donato, Marcelo, Sissi, Juan, Piedad, Lina, Carolinas, Monica e Lívia, pela ajuda, camaradagem e pelo incentivo;

à Jussara, pela disponibilidade e ajuda;

ao Prof. Dr. Gilberto De Nucci, pela oportunidade de ter podido iniciar os trabalhos no seu laboratório;

à Prof. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela e ao Prof. Dr. José Dirceu Ribeiro, pelas palavras de apoio;

ao Prof. Dr. Peter Edwin Newburger e à Profa. Constance Whitney da Universidade de Massachusetts, pelo acolhimento e incentivo.

Por fim, a conclusão deste trabalho seria inviável sem a força propulsora do orientador, Prof. Dr. Antonio Condino Neto. Mais do que por uma competente orientação técnica, fui conduzido pelo seu otimismo, confiança e entusiasmo.

	<i>Pág</i>
RESUMO	<i>xxix</i>
ABSTRACT	<i>xxxv</i>
1. INTRODUÇÃO	41
1.1. Anemia falciforme.....	43
1.2. Falcização.....	44
1.3. Anemia falciforme e inflamação.....	47
1.4. Moléculas de adesão.....	49
1.5. Radicais livres, microcirculação e atividade microbicida.....	51
1.5.1. Reativos intermediários do oxigênio.....	51
1.5.2. Sistema antioxidante dos leucócitos.....	56
1.5.3. Reativos intermediários do nitrogênio.....	60
2. OBJETIVOS	63
2.1. Objetivos gerais	65
2.2. Objetivos específicos.....	65
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	67
3.1. Seleção de pacientes, controles e obtenção de células.....	69
3.1.1. Pacientes.....	69

3.1.2. Controles sadios.....	70
3.1.3. Coleta de sangue.....	70
3.1.4. Obtenção de granulócitos e leucócitos mononucleares de sangue periférico.....	70
3.1.5. Obtenção de plaquetas.....	71
3.2. Detecção do óxido nítrico liberado por granulócitos e leucócitos mononucleares.....	72
3.3. Dosagem do superóxido liberado por granulócitos e leucócitos mononucleares.....	73
3.4. Atividade da glutathione peroxidase celular dos granulócitos e leucócitos mononucleares.....	74
3.5. Atividade da superóxido dismutase dos granulócitos e leucócitos mononucleares.....	75
3.6. Expressão dos genes dos componentes gp91 ^{-phox} , p22 ^{-phox} e p67 ^{-phox} do sistema NADPH-oxidase dos leucócitos mononucleares.....	76
3.6.1. Obtenção de RNA.....	76
3.6.2. Transcrição reversa.....	77
3.6.3. Reação em cadeia da polimerase.....	77
3.7. Fosforilação de proteínas celulares de 47kDa dos leucócitos mononucleares.....	79
3.8. Materiais.....	80
3.9. Análise estatística.....	81

4. RESULTADOS.....	85
4.1. Detecção do óxido nítrico liberado por granulócitos e leucócitos mononucleares.....	87
4.2. Dosagem do superóxido liberado por granulócitos e leucócitos mononucleares.....	95
4.3. Atividade da glutathione peroxidase celular dos granulócitos e leucócitos mononucleares.....	97
4.4. Atividade da superóxido dismutase granulócitos e leucócitos mononucleares.....	99
4.5. Expressão dos genes dos componentes gp91 ^{-phox} , p22 ^{-phox} e p67 ^{-phox} do sistema NADPH-oxidase dos leucócitos mononucleares.....	102
4.6. Fosforilação de proteínas celulares de 47kDa dos leucócitos mononucleares.....	108
5. DISCUSSÃO.....	111
6. CONCLUSÃO.....	127
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131
8. ANEXOS.....	163

SÍMBOLOS, ABREVIATURAS e FÓRMULAS QUÍMICAS

BH ₄	Tetraidrobiopterina
CD	“Cluster of differentiation”
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CuZn-SOD	SOD citosólica
DGC	Doença granulomatosa crônica
DNA	Ácido desoxirribonucléico
D-NAME	N ^w -nitro-d-arginina metil ester
DNase	Enzimas inativadoras do DNA
EDRF	Fator de Relaxamento do Endotélio, em língua inglesa: “Endothelium Derived Relaxing Factor”
EDTA	Etileno diamino tetra ácido acético
FAD	Flavina-adenina dinucleotídeo
GMPC.	Guanosina monofosfato cíclico
GSH	Glutathiona peroxidase reduzida
GSH redutase	Glutathiona reductase
GSH-Px	Glutathiona peroxidase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio

HbA	Hemoglobina A
HbS	Hemoglobina falciforme
HCl	Ácido clorídico
HEPES	N-2-Hidroetilpiperazina-N-2-Etano Ácido Sulfônico
HHBSS	Solução salina equilibrada (com HEPES) de Hank
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IFN- γ	Interferon-gama
I κ B	Inibidor kappa B
IL	Interleucina
L-arginina	N^G -Monometil-L-Arginina metil ester
L-NAME	N^W -nitro-L-arginina metil ester
L-NIO	L-N(5)-(1 iominoetil) ornitina
L-NMMA	NG-monometil-L-arginina
LPS	Lipopolissacarídeo
Mn-SOD	SOD mitocondrial
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NF κ B	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase

Nox	Homólogos da NADPH-oxidase
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ⁻	Superóxido
OH [·]	Radical hidroxila
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PMA	Forbol miristato acetato
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
RNAse	Enzimas inativadoras do RNA
rRNA 18S	Ácido ribonucléico ribossômico 18S
RT-PCR	Transcrição reversa de uma amostra de RNA seguida de amplificação do cDNA pela reação de polimerase em cadeia
SDS	Dodecil sulfato de sódio (Sodium dodecyl sulfate)
SOD	Superóxido dismutase
TAE	solução TAE: Tris acetato 0,04M; EDTA 0,001M
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
Tris	Tris-hidroximetil-nitrometano
VCAM-1	Molécula de adesão vascular-1
VLA	Antígeno de ativação muito tardio (Very late activation antigen)
ZYM	Zimosan

LISTA DE TABELAS

	<i>Pág</i>
TABELA 1 : Inibição da agregação de plaquetas por granulócitos.....	89
TABELA 2 : Inibição da agregação de plaquetas por leucócitos mononucleares...	93

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág</i>
FIGURA 1 : Ilustração com hemácias de paciente com anemia falciforme....	46
FIGURA 2 : Diagrama representativo do sistema NADPH oxidase com seus componentes citoplasmáticos e membranosos.....	53
FIGURA 3 : Esquema representativo do sistema antioxidante dos leucócitos	58
FIGURA 4 : Representação do experimento para determinação da fase linear da amplificação durante o ensaio de PCR, utilizada no método de quantificação relativa.....	82
FIGURA 5 : Verificação da proporção do oligonucleotídeo iniciador do controle interno (r18S) e do seu competidor	83
FIGURA 6 : Ensaio para detecção de óxido nítrico liberado por granulócitos.....	91
FIGURA 7 : Ensaio para detecção de óxido nítrico liberado por leucócitos mononucleares.....	94
FIGURA 8 : Liberação de superóxido pelos granulócitos.....	96
FIGURA 9 : Liberação de superóxido pelos leucócitos mononucleares.....	97
FIGURA 10 : Atividade da glutathione peroxidase intraleucocitária	98
FIGURA 11 : Atividade da SOD nos granulócitos de pacientes com anemia falciforme e de controles sadios.....	100

FIGURA 12 :	Atividade da SOD dos leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme e de controles sadios.....	101
FIGURA 13 :	Análise dos transcritos da gp91 ^{phox} em preparação de RNA total de leucócitos mononucleares por meio de experimento RT-PCR.....	103
FIGURA 14 :	Análise dos transcritos da p22 ^{phox} em preparação de RNA total de leucócitos mononucleares por meio de experimento RT-PCR.....	105
FIGURA 15:	Análise dos transcritos da p67 ^{phox} em preparação de RNA total de leucócitos mononucleares por meio de experimento RT-PCR.....	107
FIGURA 16 :	Fotografia representativa da fosforilação de proteínas celulares	109
FIGURA 17 :	Fosforilação de proteínas celulares de 47kDa dos leucócitos mononucleares.....	110



RESUMO

A anemia falciforme é uma alteração genética das hemácias, caracterizada por hemólise crônica e episódios de crises de oclusão vascular. O defeito genético consiste em uma mutação na posição 6 da cadeia β da hemoglobina, que confere às hemácias alterações na sua forma e estrutura, tornando-as mais rígidas, deformadas e distorcidas, com tendência para a formação de polímeros e conseqüente obstrução do fluxo sanguíneo. Um simples ponto de mutação transforma a anemia falciforme em uma entidade clínica heterogênea, sugerindo a idéia de que diferentes mecanismos possam estar envolvidos. O mecanismo exato, pelo qual o fluxo sanguíneo normal é interrompido pelas hemácias, ainda não é totalmente esclarecido.

Numa doença como a anemia falciforme, na qual a velocidade da passagem das hemácias rígidas pelos vasos sanguíneos tem importância relevante, o tônus e a regulação vascular assumem papel primordial, sendo este controle mediado, em parte, pelo óxido nítrico, cuja ação é inibida pelo superóxido. Diversos estudos têm indicado o envolvimento da lesão endotelial e do processo inflamatório subclínico no desencadeamento e progressão dos processos da oclusão vascular. A participação dos leucócitos no dano aos tecidos dos pacientes com anemia falciforme é objeto de investigação, sendo a leucocitose um fator de mau prognóstico na doença.

Investigou-se inicialmente a liberação do óxido nítrico pelos leucócitos, analisando sua capacidade de inibir a agregação de plaquetas lavadas induzida pela trombina. Os resultados mostram que os granulócitos de pacientes com anemia falciforme (n=9) liberam óxido nítrico de maneira similar aos granulócitos de controles sadios (n=9), pois foi necessário um número semelhante de células para inibir a agregação plaquetária (mediana de $4,4 \times 10^6$ e $4,3 \times 10^6$, respectivamente). Na ausência de SOD, não foi detectada liberação de óxido nítrico pelos leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme (n=9), pois eles não afetaram a agregação de plaquetas nesta situação. Na presença de SOD, não houve diferença na liberação do óxido nítrico entre leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme e controles, pois o número de leucócitos mononucleares necessário para inibir a agregação de plaquetas foi semelhante entre os pacientes (mediana de $3,4 \times 10^6$ ml, n=9) e os controles sadios (mediana de $3,3 \times 10^6$ ml, n=9).

Os fagócitos contêm uma nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (forma reduzida) associada à sua membrana citoplasmática, que gera superóxido e outros reativos intermediários tóxicos do oxigênio, os quais apresentam potencial de injúria aos tecidos. O sistema NADPH-oxidase é composto por cinco subunidades: p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} existem no citosol como um complexo. Os outros dois componentes gp91^{phox} e p22^{phox} formam o citocromo b₅₅₈ que se localiza na membrana celular e funciona como o carreador final de elétrons da oxidase. Depois de ativado, o complexo citosólico migra para a membrana e liga-se ao citocromo b₅₅₈, ativando a oxidase.

Desenvolveu-se uma série de estudos sobre o sistema NADPH oxidase leucocitário dos pacientes com anemia falciforme na forma homozigota, estáveis e fora de crises.

Para se estudar a liberação do superóxido pelos leucócitos de pacientes com anemia falciforme, utilizou-se o ensaio da redução do citocromo c especificamente inibida pela SOD. Os resultados demonstram que os granulócitos de pacientes com anemia falciforme (n=22) e de controles sadios (n=17) liberam superóxido em quantidades semelhantes. Os leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme (n=22) liberam mais superóxido quando estimulados com PMA ou Zimosan do que os dos controles sadios (n=17). Estes resultados, tomados em conjunto, sugerem que exista uma predominância de reativos intermediários do oxigênio na anemia falciforme.

Nas células com exposição aos reativos intermediários do oxigênio, há um sistema antioxidante para proteção e eliminação dos radicais livres formados. Para se avaliar a atividade da SOD nos leucócitos de pacientes com anemia falciforme (n=10), utilizou-se a inibição competitiva da redução do citocromo c desencadeada pela xantina oxidase e para verificar-se a atividade da GSH-Px (n=10), utilizou-se o método da oxidação do NADPH pelo t-butil hidroperóxido. Não foram encontradas diferenças significativas nas atividades da SOD e da GSH-Px em relação ao observado nos controles sadios (n=10, p>0,05, nas duas situações, teste de Mann-Whitney).

Em seguida, iniciou-se o ensaio da expressão dos genes que codificam os componentes da NADPH-oxidase, gp91^{-phox}, p22^{-phox} e p67^{-phox}, que foi investigada por intermédio da transcrição reversa, seguida pela reação da polimerase em cadeia, pelo método da quantificação relativa, utilizando-se o RNA 18S como controle interno. Os resultados mostram que os leucócitos mononucleares dos pacientes (n=21) expressam mais o gene que codifica o componente gp91^{-phox} em relação aos controles sadios (n=23, p=0,036, teste de Mann-Whitney) e expressam os genes que codificam os componentes p22^{-phox} (n=24 controles e 24 pacientes) e p67^{-phox} (n=22 controles e 22 pacientes) em níveis semelhantes aos controles sadios (p>0,05, em ambas as situações, teste de Mann-Whitney).

Finalmente, estudou-se a fosforilação das proteínas citoplasmáticas, especialmente as de peso 47kDa, pela incorporação do fósforo radioativo (³²P) em suspensões de leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme (n=4, 4 x10⁶ células/ml) e de controles sadios (n=6, 4 x10⁶ células/ml). No estado basal ou após estímulo com PMA (30µM), encontrou-se maior fosforilação das proteínas celulares com 47kDa nos leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme, quando comparadas às dos controles sadios.

Os resultados dos nossos trabalhos demonstraram que: leucócitos de pacientes com anemia falciforme homozigotos, estáveis e fora de crises, liberam óxido nítrico em quantidade similar aos dos controles sadios; os leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme produzem mais superóxido *in vitro*, quando estimulados com PMA ou ZYM; não há aumento proporcional do sistema antioxidante dos leucócitos; os leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme expressam mais o gene que codifica o componente gp91^{-phox} do sistema NADPH-oxidase e têm a fosforilação das proteínas celulares de 47kDa mais intensa, quando comparados aos leucócitos mononucleares de controles sadios. Estes achados, em conjunto, indicam que o sistema NADPH-oxidase está ativado nestas células e pode ser responsável, pelo menos em parte, por inativar o óxido nítrico, constituindo um fator de risco para as crises de oclusão vascular e manutenção da inflamação na anemia falciforme.



ABSTRACT

Sickle cell anemia is a genetic disorder of red blood cells characterized by chronic hemolysis and episodic vaso-occlusive crisis. The molecular defect is caused by a point mutation at the 6th position of the β chain of hemoglobin, which leads erythrocytes to abnormal sickle shape, rigidity, deformability and distortion with consequent blood flow obstruction. A single point mutation leads sickle cell disease to a clinical heterogeneous disorder, supporting the idea that a different set of mechanisms might be involved in this disease. It is still not completely understood how sickle erythrocytes interrupt blood flow.

Current evidence indicate that endothelium damage, and a subclinical inflammatory process take place in the initiation and progression of vascular occlusion. The role of leukocytes in the tissue injury of sickle cell anemia patients is a current subject of investigation.

The NADPH-oxidase system of professional phagocytes catalyzes the production of superoxide by the one-electron reduction of oxygen (respiratory burst). This is the starting point for the production of reactive oxidants species, which are potential tissue injury mediators. The NADPH-oxidase system is composed by five components: p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} exist in the cytosol as a complex. The other two components gp91^{phox} and p22^{phox} form the cytochrome *b*₅₅₈ in the cell membrane and function as the terminal electron carrier of the oxidase. After activation, the cytosolic complex migrate to membrane binding to cytochrome *b*₅₅₈ and assembly the active oxidase.

The involvement of the leukocyte NADPH-oxidase system has not been investigated before in sickle cell anemia. The experimental approach was focused on:

- a) the release of nitric oxide by neutrophils and mononuclear leukocytes from sickle cell anemia patients. It was assayed by the ability of leukocytes to inhibit thrombin-induced washed platelet aggregation. Neutrophils from sickle cell anemia patients released nitric oxide in a similar manner to those from healthy controls. The inhibition of platelet aggregation by neutrophils from sickle cell anemia or from healthy controls was blocked by L-NAME (300 μ M), but not by D-NAME (300 μ M), and was reversed by L-arginine (1mM). Additionally, a similar number of neutrophils from sickle cell anemia

patients and from healthy controls was required to inhibit platelet aggregation. Mononuclear leukocytes from sickle cell anemia patients inhibited platelet aggregation only in the presence of superoxide dismutase (60 U ml^{-1})

- b) the release of superoxide by neutrophils and mononuclear sickle cell anemia leukocytes. It was assayed by the SOD specific inhibition of cytochrome c reduction assay. PMA (30nM) or ZYM (100 particles/cell)-induced release of superoxide by mononuclear leukocytes from sickle cell anemia patients was significantly higher than that observed in mononuclear leukocytes from healthy controls ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectively, Mann-Whitney test). The levels of superoxide released by neutrophils from sickle cell anemia patients was similar to those from healthy controls.
- c) the activity of SOD or cellular glutathione peroxidase in neutrophils and mononuclear leukocytes from sickle cell anemia patients was assayed by the xantine-oxidase induced cytochrome c reduction and the cellular glutathione peroxidase activity was assayed by the NADPH oxidation induced by t-buthyl hydroperoxide. The activities of SOD and GHS-Px in neutrophils and mononuclear sickle cell anemia leukocytes were similar to those from healthy controls
- d) the gene expression of $gp91^{\text{phox}}$, $p22^{\text{phox}}$ and $p67^{\text{phox}}$ in mononuclear sickle cell anemia leukocytes. Monocytes' RNA from steady state sickle cell disease patients and healthy control subjects were used in a quantitative-relative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). The results revealed that $gp91^{\text{phox}}$ relative gene expression in mononuclear leukocytes from sickle cell anemia patients ($n=21$) was significantly higher compared to healthy controls ($n=23$, $p=0,03$, Mann-Whitney test) and that $p22^{\text{phox}}$ ($n=24$ patients, 24 controls) and $p67^{\text{phox}}$ ($n=22$ patients, 22 controls) relative gene expression in mononuclear sickle cell anemia leukocytes was similar to healthy controls.

e) the phosphorylation of a group of 47kDa cell proteins. It was assayed by the incorporation of ^{32}P -Labeled by sickle cell (n=4, 4×10^7 cells/ml) or healthy controls (n=6, 4×10^7 cells/ml) mononuclear leukocytes, in basal state or after stimulation with PMA (30nM). We found a higher phosphorylation in 47kDa protein sickle cell mononuclear leukocytes than in healthy controls.

Conclusions

The results have shown that leukocytes from sickle cell anemia patients released nitric oxide in a similar manner to those from healthy controls; sickle cell anemia mononuclear leukocytes release more superoxide, when stimulated with PMA or ZYM, than mononuclear leukocytes from healthy controls; gp91^{phox} gene expression is upregulated in monocytes from sickle cell patients compared to healthy controls, and the phosphorylation of 47kDa proteins in sickle cell anemia mononuclear leukocytes is more intense than healthy controls.

The NADPH-system is activated in sickle cell anemia mononuclear leukocytes and may be responsible, at least in part, for the inactivation of nitric oxide. This may contribute to inflammation and vascular dysregulation in sickle cell disease.



1. INTRODUÇÃO

1.1. ANEMIA FALCIFORME

Anemia falciforme é uma anemia hemolítica crônica hereditária, que ocorre em homozigotos para o gene falciforme, onde há substituição da hemoglobina normal (HbA) pela hemoglobina falciforme (HbS). O defeito molecular da HbS caracteriza-se pela substituição da base adenina pela base timina, na posição seis da cadeia beta e conseqüente produção do aminoácido valina ao invés do ácido glutâmico. Esta hemoglobinopatia foi considerada como a primeira doença de base molecular, quando PAULING *et al* (1949) descreveram que a hemoglobina dos pacientes com anemia falciforme diferia da normal pela ausência de duas cargas negativas.

A hemoglobina S é a mais freqüente das variantes estruturais da hemoglobina A e a anemia falciforme é uma das anemias hemolíticas hereditárias mais freqüentes no Brasil, com incidência de 1:1000 nascimentos, sendo estimada ao redor de dois milhões de pessoas portadoras do gene, constituindo-se um problema de Saúde Pública (DE PAIVA E SILVA, RAMALHO, CASSAROLA, 1993). A freqüência estimada de heterozigotos é de 5-6% da população de negróides e de 2% da população em geral (ALVARES FILHO *et al.*, 1995), predominando o haplótipo Bantu (GONCALVES *et al.*, 1994) no estado de São Paulo. Foi introduzida no Brasil durante o período da escravidão africana, razão pela qual predomina na raça negra, principalmente no Nordeste e Sudeste.

Na década de 70, estudo revisando autópsias, estimou a média de 14 anos de sobrevivência, com 20% das mortes ocorrendo antes dos 2 anos de idade, um terço ocorrendo até os 5 anos, 50% entre 5 e 30 anos e apenas um sexto após os 30 anos (DIGGS, 1973).

Na década de 90, outro estudo (PLATT *et al.*, 1994) realizado em centros de tratamento de anemia falciforme nos EUA e incluindo 3.764 pacientes, constatou que 85% dos pacientes alcançaram a idade de 20 anos, indicando melhoria no tratamento possivelmente devido ao diagnóstico precoce, ao acompanhamento médico e à evolução dos novos tratamentos. Dentre os pacientes com menos de 20 anos, a mortalidade atingiu o pico entre 2 e 3 anos de idade, causada por infecção, predominantemente sepse por *Streptococcus pneumoniae*. No grupo total de pacientes, foi observada maior mortalidade

entre os homens, com média de vida de 42 anos para homens e de 48 anos para mulheres, com poucos pacientes alcançando 60 anos de vida. Essa expectativa de vida é 25 anos menor, quando comparada à média geral da população negra.

Somente uma pequena proporção de mortes nos pacientes falciformes é causada por doença não relacionada com a anemia falciforme (PLATT *et al.*, 1994), confirmando a grande mortalidade provocada pela doença. Um grande número de pacientes morre repentinamente devido a uma complicação aguda da patologia, principalmente crises de dores e síndrome torácica (POWARS, CHAN, SCHROEDER, 1990), evidenciando a instabilidade da doença e as lesões orgânicas insidiosas. Quanto maior o número de sintomas, maior a mortalidade. Foram estabelecidos como fatores de risco: baixo nível de hemoglobina fetal, baixa concentração da hemoglobina e aumento do número de células brancas no sangue.

O quadro clínico dos pacientes caracteriza-se pela anemia hemolítica crônica com episódios de agravamento que, em conjunto, são denominados de crises de falcização, sendo esses: crises de oclusão vascular, crises aplásticas, crises de dor, priapismo, acidentes cérebro-vasculares isquêmicos, hemolíticos e seqüestro esplênico de hemácias. Os pacientes com anemia falciforme apresentam também grande risco de alterações encefálicas, osteonecrose, retinopatia e falência renal (HEBBEL, 1997). As crises de oclusão vascular, por serem as mais freqüentes e pelas suas repercussões na mortalidade e morbidade que acarretam, são as mais importantes no estudo dessa patologia. Por esse motivo é considerada um modelo de doença da microvasculatura, na qual há grande interação entre o endotélio, plaquetas, hemácias e leucócitos.

1.2. FALCIZAÇÃO

O gene falciforme proporciona pelo menos três alterações moleculares na hemoglobina: formação de tetrâmeros, tendência para polimerizar em baixas tensões de oxigênio e instabilidade (HEBBEL, 1991). O desenvolvimento de células anormalmente desidratadas é diretamente responsável pelos defeitos celulares que levam à deformação, à

arquitetura anormal das membranas, à propensão para falcização e ao aumento da concentração intracelular, resultando na polimerização e, por fim, no fenômeno da oclusão vascular (EATON & HOFRICHTER, 1987).

Monômeros de HbS são estáveis em solução sob certas condições de concentração de HbS, pH, temperatura e carga iônica. Entretanto, pequenas alterações destas condições ideais podem rapidamente levar à formação dos géis. A polimerização das hemácias desoxigenadas é o evento inicial da patogênese molecular da anemia falciforme. Quando a hemoglobina falciforme é desoxigenada, ocorre uma mudança na sua conformação com as subunidades beta se distanciando uma da outra, resultando numa interação hidrofóbica com a molécula complementar da hemoglobina (NAGEL *et al.*, 1980), formando agregados de grandes polímeros, distorção da forma e marcante diminuição da plasticidade das células vermelhas, que se tornam rígidas, proporcionando o fenômeno da oclusão vascular, que é a marca desta doença.

Hemácias falciformes contêm quantidades aumentadas de cálcio e, quando as membranas celulares são distorcidas, há aumento da concentração do cálcio citoplasmático. Isto é suficiente para ativar os canais dependentes de potássio e cálcio,

resultando num mecanismo no qual há perda de potássio e água, um efeito também alcançado pelo aumento da atividade do sistema de co-transporte do cloreto de potássio (OLIVIERI *et al.*, 1992). A combinação destes mecanismos complexos produzem as hemácias desidratadas e rígidas (WEATHERALL & CLEGG, 1999).

A taxa e a extensão da formação dos polímeros de hemoglobina pelas hemácias falciformes circulantes são dependentes do grau de desoxigenação, da concentração intracelular de hemoglobina e da presença ou ausência de hemoglobina fetal, sendo um evento marcante por sua dinâmica. A cinética da formação dos polímeros é determinante para a morfologia das células (MOZZARELLI, HOFRICHTER, EATON, 1987; ASAKURA *et al.*, 1994). Quando a desoxigenação é rápida, múltiplos e independentes eventos de polimerização ocorrem, resultando em pequena alteração no formato das células vermelhas. Porém, quando a desoxigenação é lenta ou parcial, há a formação de agregados de moléculas, seguidos de aumento e alinhamento das fibras e formação da célula em foice

(HEBBEL, 1991), cuja estrutura tridimensional foi elucidada utilizando-se microscopia eletrônica de alta resolução, a qual demonstrou que o polímero é formado por 14 bandas e a unidade estrutural primária é uma dupla cadeia, na qual a molécula de hemoglobina encontra-se em ziguezague (DYKES, CREPEAU, EDELSTEIN, 1979).

Em razão de o tempo de trânsito na microcirculação ser rápido em relação ao tempo requerido para a formação dos tetrâmeros, a maioria das células não os formam durante o fluxo normal nas arteríolas e capilares. Porém, caso haja um desequilíbrio nos fatores que induzam à polimerização, pode haver um rápido aumento na formação de polímeros e virtualmente todas as hemácias que estão na microcirculação podem contê-los, com marcante alteração na plasticidade, o que leva à oclusão vascular (Fig 1).



Figura 1: Ilustração de hemácias de paciente com anemia falciforme. A substituição do ácido glutâmico pela valina da posição 6 da cadeia β da hemoglobina promove alterações físico-químicas nas paredes das hemácias, e estas ao sofrerem desoxigenação, formam fibras de polímeros e modificam a sua forma original,

dando origem à forma em foice (seta). Quando as hemácias voltam a ser oxigenadas, a forma em foice é revertida para a forma oval, porém, repetidos ciclos de oxigenação-desoxigenação vão promover danos permanentes nas membranas, o que faz com que a forma das hemácias se converta, irreversivelmente, para a forma em foice, com diminuição da vida média e propiciando condições para o desenvolvimento dos quadros de oclusão vascular.

A população de células dos pacientes com anemia falciforme é constituída de número aumentado de reticulócitos e de uma subpopulação de células anormalmente densa, que pode variar de 5 a 50% das hemácias de um paciente (SOLOVEY *et al.*, 1997). Essas células são desidratadas, com elevada concentração média de hemoglobina e conteúdo de cátions monovalentes alterados (aumento de sódio e pouco potássio). Considerando que o período de tempo requerido para a formação do polímero durante a passagem das hemácias falciformes pelos capilares é inversamente proporcional à concentração intracelular da hemoglobina (MOZZARELLI *et al.*, 1987), esta população de células constitui um elevado risco para desencadeamento das crises de falcização.

Outros insultos às células falciformes incluem a microvesiculação, quando polímeros penetram o citoesqueleto, e danos mediados pelo ferro na membrana das células vermelhas (WEATHERALL & CLEGG, 1999).

1.3. ANEMIA FALCIFORME E INFLAMAÇÃO

Estudam-se muito as alterações das hemácias, porém somente suas alterações estruturais não explicam totalmente a diversidade do quadro clínico encontrado nestes pacientes e não são suficientes para explicar os episódios de oclusão vascular. As crises iniciam-se quando o trânsito das hemácias falciformes torna-se lento nos capilares, mas outros fatores contribuem para a fisiopatologia, já que, normalmente, o tempo de trânsito nos vasos capilares é muito curto para provocar a desoxigenação das hemácias e iniciar a constrição vascular. Além disso, a oclusão nas grandes artérias, apresentada por pacientes com derrame cerebral, não pode ser explicada pela obstrução mecânica sozinha

(HEBBEL, 1991), sugerindo que a presença de componentes importantes da fisiopatologia da oclusão vascular na anemia falciforme seja iniciada após o fenômeno da falcização, comprometendo a função vascular.

As hemácias dos pacientes com anemia falciforme apresentam um grande número de anormalidades, geram mais reativos intermediários do oxigênio e aderem mais aos monócitos (SCHWARTZ *et al.*, 1983), macrófagos (HEBBEL & MILLER, 1984) e exibem uma grande adesão ao endotélio (HEBBEL *et al.*, 1980b). Estudos indicam que a chave da contribuição para as crises de oclusão vascular deve ser a tendência de as hemácias falciformes aderirem ao endotélio, como visto em diversos modelos *in vitro* (HEBBEL *et al.*, 1980b; MOHANDAS & EVANS, 1985; SUGIHARA *et al.*, 1992), *ex-vivo* (KAUL, FABRY, NAGEL, 1989) e *in vivo* (FABRY *et al.*, 1989; KAUL *et al.*, 1995), gerando hipóxia nos tecidos, o que é considerada a maior causa dos danos aos órgãos dos pacientes falciformes.

A viscosidade das membranas e a deformidade das hemácias falciformes são claramente alteradas, mesmo quando estão bem oxigenadas (CHIEN, USAMI, BERTLES, 1970; CLARK, MOHANDAS, SHOHET, 1980; NASH, JOHNSON, MEISELMAN, 1984). Estas alterações levam as hemácias densas e os reticulócitos dos pacientes com anemia falciforme a ficarem retidos no endotélio continuamente (LUTTY *et al.*, 1996). A tendência das hemácias dos falciformes em aderir ao endotélio aumenta quando diminui a tensão arterial de O₂, sendo mais intensa e mais rápida quando a desoxigenação é súbita do que quando acontece gradualmente (KAUL & XUE, 1991), principalmente à custa da alteração da viscosidade (SCHMALZER, MANNING, CHIEN, 1989; MACKIE & HOCHMUTH, 1990). Situações de desequilíbrio fazem com que o fluxo sanguíneo seja bloqueado e as células rígidas e falcizadas fiquem em contato maior com o endotélio, principalmente nas vênulas pós-capilares e capilares (KAUL *et al.*, 1989; KAUL *et al.*, 1995; FRENCH *et al.*, 1997). Esse quadro leva ao impedimento do fluxo sanguíneo, ao aumento do tempo de trânsito nos capilares, proporcionando hipóxia, que acarretará ainda maior aderência de células densas no endotélio, não só confinado aos capilares, mas propagando-se para diversos locais a montante (KAUL *et al.*, 1989). A aderência aumentada das hemácias dos pacientes falciformes estimula o endotélio a hiper-expressar

suas moléculas de adesão, que aceleram a cascata da adesão (NATARAJAN, UDDEN, McINTIRE *et al.*, 1996), propagam a oclusão vascular, com significantes efeitos na dinâmica do fluxo sanguíneo na microvasculatura e resultando em dano aos tecidos (MOORE *et al.*, 1996). Essa dinâmica intensifica-se ainda mais nos eventos das crises de falcização.

A hipóxia resultante afeta a fisiologia do endotélio de várias formas e regula a síntese de substâncias com ação vascular envolvidas na regulação do tônus vascular (RUBANYI & VANHOUTTE, 1985; RAKUGI *et al.*, 1990). A constrição, induzida pela instabilidade vascular em combinação com a hipóxia dos tecidos, resulta em trânsito prolongado das hemácias nos capilares com conseqüente oclusão, que vai gerar mais hipóxia e contribuir para a falcização, que produzirá mais hipóxia, mais constrição vascular local secundária ao desequilíbrio entre constrição e dilatação dos vasos, com estase e mais falcização. A hipóxia não somente facilita a falcização, mas também induz a aderência das células sanguíneas ao endotélio (GINIS, MENTZER, FALLER, 1993a; GINIS, MENTZER, FALLER, 1993b; GINIS *et al.*, 1995) que vão provocar mais falcização, constrição do vaso e hipóxia (PHELAN *et al.*, 1995), gerando um círculo vicioso.

1.4. MOLÉCULAS DE ADESÃO

Os mecanismos moleculares que regulam a aderência das hemácias ao endotélio são complexos e envolvem um grande número de receptores nestes locais, além de proteínas no plasma que participam como fatores mediadores entre aqueles, contribuindo para a adesão (MOORE *et al.*, 1996). Receptores nas hemácias e reticulócitos incluem: ICAM-1, CD11a/CD18 (ARKIN *et al.*, 1991), CD36 (SUGIHARA *et al.*, 1992; JONECKIS *et al.*, 1993) e $\alpha_4 \beta_1$ integrina (JONECKIS *et al.*, 1993). Receptores na membrana do endotélio que participam na adesão: VCAM-1, CD36 (SUGIHARA *et al.*, 1992), $\alpha_v \beta_3$ integrina (WICK *et al.*, 1987), trombospondina (SUGIHARA *et al.*, 1992; HILLERY *et al.*, 1996). Fatores plasmáticos que promovem adesão incluem fibrinogênio, fibronectina (HEBBEL, 2000), fator de von Willebrand (WICK *et al.*, 1993) e trombospondina. A matriz subendotelial fica exposta após lesão do endotélio e também participa das adesões com os componentes laminina, trombospondina, fator de von Willebrand e fibronectina (LEE *et al.*, 1998).

A aderência das hemácias falciformes é mínima quando o endotélio não está ativado, porém fatores como inflamação ativam as células endoteliais, que aumentam a adesividade das hemácias. A adesão anormal destas hemácias ao endotélio mantém um estado inflamatório baixo e constante, que proporciona isquemia dos tecidos, estimula o aumento dos níveis plasmáticos das moléculas de adesão solúveis, ativa mais ainda o endotélio, o qual libera quantidades variadas de citocinas, IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α , perpetuando a inflamação. O aumento dessas substâncias foi detectado no plasma de pacientes com anemia falciforme (FRANCIS & HAYWOOD, 1992; MALAVE *et al.*, 1993; CROIZAT, 1994; KASSCHAU *et al.*, 1996; KUVIBIDILA *et al.*, 1997)

Quanto mais intensa a adesão das hemácias, piores os sintomas (HEBBEL *et al.*, 1980a) Os episódios de oclusão vascular, mesmo que sem repercussão clínica, aumentam as condições para maior interação do endotélio com as hemácias, resultando em maior aderência (EMBURY *et al.*, 1999) e manutenção do estado inflamatório, demonstrado por leucocitose, níveis anormais de reagentes da fase aguda como trombina (KURANTSIN-MILLS *et al.*, 1992), fator ativador de plaquetas, proteína C reativa (BELCHER *et al.*, 2000), e também por: células endoteliais ativadas (SOLOVEY *et al.*, 1998; SOLOVEY *et al.*, 2001), ICAM-1 (SHIU, UDDEN, McINTIRE *et al.*, 2000), VCAM-1 (SHIU *et al.*, 2000) (STUART & SETTY, 1999), P-selectina (HEBBEL *et al.*, 1987), IL-1 e TNF- α (FRANCIS & HAYWOOD, 1992), sendo estes dois últimos responsáveis por regular a expressão das moléculas de adesão do endotélio (MOORE *et al.*, 1996), além de ativarem os leucócitos.

Os leucócitos desempenham uma função crucial na defesa do organismo por apresentarem atividades microbicida, tumoricida e inflamatória. Os fagócitos (neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos) possuem uma maquinaria molecular que, após ativação, gera reativos do oxigênio e do nitrogênio para essas finalidades. Quando a liberação destes radicais é intensa, apresentam ação deletéria para o organismo, participando na propagação da inflamação, mas quando controladas, agem como segundos mensageiros, participando na resolução da inflamação (SUZUKI, FORMAN, SEVANIAN, 1997; SAHNOUN, JAMOSSI, ZEGHAL., 1998).

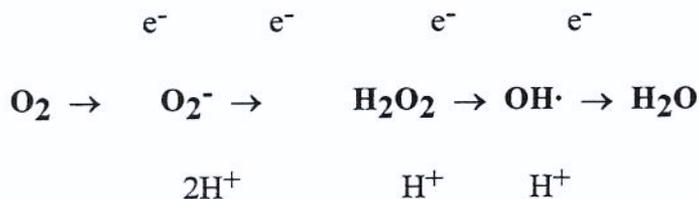
1.5. RADICAIS LIVRES, MICROCIRCULAÇÃO E ATIVIDADE MICROBICIDA

Diversos mediadores modulam o tônus e a permeabilidade vascular, bem como a aderência e a agregação das hemácias, leucócitos e plaquetas entre si e ao endotélio. O endotélio interage com tais mediadores e células, regulando seus efeitos. Porém, em algumas situações patológicas, poderá ocorrer o predomínio de um efeito sobre o outro, levando ao desequilíbrio e conseqüente alteração da função fisiológica.

Os radicais livres constituem um importante grupo de substâncias com ação vascular e microbicidas. São definidos como quaisquer elementos químicos com existência própria, que contêm um ou mais elétrons não pareados (solitários) em um ou mais orbitais atômicos (HALLIWELL, GUTTERIDGE, CROSS, 1992). Os radicais superóxido (O_2^-) e óxido nítrico ($NO\cdot$) são produzidos continuamente *in vivo*, com implicações fisiológicas e patológicas.

1.5.1. Reativos intermediários do oxigênio

O oxigênio molecular no seu estado basal é um birradical, possuindo dois elétrons não pareados em orbitais paralelos (TAUBE, 1965). A redução completa do O_2 pela via univalente resulta na formação de água e ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH\cdot$) (BADWEY & KARNOVSKY, 1980).



Além destes, o termo 'reativos intermediários do oxigênio', engloba outras espécies reativas, que não são radicais livres, como o oxigênio "singlet" e ácido hipocloroso ($HOCl$), BABIOR, LAMBETH, NAUSEEF., 2002), com reconhecidas ações microbicida, citotóxica e pró-inflamatórias (ROOS *et al.*, 1996). O superóxido é o primeiro reativo intermediário do oxigênio, podendo ser um produto do metabolismo oxidativo, das reações de oxidação e redução, ou da ativação do complexo NADPH-oxidase dos fagócitos.

O superóxido é produto inicial da redução de um elétron do O₂ (BABIOR, CURNUTTE, McMURRICH, 1976), sendo o NADPH o doador específico de elétrons (ROSSI & ZATTI, 1964) de acordo com a reação:



O complexo enzimático que catalisa a redução do O₂ para O₂⁻ é chamado de NADPH-oxidase (Fig 2). A fonte contínua de NADPH para os fagócitos é a via das hexoses monofosfato (ROSSI & ZATTI, 1964). O grande aumento no consumo de oxigênio por neutrófilos durante a fagocitose é distinto da respiração mitocondrial e conhecido como ‘explosão respiratória’ (“respiratory burst” em língua inglesa).

Nos anos 40 foram iniciados estudos referentes ao complexo enzimático NADPH-oxidase, que está presente em algumas células de origem mesodérmica, sendo o mais estudado o presente nos leucócitos, encontrados nos fagócitos profissionais e nos linfócitos B. Este complexo enzimático é formado por proteínas presentes no citoplasma e na membrana, denominadas por sua massa molecular (em kilodaltons) e sufixo phox (abreviatura de *phagocyte oxidase*), com a separação dos componentes em dois distintos compartimentos, garantindo a inatividade do complexo quando as células não estão ativadas (DeLEO *et al.*, 1999).

O doador terminal de elétrons é um flavocitocromo *b* de baixo potencial (SEGAL & JONES, 1978), ou citocromo *b*₅₅₈, denominado dessa maneira por apresentar absorção máxima da sua banda α no comprimento de onda de luz de 558nm. Tem características pouco usuais, com um potencial muito baixo de -245mV, o menor dentre todos os mamíferos, que o faz capaz de reagir diretamente com o oxigênio formando ânion superóxido (SEGAL & JONES, 1978). Nos fagócitos sem ativação, está localizado nas membranas plasmáticas, aproximadamente 20%, e o restante nos grânulos específicos. É um heterodímero contendo as subunidades α ou p22^{phox} e β ou gp91^{phox}, que é uma glicoproteína, com seus genes clonados e sequenciados (ROYER-POKORA *et al.*, 1986; PARKOS *et al.*, 1988) além de um FAD (flavina adenina dinucleotídeo) e dois grupos heme, que são funcionalmente distintos.

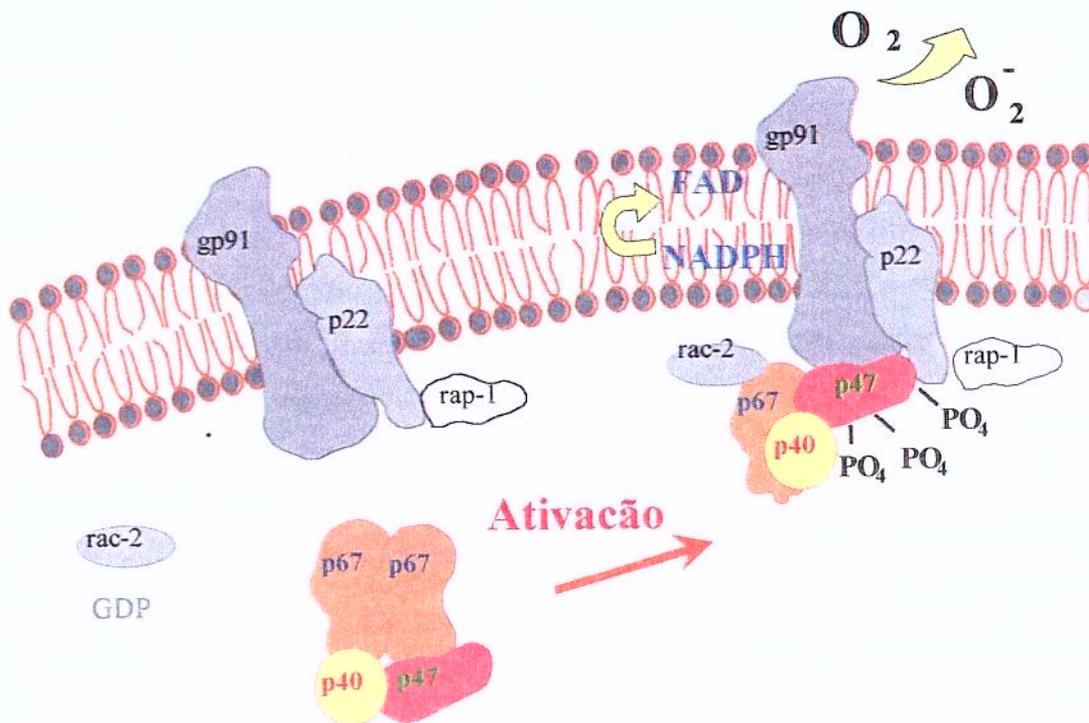


Figura 2: Diagrama representativo do sistema NADPH oxidase com seus componentes citoplasmáticos e membranosos. Quando a NADPH oxidase se ativa, os componentes p47^{-phox}, p67^{-phox} e p40^{-phox} se translocam e se associam aos componentes do citocromo b₅₅₈ (gp91^{-phox} e p22^{-phox}) na membrana celular. A oxidase passa então a reduzir o oxigênio (O₂) para superóxido (O₂⁻), à custa de oxidação do NADPH para NADP⁺.

A estabilidade de cada subunidade do citocromo b₅₅₈ depende da formação do heterodímero, portanto, alterações em algumas das subunidades leva à desativação do complexo (DeLEO *et al.*, 2000).

Em estudos que examinaram a especificidade da expressão de genes que codificam as duas cadeias do heterodímero citocromo b₅₅₈, verificou-se que o gene *CYBB*, o qual codifica o componente gp91^{-phox}, expressou-se, quase que exclusivamente, em fagócitos diferenciados, enquanto o gene *CYBA*, que codifica o componente p22^{-phox}, expressou-se de modo constitutivo numa variedade de linhagens celulares (ROYER-POKORA *et al.*, 1986; PARKOS *et al.*, 1988).

O gene que codifica a proteína gp91^{phox}, CYBB, foi mapeado no braço curto do cromossomo X, no segmento Xp21.1 (BAEHNER *et al.*, 1986). Ocupa aproximadamente 30kb do DNA genômico e contém 13 exons, os quais variam de 0,7 a 7 kb em tamanho (SKALNIK *et al.*, 1991).

O gene para a p22^{phox}, CYBA, mapeado no cromossomo 16q24, tem 8,5kb de tamanho, contendo 6 exons, codifica um aminoácido de 195 bases, que não é glicosilado, com peso molecular de 20,9kDa e, contrastando com a gp91^{phox}, seu RNAm é expresso em diversos tipos de células, porém a proteína é vista somente em células que também expressam o RNAm da gp91^{phox} (PARKOS *et al.*, 1988).

Recentemente foram identificados homólogos da gp91^{phox}: Nox1, Nox2, Nox3, Nox4 e Duox. Estão presentes em células não fagocíticas como: fibroblastos, células foliculares da tireóide, células dos túbulos proximais do córtex renal, no útero, próstata, epitélio do cólon e músculo liso vascular (DUPUY *et al.*, 1999; SUH *et al.*, 1999; GEISZT *et al.*, 2000; LAMBETH *et al.*, 2000), produzem reativos intermediários do oxigênio em pequenas quantidades, cuja produção é bloqueada por inibidores da NADPH-oxidase, com funções não ligadas à atividade antimicrobiana, estando mais relacionados com a sinalização entre células, crescimento celular, mitose e controle redox (EBERT & BUNN, 1998; ADLER *et al.*, 1999).

Nos dias de hoje estão identificadas três proteínas localizadas no citosol: p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}, formando um complexo de aproximadamente 250-kD. Após ativação, os componentes do citosol sofrem fosforilação e migram em conjunto para a membrana onde se associam ao citocromo *b*₅₅₈, formando a oxidase ativa e capaz de transferir elétrons do NADPH para o oxigênio molecular, formando o ânion superóxido.

O gene que codifica a proteína p47^{phox} está localizado no cromossoma 7q11.23, tem 18kb e 9 exons, seu RNAm codifica uma proteína de 390 aminoácidos e 44,6kDa (FRANCKE *et al.*, 1990). Ela funciona como uma plataforma que promoverá o acoplamento das demais proteínas citoplasmáticas no citocromo *b*₅₅₈, localizado na membrana. Sua fosforilação, promovida principalmente pela proteína quinase C (PKC), e mudança de conformação iniciam a ativação da oxidase, sendo que, a quantidade de proteínas fosforiladas indica o estado de ativação do sistema (NASMITH, MILLS, GRINSTEIN, 1989; GRINSTEIN & FURUYA, 1991).

O gene que codifica a proteína p67^{phox} está localizado no locus 1q25, é constituído de 16 exons, tem 40kb de tamanho, gera RNAm de 2,4kb e codifica uma proteína de 60,9kDa (FRANCKE *et al.*, 1990). Como a p47^{phox}, a p67^{phox} também sofre fosforilação e se desloca em bloco com a p40^{phox} e p47^{phox} para a membrana. Possui um domínio de ativação que regula o fluxo de elétrons no citocromo b₅₅₈, e em sistemas livres de células, ao ser adicionado em pequenas quantidades de p67^{phox}, ativou a oxidase, sugerindo que sua função seja catalisadora (CROSS, ERICKSON, CORNUTTE, 1999).

Um novo componente do citosol foi identificado e clonado (TSUNAWAKI *et al.*, 1994). Trata-se da proteína p40^{phox}, cujo gene foi mapeado no cromossomo 22q13.1, tem 18kb de tamanho, contém 10 exons, (ZHAN *et al.*, 1996), e se associa à p67^{phox} (WIENJES *et al.*, 1993; ZHAN *et al.*, 1996). No entanto, seu papel na atividade do sistema NADPH oxidase ainda não foi totalmente esclarecido. A p40^{phox} não é necessária para a ativação do sistema NADPH-oxidase, já que em sistemas livre de células a sua ausência não interferiu na atividade do complexo enzimático, porém ao ser adicionada no sistema houve inibição na produção do superóxido (SATHYAMOORTHY *et al.*, 1997), sugerindo uma atividade inibitória, mas ao ser interferida sua ligação com a p67^{phox} neste mesmo sistema, houve uma redução de 50% na produção do O₂⁻, podendo ter uma ação estimulante (TSUNAWAKI *et al.*, 1996). Foi demonstrado que p40^{phox} apresenta fosforilação quando estimulada e há perda do fosfato adicional quando a oxidase é desativada (FUCHS *et al.*, 1997), podendo estar associada ao término da atividade da oxidase (SATHYAMOORTHY *et al.*, 1997).

Duas proteínas G de baixo peso molecular se integram ao sistema NADPH oxidase fagocítico: a proteína rac2 transloca-se com os componentes do citosol, ligado ao p67^{phox} (DIEKMANN *et al.*, 1994); e a rap1, associa-se ao componente p22^{phox} na membrana (QUINN *et al.*, 1989). Essas proteínas contribuem para a estabilização do complexo enzimático e regulam sua atividade biológica (GABIG *et al.*, 1995; KNAUS *et al.*, 1995).

As subunidades do citocromo b₅₅₈ são importantes para o transporte do elétron e a redução do oxigênio molecular para anion superóxido. O citocromo b₅₅₈ pode gerar superóxido na ausência dos componentes do citosol (KOSHKIN & PICK, 1994), sugerindo

que o citocromo b_{558} seja suficiente para dirigir o transporte de elétrons. Há concordância de que a FAD (flavina adenina dinucleotídeo) seja o carreador de elétrons, pois a atividade é perdida quando ela é retirada do sistema ou quando seus antagonistas são utilizados (BABIOR & PETERS, 1981).

A relevância clínica do sistema NADPH-oxidase pode ser demonstrada pela doença granulomatosa crônica (DGC), com marcante suscetibilidade às infecções piogênicas bacterianas e fúngicas, que tem como defeito a incapacidade dos fagócitos de gerar superóxido devido a mutações em um dos genes que codificam as proteínas deste complexo, levando à perda ou desativação de um dos componentes do sistema. A DGC caracteriza-se por apresentar infecções nos locais considerados barreiras naturais do organismo, como no sistema respiratório, gastrointestinal e pele, com pneumonias, linfadenite, gastroenteropatias, granulomas e abscessos. A forma mais comum do defeito é a falha da expressão do gene $gp91^{phox}$ com 60% dos casos seguida da forma não ligada ao sexo, por falha na $p47^{phox}$ ao redor de 33%, seguida pela $p67^{phox}$ ao redor de 5% e do $p22^{phox}$ com menos de 5% dos casos. A heterogeneidade desta doença indica a complexidade do sistema e das interações entre suas subunidades para a formação do superóxido, nunca atuando como componentes isolados.

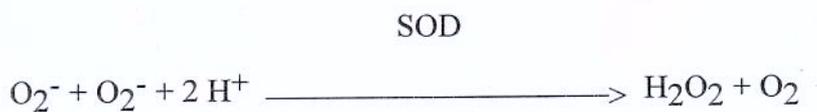
Um dos alvos dos reativos intermediários do oxigênio, gerados nos processos fisiopatológicos, é o sistema vascular, especialmente o endotélio, levando à sua lesão (KONTOS *et al.*, 1984). O exato mecanismo pelo qual os reativos intermediários do oxigênio induzem alterações na condutância vascular é incerto, podendo agir diretamente no músculo liso vascular ou modificando seu tônus, interferindo na produção ou atividade biológica dos mediadores vasoativos endógenos, bem como na nutrição tecidual.

1.5.2. Sistema antioxidante dos leucócitos

Células fagocitárias respondem a vários estímulos com a explosão respiratória e conseqüente produção dos radicais do oxigênio. Estas espécies reativas do oxigênio apresentam uma ação potente e tóxica, com alteração na função celular. Seu acúmulo pode resultar na morte celular (BAEHNER *et al.*, 1977).

Nos leucócitos, por serem células de defesa, há produção de radicais do oxigênio, sendo o radical superóxido produzido em quantidade suficiente para participar do processo bactericida. O mecanismo de defesa celular contra estes agentes tóxicos derivados do oxigênio é constituído por: superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GHS-PX) e catalase (KLEBANOFF & CLARK, 1978), que são denominados agentes do sistema antioxidante (Fig 3).

Após sua liberação no interior do fagolisossoma, o superóxido é dismutado para peróxido de hidrogênio pela enzima superóxido dismutase, através da reação :



Superóxidos dismutases são enzimas largamente encontradas em células que possuem metabolismo oxidativo, anaeróbios tolerantes, e alguns anaeróbios restritos. Elas são essenciais para a proteção destas células contra a ação deletéria dos reativos intermediários do oxigênio altamente tóxicos e gerados durante a redução do oxigênio. (McCORD & FRIDOVICH, 1969)

Nos humanos há três tipos de SOD, mitocondrial ou Mn-SOD, a citosólica ou CuZn-SOD, e a extracelular ou EC-SOD. Mn-SOD é um homotetrâmero de 96kDa, contendo um átomo de manganês por subunidade, localizada na mitocôndria. A CuZn-SOD ou citosólica, tem importância fundamental na defesa do organismo contra o dano oxidativo, é composta de duas subunidades de 32kDa cada, tem o sítio ativo composto de cobre e zinco e um resíduo de histidina ligando uma à outra.

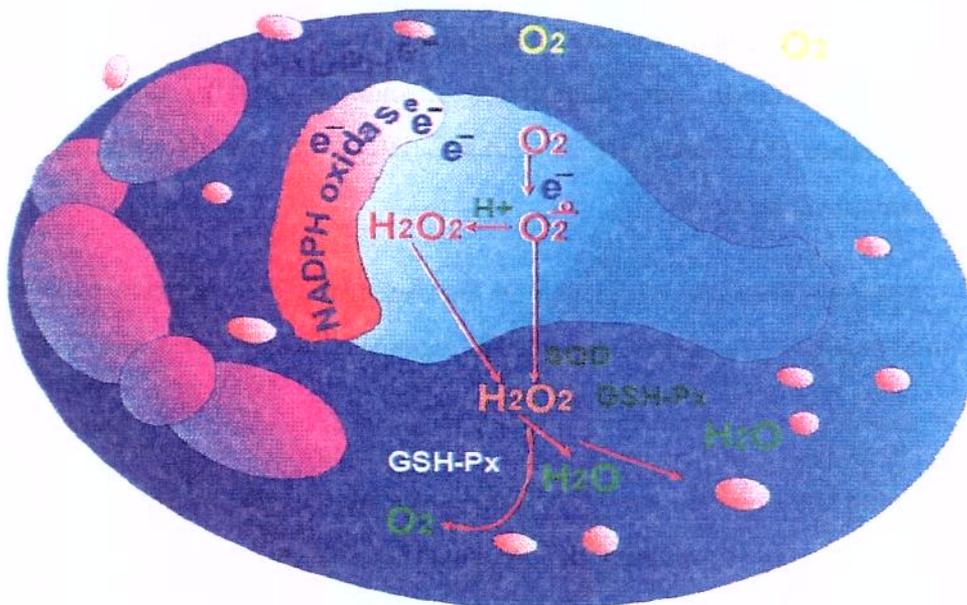
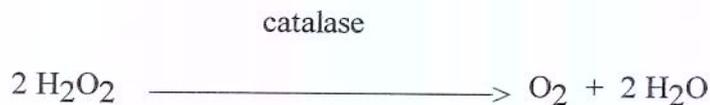


Figura 3: Esquema representativo do sistema antioxidante dos leucócitos. Após a liberação pelo sistema NADPH-oxidase, o superóxido é dismutado pela superóxido dismutase (SOD) para oxigênio (O_2) e o menos reativo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que por sua vez serve de substrato para a glutatona peroxidase formar H_2O .

O peróxido de hidrogênio pode ser removido das seguintes maneiras: Pela catalase (De DUVE, 1978):



Em concentrações fisiológicas, a glutathiona peroxidase celular parece ser mais importante do que a catalase, que tem menor afinidade pelo peróxido de hidrogênio. (TAPPEL, 1984), além disto, a glutathiona peroxidase celular tem capacidade de reduzir uma maior gama de hidroperóxidos.

A ausência ou disfunção do sistema antioxidante, em qualquer destas enzimas, pode tornar a célula vulnerável ao dano oxidativo (RISTER & BAEHNER, 1976); pois a concentração dos reativos intermediários do oxigênio é normalmente balanceada pelas atividades da SOD, da glutathiona peroxidase e da catalase, que convertem radicais livres danosos em moléculas inócuas.

1.5.3. Reativos intermediários do nitrogênio

O termo 'espécies reativas do nitrogênio' engloba o monóxido de nitrogênio (NO), sua forma reduzida (radical óxido nítrico, NO·) e sua forma oxidada (íons nitrosônio NO⁺). São moléculas relativamente estáveis, encontradas naturalmente na atmosfera e água do mar, sendo descritas nos seres vivos (ORTEGA MATEO & ARTINANO, 2000).

FURCHGOTT & ZAWADZKI (1980) demonstraram que o relaxamento do músculo liso vascular induzido pela acetilcolina, era dependente do endotélio, mediado por um fator lábil humoral, posteriormente denominado 'Fator de Relaxamento do Endotélio', em língua inglesa: "Endothelium Derived Relaxing Factor" (EDRF). Este fator endotelial difunde-se nas células musculares lisas adjacentes e provoca o relaxamento do tecido através da ativação da guanilato ciclase solúvel e a conseqüente elevação dos níveis de GMPc. Posteriormente, verificou-se que este fenômeno ocorria em outros tecidos vasculares, como artérias, veias, arteríolas, vênulas e corpo cavernoso, em resposta a vários estímulos como trombina, substância P, nucleotídeos de adenina, ionóforo de cálcio A23187, bradicinina, hipóxia e corrente elétrica (GOVERS & RABELINK, 2001).

Baseando-se nas semelhanças farmacológicas entre o EDRF e o NO gerado a partir de NO_2^- acidificado, IGNARRO *et al.*, (1987) e FURCHGOTT (1988), sugeriram, independentemente, que o EDRF poderia ser NO.

O óxido nítrico é um radical livre produzido pela oxidação de um dos nitrogênios do grupo guanidino terminal da L-arginina. Esta síntese é catalisada por uma família de enzimas conhecidas genericamente como óxido nítrico sintases (NOS) e inibida por análogos de arginina como L-NMMA (PALMER *et al.*, 1988); (HIBBS, VAURIN, TAINTOR, 1987), L-NAME (MOORE *et al.*, 1990) e nitro-ornitina (L-NIO) (McCALL *et al.*, 1991), além de outros inibidores, menos utilizados e potentes. As NO-sintases são consideradas dioxigenases, na medida em que incorporam oxigênio molecular ao nitrogênio guanidino terminal da L-arginina, utilizando BH_4 e FAD como co-fatores e NADPH (forma reduzida) como co-substrato, resultando na síntese de NO e L-citrulina. Esta oxidação ocorre em duas etapas: na primeira há a formação do produto intermediário Ng-hidroxi L-arginina por transferência de dois elétrons, o qual se mantém firmemente aderido à enzima e, na segunda etapa, há a oxidação de Ng-hidroxi L-arginina a NO e L-citrulina por transferência de mais três elétrons. Três tipos distintos de NO-sintases foram descritas, com 57% de homologia entre elas.

NOS I ou nNOS (primeiramente descrita em neurônios) é uma enzima constitutivamente expressa, apesar de sua expressão poder ser modulada, dependente de cálcio e calmodulina (BREDT & SNYDER, 1990), com função na transdução de sinais, codificada pelo gene localizado no cromossoma 12 q24.2, com 29 exons e codifica uma proteína com 160kDa e 1.554 aminoácidos (HALL *et al.*, 1994).

A NOS II ou iNOS (primeiramente descrita no macrófago), induzível, cálcio independente (MARLETTA *et al.*, 1988), produz quantidades maiores de NO. Seu gene tem 26 exons, codifica uma proteína de 1.153 aminoácidos, 131kDa, localizado no gene 17q11.2 (CHARTRAIN *et al.*, 1994; MARSDEN *et al.*, 1994), está presente nos macrófagos (MARLETTA *et al.*, 1988), hepatócitos (GELLER *et al.*, 1993), células endoteliais (RADOMSKI, PALMER, MONCADA, 1990), músculo liso (BUSSE & MULSCH, 1990) e condrócitos humanos (PALMER *et al.*, 1993), mediante ativação por citocinas e LPS (FORSTERMANN *et al.*, 1995).

A NOS III ou eNOS (descrita primeiramente no endotélio) é constitutiva, mas, como a nNOS, pode ter sua expressão modulada. É uma proteína de 144kDa e 1.203 aminoácidos (MIYAHARA *et al.*, 1994). O gene que a codifica tem 26 exons e localiza-se no cromossoma 7q35-36 (ROBINSON *et al.*, 1994).

No sistema nervoso central e periférico, o NO age como um neurotransmissor (SNYDER & BREDT, 1991), enquanto no sistema cardiovascular, é um potente vasorelaxante e inibidor da agregação plaquetária, além de inibir a adesão e migração dos leucócitos, sendo considerado, desta maneira, um nitrovasodilatador endógeno e um antitrombótico (PALMER, FERRIGE, MONCADA, 1987), agindo em ambos os casos como um transdutor.

O NO é constitutivamente gerado pelas células endoteliais e atua nos tecidos adjacentes, provocando relaxamento vascular. É sintetizado pelas células endoteliais e musculatura lisa vascular, difunde-se através das membranas, levando ao relaxamento da musculatura lisa e diminuindo o tônus vascular (MONCADA, PALMER, HIGGS, 1991). Interrupções neste caminho proporcionam alterações na regulação da pressão arterial, na modulação dinâmica do tônus vascular, no fluxo sanguíneo e na aderência dos leucócitos (MONCADA *et al.*, 1991; KUBES, SUZUKI, GRANGER, 1991; OHASHI *et al.*, 1998), levando à disfunção endotelial. Hipertensão arterial (PANZA *et al.*, 1993b), diabetes (COSENTINO *et al.*, 1997) e isquemia (HARRISON, 1997) são condições associadas às alterações da produção do óxido nítrico.

O NO apresenta grande reatividade com espécies químicas diversas, sendo suas ações farmacológicas inibidas por: oxihemoglobina e azul de metileno, ditiotreitól e hidroquinona (GRIFFITH *et al.*, 1984), e também pelo ânion superóxido, pois seus efeitos vasodilatadores eram prolongados na presença de SOD (GRYGLEWSKI, PALMER, MONCADA, 1986; RUBANYI & VANHOUTTE, 1986) e citocromo c (MONCADA, PALMER, GRYGLEWSKI, 1986), e inibidos na presença de Fe²⁺ (GRYGLEWSKI *et al.*, 1986) e hiperóxia (RUBANYI & VANHOUTTE, 1986).



2. OBJETIVOS

Os pacientes com anemia falciforme homozigotos, a despeito de apresentarem a mesma alteração genética molecular, não evoluem igualmente, apresentando grande variedade no quadro clínico, havendo pacientes praticamente assintomáticos e pacientes com severo grau de comprometimento orgânico difuso, sugerindo haver uma complexa interação de sistemas e não somente uma alteração estrutural das hemácias. As alterações funcionais dos componentes do sangue estão em estudo, para uma compreensão mais ampla do fenômeno vaso oclusivo. As causas da maior ou menor suscetibilidade às crises de vaso oclusão são várias, e possivelmente isto implica na coexistência de um conjunto delas. O mecanismo exato que determina a interrupção do fluxo sanguíneo tecidual normal pelas hemácias falciformes é complexo e não totalmente entendido.

O endotélio tem uma participação importante tanto na crise de vaso oclusão como no dano aos órgãos causados pela isquemia. O óxido nítrico desempenha um importante papel na regulação do tônus vascular. Devido à natureza antagônica entre os reativos intermediários do oxigênio e o óxido nítrico, como fatores reguladores da microcirculação, e como pouco se sabe sobre a participação e implicações dos leucócitos, cujo aumento do número absoluto é um sinal de mau prognóstico, na fisiopatologia da oclusão vascular na anemia falciforme os objetivos deste trabalho são:

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a liberação de radicais livres pelos leucócitos de pacientes com anemia falciforme homozigotos, estáveis e fora das crises.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar, nos leucócitos de pacientes com anemia falciforme, homozigotos, estáveis e fora das crises:

- 1- a liberação de óxido nítrico por granulócitos e leucócitos mononucleares;

- 2- a liberação de superóxido por granulócitos e leucócitos mononucleares;
- 3- o sistema antioxidante, particularmente, a atividade da superóxido dismutase e glutathione peroxidase celular;
- 4- a expressão dos genes que codificam os componentes gp91^{phox}, p22^{phox}, p67^{phox} do sistema NADPH-oxidase dos leucócitos mononucleares;
- 5- o estado de fosforilação das proteínas celulares de 47kDa dos leucócitos mononucleares.



3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. SELEÇÃO DE PACIENTES, CONTROLES E OBTENÇÃO DE CÉLULAS

3.1.1. Pacientes

Na elaboração deste trabalho foram estudados pacientes com anemia falciforme homozigotos com idade entre 15 e 34 anos, peso entre 40 e 64 kg, 29 do sexo feminino e 25 do sexo masculino, todos negros, regularmente matriculados no Hospital de Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (unicamp), setor de Hematologia.

Critérios para inclusão no estudo: ser homozigoto para anemia falciforme, estar estável e fora das crises. O diagnóstico de anemia falciforme foi estabelecido levando-se em conta a história familiar, evolução clínica e a eletroforese de hemoglobina no acetato de celulose pH 8,9 e no gel agarose pH 6,2, o teste de solubilidade, a dosagem da hemoglobina F e hemoglobina A2, conforme rotina seguida pelo Ambulatório de Hematologia.

Foram excluídos deste trabalho os pacientes com anemia falciforme que tenham sofrido crises de dor, infecção, transfusão de sangue ou derivados, ou tenham usado medicamentos, com exceção de ácido fólico e penicilina benzatina, nos últimos 90 dias antes da coleta do sangue.

Ao ingressarem no estudo, os pacientes ou responsáveis foram esclarecidos verbalmente quanto à natureza e objetivos da pesquisa, autorizando por escrito a realização dos ensaios laboratoriais, ao firmarem um 'Termo de Consentimento Livre e Esclarecido', onde constavam as informações sobre a pesquisa e a ausência de benefício terapêutico imediato, ficando os pacientes livres para abandonar o referido estudo, no momento que o desejassem, sem prejuízo do atendimento médico a eles prestado. Os pacientes foram submetidos à anamnese e exame clínico no dia da coleta e estavam em condições clínicas satisfatórias. O presente protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, de acordo com a Convenção de Helsinki e as resoluções 96/1996 e 251/97 do Conselho Nacional de Saúde.

3.1.2. Controles sadios

Foram selecionados voluntários adultos sadios, com idade entre 19 e 52 anos, peso entre 53 e 84 kg, 26 do sexo feminino e 40 do sexo masculino, 45 caucasóides e 21 negros, devidamente cadastrados como doadores de sangue junto ao Banco de Sangue do Hemocentro do Hospital de Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp. No dia da coleta foi feita anamnese, tendo sido excluído infecção, uso de medicações ou transfusão de sangue ou derivados nos últimos 30 dias, além de serem submetidos ao exame de dosagem de hemoglobina para descartar a presença de anemia. A amostra de sangue utilizada foi parte daquela coletada durante o processo de doação. Os voluntários autorizaram previamente a utilização de amostras de seu sangue para propósitos científicos.

3.1.3. Coleta de sangue

O sangue dos pacientes e dos controles sadios foi coletado entre 8 e 10 horas da manhã, por meio de punção de veia periférica, sendo imediatamente armazenado em tubo de polipropileno estéril contendo, conforme as necessidades do experimento a ser desenvolvido, citrato de sódio a 3,8% (9:1 v/v) ou heparina (25 U/ml).

3.1.4. Obtenção de granulócitos e leucócitos mononucleares de sangue periférico

A preparação da suspensão de granulócitos e leucócitos mononucleares como populações celulares puras a partir do sangue periférico, foi conseguida utilizando-se gradientes de densidade descontínuos (Sigma Histopaque 1.077 g/ml e 1.119 g/ml, St. Louis, E.U.A.) de acordo com as instruções do fabricante (ENGLISH & ANDERSEN, 1974).

Sumariamente, as amostras de sangue contendo citrato de sódio dos voluntários e pacientes foram transferidas para outro tubo de polipropileno contendo os gradientes de densidade descontínuos. A ordem dos reagentes dentro do tubo foi: Histopaque 1,119 g/ml (camada inferior), Histopaque 1,077 g/ml (camada intermediária), sangue

(camada superior); respectivamente nas proporções de 25%, 25% e 50% (v/v/v). Esta mistura foi centrifugada a 700 x g durante 30 minutos em temperatura ambiente, resultando em três camadas compostas predominantemente de: leucócitos mononucleares (superior), granulócitos (intermediária) e hemácias (inferior). As camadas contendo leucócitos mononucleares e granulócitos foram cuidadosa e individualmente transferidas para tubos distintos, suspensas em meio HBSS (pH 7,4, sem cálcio e magnésio), suplementado com HEPES (10 mM, HHBSS) e lavadas três vezes consecutivas neste meio. Eritrócitos contaminantes foram lisados hipotonicamente, quando necessário. A contagem dos leucócitos foi determinada automaticamente, sendo sua concentração ajustada conforme a necessidade dos experimentos, em HHBSS (pH 7,4, contendo cloreto de cálcio 1 mM). Foi adicionado Indometacina 10 μ M às suspensões de leucócitos destinadas aos ensaios de agregação plaquetária, liberação de superóxido e óxido nítrico. A pureza das populações de granulócitos e de leucócitos mononucleares foi em média de 95%, com viabilidade celular superior a 90%, avaliada pelo azul de tripan.

Os leucócitos foram utilizados no mesmo dia de sua obtenção para os experimentos de liberação de superóxido, óxido nítrico, atividade da superóxido dismutase (SOD), atividade da glutathione peroxidase e fosforilação de proteínas citoplasmáticas. Nos experimentos de expressão gênica, o RNA foi extraído no mesmo dia e congelado para uso posterior.

3.1.5. Obtenção de plaquetas

A suspensão de plaquetas humanas lavadas foi preparada segundo método proposto por RADOMSKI & MONCADA, 1983.

Após a coleta, as amostras de sangue dos controles sadios foram centrifugadas a 200 x g, durante 12 minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante, plasma rico em plaquetas (PRP), foi transferido para outro tubo plástico e centrifugado a 900 x g, durante 8 minutos, em temperatura ambiente, na presença de Iloprost (300 ng/ml). O sobrenadante, plasma pobre em plaquetas (PPP), foi descartado. O sedimento contendo as plaquetas, foi

ressuspendido em tampão de Krebs oxigenado (95% O₂/ 5% CO₂) sem cálcio, ao qual foi adicionado Iloprost (300 ng/ml). Esta mistura foi centrifugada a 900 x g, durante 8 minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi aspirado e desprezado e o sedimento novamente ressuspendido no tampão de Krebs oxigenado sem cálcio. A contagem de plaquetas foi determinada, sendo sua concentração ajustada para 1 x 10⁸ céls./ml. Indometacina (10 µM) e cloreto de cálcio (1 mM) foram adicionados à suspensão final de plaquetas, 20 minutos antes de sua utilização nos ensaios.

3.2. DETECÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO LIBERADO POR GRANULÓCITOS E LEUCÓCITOS MONONUCLEARES

A detecção do óxido nítrico, liberado pelos granulócitos e leucócitos mononucleares dos pacientes com anemia falciforme e dos controles sadios, foi avaliada como sua capacidade de inibir a agregação de plaquetas humanas lavadas, induzida pela trombina (SALVEMINI *et al.*, 1989).

Resumidamente, as suspensões de granulócitos ou de leucócitos mononucleares, numa concentração final de 5 x 10⁷ células/ml em HHBSS (pH 7,4, CaCl₂ 1mM), preparadas como descrito acima, sofreram cinco tipos de pré-incubação (60 minutos em temperatura ambiente) antes do procedimento: somente com HHBSS (controle), com N^G-Monometil-L-Arginina metil ester (L-arginina, 1mM), com o inibidor da síntese de óxido nítrico L-NAME (300 µM), com seu enantiômero D NAME (300 µM), ou com ambos L-NAME (300 µM) + L-Arginina (1 mM). Finalmente, receberam indometacina (10 µM), 20 minutos antes do procedimento. A suspensão de plaquetas humanas lavadas foi preparada como descrito acima.

‘Cuvetas’ cilíndricas de vidro siliconizado, contendo 500 µl da suspensão de plaquetas lavadas (10⁸ células/ml) dos voluntários normais, foram incubadas a 37°C durante 1 minuto num agregômetro de dois canais marca Payton (New York, E.U.A.), sob agitação contínua a 900 r.p.m., e então estimuladas com doses submáximas de trombina (50-200 mU/ml). A diminuição da densidade óptica foi registrada durante 5 minutos após estímulo com trombina.

Suspensões de granulócitos ou de leucócitos mononucleares (5×10^7 células/ml) dos pacientes com anemia falciforme ou dos controles sadios foram adicionadas num volume de 10 a 50 μ l às suspensões de plaquetas lavadas (a concentração final de leucócitos variou de 1 a 5×10^6 células/ml), sendo sua incubação prolongada por mais 1 minuto, antes da estimulação com trombina. Nos experimentos indicados, SOD (60 U/ml) foi adicionada imediatamente antes da suspensão de leucócitos. A diminuição da densidade óptica foi registrada durante 5 minutos após estímulo com trombina.

A diminuição da densidade óptica da suspensão de plaquetas lavadas estimulada com trombina, na presença de leucócitos, foi expressa como uma percentagem da diminuição da densidade óptica da suspensão de plaquetas lavadas estimulada com trombina, na ausência de leucócitos. Normalmente, densidade óptica = 100% é fixada com a suspensão de plaquetas lavadas e densidade óptica = 0%, com tampão Krebs. Tendo em vista que a adição de leucócitos à suspensão de plaquetas lavadas gera uma nova linha de base por aumentar a densidade óptica do sistema, considerou-se esta como uma nova densidade óptica = 100%. Uma suspensão com o mesmo número de leucócitos em 500 μ l de tampão Krebs, foi usada para fixar a nova densidade óptica = 0% (trombina não agrega leucócitos, SALVEMINI *et al.*, 1989).

Os experimentos foram realizados com a intenção de determinar o número de leucócitos capazes de causar 50-60% de inibição da agregação plaquetária na ausência da SOD e de 80-90% de inibição da agregação plaquetária na presença da SOD.

3.3. DOSAGEM DO SUPERÓXIDO LIBERADO POR GRANULÓCITOS E LEUCÓCITOS MONONUCLEARES

A quantificação do ânion superóxido, liberado pelos granulócitos e leucócitos mononucleares dos pacientes e dos voluntários, foi feita de acordo com a técnica de COHEN & CHOVANIC (1978), constituindo uma adaptação do método originalmente descrito por (McCORD & FRIDOVICH, 1969).

Resumidamente, as suspensões de granulócitos e de leucócitos mononucleares numa concentração final de $1,4 \times 10^6$ células/ml em HHBSS (pH 7,4, CaCl_2 1mM), obtidas como descrito acima, foram incubadas com forbol-miristato-acetato (PMA, 30 nM) ou zimosan (ZYM, 100 partículas/ célula), na presença de citocromo c (80 μM), durante 60 minutos a 37°C . A liberação espontânea de ânion superóxido foi avaliada incubando-se os leucócitos com HHBSS, ao invés de PMA ou ZYM. Metade dos tubos continha superóxido dismutase (SOD 90 U/ml) no início do experimento, como controle da redução inespecífica do citocromo c. A reação foi interrompida, colocando-se todos os tubos em banho de gelo e adicionando-se SOD (90 U/ml) aos que não a continham. Após centrifugar os tubos a 2200 x g durante 15 minutos a 4°C , foi medida a absorbância de seus sobrenadantes a 550 nm. A produção de ânion superóxido foi calculada, usando-se um coeficiente de extinção de $21.100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e os resultados expressos em nmol de superóxido liberado/ $1,4 \times 10^6$ células/h, levando-se em consideração a diferença de absorbância entre os tubos que continham SOD desde o início dos experimentos daqueles tubos, nos quais a SOD foi adicionada no final. Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

3.4. ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE CELULAR DOS GRANULÓCITOS E LEUCÓCITOS MONONUCLEARES

A atividade da glutathiona peroxidase celular foi determinada pela adaptação descrita por BAKER e COHEN (1983), do método originalmente descrito por BEUTLER (1975), que consiste na dosagem da oxidação do NADPH na presença do t-butil hidroperóxido, acompanhada espectrofotometricamente. A suspensão de granulócitos ou leucócitos mononucleares numa concentração de 2×10^7 células/ml em HHBS, dos pacientes e dos controles sadios, obtidas como descrita acima, foram incubadas, em dois sistemas distintos (A e B), durante 5 a 10 minutos, ambos contendo: Triton X-100 (0,05%), 0,2 mmol de GSH, 1 U/ml de GSH redutase, Tris-HCl 0,1 M, EDTA 0,5 mM (pH=8), NADPH 0,2 mM, em HHBSS. Após o término da incubação foi feita leitura da absorbância das amostras no espectrofotômetro DU 70; Beckman, Fullerton, CA, no comprimento de onda de 340nm. Num dos sistemas (A) foi adicionado t-butil hidroxiperóxido 0,35 mM e

após 1 minuto foi feita novamente a leitura da absorbância em ambos os sistemas (A e B). O cálculo da atividade da glutathione peroxidase foi feito, levando-se em conta a diferença da leitura da absorbância após 60 segundos do sistema A, subtraída da diferença da leitura de absorbância do sistema B e multiplicado pelo coeficiente $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os resultados foram expressos como nmol NADPH oxidado/minuto/ 10^7 células.

3.5. ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE DOS GRANULÓCITOS E LEUCÓCITOS MONONUCLEARES

A avaliação da atividade da superóxido dismutase foi feita utilizando-se uma adaptação do método descrito por (McCORD & FRIDOVICH, 1969) pelo qual se verifica espectrofotometricamente a inibição competitiva da redução do citocromo c desencadeada pela xantina oxidase.

Resumidamente, as suspensões de granulócitos ou de leucócitos mononucleares, numa concentração final de 3×10^7 células/ml em HHBSS (pH 7,4, CaCl_2 1mM), preparadas como descrito acima, obtidas de pacientes com anemia falciforme e de voluntários sadios, foram sonicadas e centrifugadas por 10 minutos a $200 \times g$. O sobrenadante foi retirado para uso posterior. Em dois sistemas distintos foram colocados os reagentes, contendo cada um: citocromo c 0,01mM, 0,001M xantina, xantina oxidase (15U/ml) 1:10000 e tampão carbonato de sódio 0,02M, EDTA 0,1M, pH10. Num dos sistemas foi adicionado SOD (60U) e verificada a variação da leitura da absorbância em um minuto no espectrofotômetro DU 70; Beckman, Fullerton, CA, no comprimento de onda de 418nm, e ajustada a concentração da xantina oxidase para obter-se a variação da absorbância em 1 minuto ao redor de 0,025. Nestas condições a quantidade de SOD necessária para inibir a redução do citocromo c em 50% (variação da absorbância de 0,0125) é definida como uma unidade de atividade. No segundo sistema, foram adicionadas quantidades crescentes do sobrenadante do lisado celular dos granulócitos ou leucócitos mononucleares (5 μ l, 10 μ l, 15 μ l, 20 μ l, 25 μ l, 35 μ l, 50 μ l, 75 μ l e 100 μ l), e a variação da leitura em um minuto considerada, para verificação da porcentagem de inibição da redução do citocromo c.

3.6. EXPRESSÃO DOS GENES DOS COMPONENTES GP91^{-PHOX}, P22^{-PHOX} E P67^{-PHOX} DO SISTEMA NADPH-OXIDASE DOS LEUCÓCITOS MONONUCLEARES

3.6.1. Obtenção de RNA

O RNA total dos leucócitos mononucleares dos pacientes e dos controles foi preparado utilizando-se o kit Quick Prep total RNA extraction kit (Pharmacia, Uppsala, Suécia). Esta técnica baseia-se num procedimento que combina as propriedades de lise celular e proteção ao RNA da guanidina, com as de precipitação oferecidas pelo cloreto de lítio e do trifluoroacetato de céσιο (CHIRGWIN *et al.*, 1979). Os procedimentos foram feitos no gelo e sempre utilizando-se luvas para manipulação dos materiais.

A suspensão de leucócitos mononucleares (5×10^7 células/ml) em HHBSS obtidas como descrito acima, dos pacientes com anemia falciforme ou dos controles sadios, foi disposta em tubos eppendorf livres de RNase juntamente com solução de guanidina. Após homogeneização, que provocou o rompimento das células, e adição de 14,3 M β -mercaptoetanol, a solução foi novamente homogeneizada na presença de cloreto de lítio e em seguida centrifugada por 30 minutos em 12000 X g, na presença de trifluoroacetato de céσιο. Após a centrifugação, as proteínas e o DNA ficaram retidos na fase aquosa, que foi retirada com aspiração cuidadosa. Adicionado etanol 70% ao RNA, que ficou depositado no fundo do tubo, sendo a solução novamente centrifugada por 30 minutos em 12000 X g, retirado o etanol por aspiração, o que permitiu a obtenção do RNA. As amostras de RNA obtidas foram submetidas ao tratamento com DNase e Proteinase K para retirada de possível DNA e proteínas contaminantes remanescentes do procedimento anterior.

A quantidade e qualidade do RNA total foi aferida espectrofotometricamente no comprimento de onda de 260 nm, utilizando-se o espectrofotômetro DU 70; (Beckman, Fullerton, CA) e o coeficiente de extinção de $12\text{mg} \times \mu\text{l}^{-1} \times \text{OD}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ para o cálculo da concentração do RNA. As amostras foram congeladas a -80°C para posterior utilização.

3.6.2. Transcrição reversa

As amostras de RNA foram submetidas à transcrição reversa para obtenção do cDNA. Resumidamente, 1µg da amostra de RNA total foi adicionado numa solução contendo os seguintes reagentes nas concentrações finais: hexâmeros randômicos (5µM), tampão RT (Tris-HCl 10mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl 1mM); dATP, dCTP, dTTP, dGTP (500µM de cada), enzima M-MuLV-RT (5 U/µl) e inibidor de RNase (0,5U/µl), incubados por 60 minutos na temperatura de 42°C. Após o término, as amostras foram aquecidas por 10 minutos a 92°C para inativar a enzima transcriptase reversa. Os cDNAs resultantes foram congelados a -20°C para posterior uso na reação de PCR.

3.6.3. Reação em cadeia da polimerase

Foi utilizado o kit comercial QuantumRNA 18S internal Standards (Ambion, Inc., TX), para a quantificação relativa da expressão dos genes que codificam as proteínas gp91^{-phox}, p22^{-phox} e p67^{-phox}. Esta técnica utiliza dois pares de oligonucleotídeos iniciadores em cada reação, um para amplificar o cDNA de interesse e outro para amplificar o controle interno (RNAr 18S), utilizado para normalizar os produtos, compensando as possíveis variações dos erros de pipetagem, da qualidade do RNA e das reações entre os diversos tubos, bem como determinar os níveis relativos da expressão dos genes dos pacientes com anemia falciforme e dos controles saudáveis. Porém, como o controle interno utilizado é abundante e, para haver comparações entre as expressões dos genes, a sua amplificação deve ser desenvolvida dentro da mesma fase linear de amplificação da amostra alvo (vide Fig 4). Esse kit utiliza-se de um limitador da expressão do gene do controle interno, que consiste de um nucleotídeo modificado, o qual bloqueia parcialmente a extensão do mesmo pela DNA polimerase, quando adicionado na reação do controle interno na devida proporção (vide Fig 5), permitindo a comparação da amplificação na mesma faixa de variabilidade linear (PALLANSCH *et al.*, 1990) (LEE *et al.*, 1996).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi feita utilizando-se o termociclador Perkin-Elmer modelo 2400, utilizando como substrato 1µl do cDNA produto da RT, numa solução de 50µl final, e adicionados reagentes com as seguintes concentrações finais: tampão PCR (20mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl); dATP, dCTP, dTTP, dGTP (200µM de cada), MgCl₂ (1,5mM), oligonucleotídeos iniciadores (400nM de cada), oligonucleotídeos iniciadores do r18S e do seu competidor (proporção de 2/8), 1U de Platinum Thermus aquaticus (Taq) polimerase e água livre de nucleases. Cada amostra foi feita em duplicata e utilizando reações sem o produto da RT como controles negativos.

Para o ensaio da expressão do gene que codifica o componente gp91^{phox} da NADPH-oxidase nos leucócitos mononucleares, foi amplificada uma região do cDNA contendo 415 pares de bases, usando-se os oligonucleotídeos iniciadores com a seguinte seqüência: 5'CGT CTA GAG CAT GAG GGG CTC TCC ATT TTT GTC A3' e 5'CGG GAT CCC GAG TTC AGA GAG TGC TAC TGA ATA A3' (número de acesso ao Gen Bank # NM000397). As condições para amplificação foram: inicialmente 95°C por 5 minutos, seguidos de 29 ciclos de: denaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 60°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 90 segundos, seguidos de uma extensão longa a 72°C por 7 minutos.

Para o ensaio da expressão do gene que codifica o componente p22^{phox} da NADPH-oxidase nos leucócitos mononucleares, foi amplificada uma região do cDNA contendo 146 pares de bases, usando-se os oligonucleotídeos iniciadores com a seguinte seqüência: 5'CCC AGC CGG GTT CGT GTC3' e 5'AAC ACG CCC GCC ACA ATG3' (número de acesso ao Gen Bank #NM000101). As condições para amplificação foram: 95°C por 5 minutos, seguido de 29 ciclos de: denaturação a 94°C durante 45 segundos, anelamento a 52°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 90 segundos, seguidos de uma extensão longa de 72°C por 7 minutos.

Para o ensaio da expressão do gene que codifica o componente p67^{phox} da NADPH-oxidase nos leucócitos mononucleares, foi amplificada uma região do cDNA contendo 181 pares de bases, usando-se os oligonucleotídeos iniciadores com a seguinte seqüência: 5'CTG GCC AAG AAG GAT TACC3' e 5'GGA GCT CTT CTT TTG TCT

CAG3' (número de acesso ao Gen Bank #M32011). As condições para amplificação foram: 95°C por 5 minutos, seguido de 29 ciclos de: denaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 57°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 90 segundos, seguidos de uma extensão longa de 72°C por 7 minutos.

Os produtos da amplificação do cDNA obtidos como descrito acima, foram identificados em gel de agarose a 3% no tampão TAE, na presença de brometo de etídio 1µg/ml, identificando-se os fragmentos do tamanho esperado. As bandas foram analisadas pelo software Imagemaker Total Lab V1.1 (Pharmacia, Uppsala, Suécia). O resultado da densitometria das amostras-alvo foi dividido pelo resultado da densitometria das amostras do controle interno, normalizando uma razão, que foi considerada para a análise estatística.

3.7. FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS CELULARES DE 47kDa DOS LEUCÓCITOS MONONUCLEARES

A avaliação da fosforilação de proteínas celulares foi feita utilizando-se uma adaptação do método descrito por OKAMURA *et al.* (1988). A suspensão de leucócitos mononucleares, numa concentração final de 4×10^6 células/ml em HHBSS (pH 7,4, CaCl₂ 1mM), preparadas como descrito acima, obtidas de pacientes com anemia falciforme e controles sadios, foram incubadas com ³²P 0,5mCi/ml por 90 min a 37°C, e em tempos específicos (10, 20, 30, 60, 300 segundos) após a adição do estímulo (PMA, 30 nM), a reação foi interrompida, transferindo-se as amostras para uma mistura de NaF 0,1mM, n-etilmaleimida 0,2mM, fluorofostato de isopropil 0,5mM, pepstatina 18µM, EDTA 10mM, sendo resfriada a 4°C por 2 minutos e adicionado SDS 2%. Após, esta mistura foi sonicada por 3 minutos e centrifugada a 10000 x g. O sobrenadante foi retirado e a ele foi adicionado uma mistura contendo, β-mercaptoetanol 5%, glicerol 5%, azul de bromofenol 0.01%, sendo então aquecida a 100°C por 5 minutos. A análise foi feita após eletroforese em gel de poli(acrilamida)-SDS, sob condições redutoras com 2-mercaptoetanol (5% V/V), utilizando-se gel de resolução a 13% e empacotamento a 3% (sistema Mini Protean II-Bio Rad). Após a coloração com azul de comassie, os géis secos foram expostos a filmes Kodak X Omat MA por 10-14 dias, e as proteínas marcadas com ³²P foram detectadas por auto-

radiografia. Posteriormente, as densitometrias das bandas de fosforilação foram analisadas pelo software Imagemaker Total Lab V1.1(Pharmacia, Uppsala, Suécia), cujo resultado indicou a quantificação relativa do seu estado de ativação.

3.8. MATERIAIS

Composição da solução de Krebs em mM: NaCl 137, KCl 2,7 , NaHCO₃ 11,9 , NaH₂PO₄ 0,3 ,MgSO₄ 0,8 , Glicose 5,6 , CaCl₂ 1.

Composição da solução de Hanks (HHBSS) em mM: NaCl 137; KCl 2.7, Na₂HPO₄ 0.5, KH₂PO₄ 0.4, glicose 5.5. suplementada com HEPES no pH 7,4.

Composição do tampão carbonato: Carbonato de Sódio 0,2M; Bicarbonato de Sódio 0,2M, EDTA 0,1mM, pH 10.

Composição da solução TAE: Tris acetato 0,04M; EDTA 0,001M.

Composição do 10x PCR buffer: 200mM tris-HCl (pH 8,4), 500mM KCl.

Composição do Buffer da RT: 100mM Tris-HCl (pH 8,3), 500mM KCl, 15mM MgCl₂.

Superóxido dismutase (SOD) de eritrócitos bovinos, N^w-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME), N^G-Monometil-L-Arginina metil ester (L-arginina), N^w-nitro-d-arginina metil ester (D-NAME) HEPES, Histopaque 1119, Histopaque 1077, phorbol 12-miristato 13-acetato (PMA), zimosam (ZYM), citocromo c (tipo III), trombina (bovina), indometacina, xantina, xantina-oxidase, NADPH, t-butil hidroperóxido, triton , glutationa reduzida, glutationa redutase, EDTA, Tris-HCl, NaF , n-etilmaleimida, fluorofostato de isopropil, pepstatina, EDTA, β-mercaptoetanol, glicerol, azul de bromofenol, azul de comassie foram obtidos da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA).

Os reagentes para a reação em cadeia da polimerase (PCR): tampão PCR; dNTPs, oligonucleotídeos iniciadores específicos para gp91^{phox}, p22^{phox} e p67^{phox}, Platinum Thermus aquaticus ((Taq) polimerase e água livre de nucleases foram obtidos da Gibco BRL (Gaithersburg, MD USA), assim como o brometo de etídeo.

Os reagentes da reação transcriptase reversa (RT): MMLV-RT, random decamers, superasin, DNase I, proteinase K, foram obtidos da Ambion, Inc.,TX, assim como os kits comerciais: Retroscript e QuantumRNA 18S internal Standards.

Quick Prep total RNA extraction kit foi obtido da Pharmacia (Upsalla, Suécia).

³²P foi obtido da Amershan Internacional (Reino Unido).

Mini Protean II foi adquirido da Bio Rad.

Iloprost (prostaciclina) foi cedida pela Schering.

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística descritiva foi realizada calculando-se os valores mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e máximo. A comparação entre grupos foi feita utilizando-se o teste de Mann-Whitney (SIGEL, 1956), considerando-se o valor de $p < 0,05$ como significativo. Os gráficos foram representados como "BOX-PLOTS" (EMERSON & STRENIO, 1983).

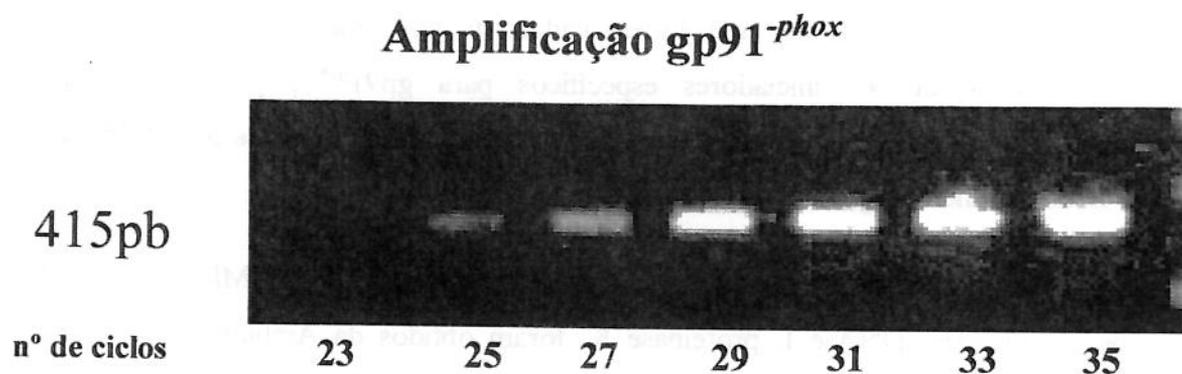


Figura 4. Representação do experimento para determinação da fase linear da amplificação durante o ensaio de PCR, utilizada no método de quantificação relativa. Os reagentes para a reação da PCR foram dispostos em 7 alíquotas iguais e removidos do termociclador após o número de ciclos indicados. Os produtos da amplificação (415pb) foram quantificados por densitometria, após eletroforese no gel de agarose a 3% e corados com brometo de etídio (1µg/ml). A fase linear da amplificação dos transcritos da gp91^{phox}, neste caso entre 27 e 31 ciclos, definida como o intervalo do número de ciclos no qual a eficiência da amplificação é progressiva, até atingir valores máximos e constantes.

Estes ensaios foram repetidos, tendo como amostra alvo a p22^{phox} e p67^{phox}, cuja fase linear da amplificação ocorreu entre 27 e 31 ciclos.

Amplificação $gp91^{phox}$ e r18S

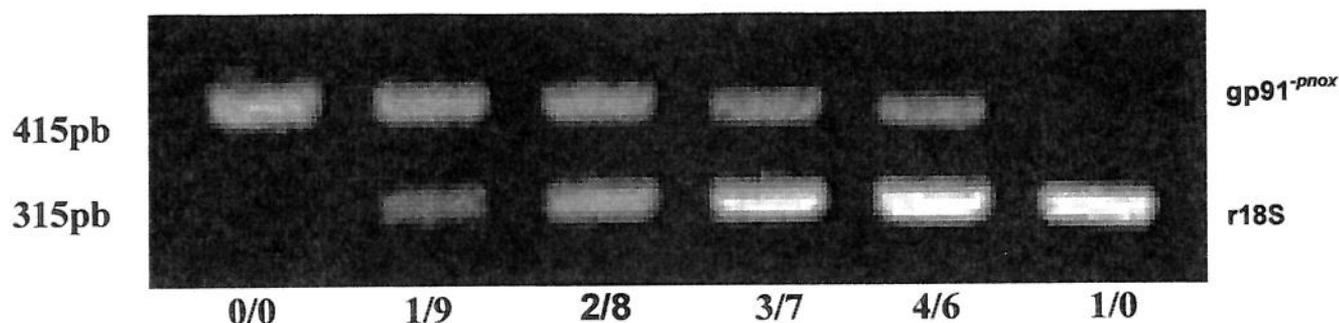


Figura 5: Verificação da proporção do oligonucleotídeo iniciador do controle interno (r18S) e do seu competidor. Para a utilização do método da quantificação relativa, é importante que a eficiência da amplificação do controle interno (r18S) esteja sendo observada na mesma intensidade da amostra em estudo. Este experimento determinou a concentração dos oligonucleotídeos iniciadores competidores necessária para amplificar o controle interno (r18S) na mesma variação linear da amostra-alvo. Fotografia representativa das proporções de 18S/competidores adicionadas às reações de PCR, que continha cDNA e oligonucleotídeos iniciadores da $gp91^{phox}$, gerando produtos de 315 pb (r18S) e 415 pb ($gp91^{phox}$). A densitometria demonstrou que a proporção 2/8 entre o r18S e seu competidor foi a ideal para que a amplificação do controle interno ocorresse na intensidade semelhante à observada na amostra-alvo. Foram feitos experimentos semelhantes, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para a $p22^{phox}$ e $p67^{phox}$, sendo obtida esta mesma proporção entre r18S e seu competidor.



4. RESULTADOS

4.1. DETECÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO LIBERADO POR GRANULÓCITOS E LEUCÓCITOS MONONUCLEARES

A menor concentração de trombina necessária para induzir agregação plaquetária irreversível em cinco minutos, nos experimentos, variou de 50 a 200 mU/ml. O número médio de granulócitos de pacientes falciformes e de controles sadios que causou 50-60% de inibição da agregação plaquetária foi, respectivamente: 4,5 e 4,2 x 10⁶ células/ml (n=9, Tab. I). A pré-incubação dos granulócitos dos pacientes falciformes e dos controles sadios com L-arginina 1mM não potencializou o efeito inibitório destas células na agregação plaquetária (p>0,05 em todas as situações, n=9, teste de Mann-Whitney, Fig. 6). Nestas condições, o respectivo número médio de granulócitos que causou 50-60% de inibição da agregação plaquetária foi de 4,4 e 4,3 x 10⁶ células/ml (n=9, Tab. I).

A pré-incubação dos granulócitos dos pacientes e dos controles sadios com um inibidor da síntese de óxido nítrico, L-NAME (300µM), durante 60 minutos em temperatura ambiente, reduziu quase totalmente sua capacidade inibidora da agregação plaquetária (n=9, Fig. 6). O enantiômero D-NAME (300µM) não afetou a capacidade dos granulócitos dos pacientes e dos controles sadios em inibir a agregação plaquetária quando comparados com os granulócitos sem tratamento (p>0,05 em ambas as situações, n=9, teste de Mann-Whitney, Fig. 6) A média de granulócitos dos pacientes falciformes e dos controles sadios que causou 50-60% de inibição da agregação plaquetária após incubação com D-NAME foi, respectivamente: 4,5 e 4,4 x 10⁶ células/ml (n=9, Tab. I).

O efeito provocado pelo L-NAME foi revertido quando os granulócitos foram simultaneamente pré-incubados com L-NAME (300 µM) e L-arginina (1 mM), durante 60 minutos em temperatura ambiente (Fig. 6). Nestas condições o respectivo número médio de granulócitos dos pacientes com anemia falciforme e dos controles que causou 50-60% de inibição da agregação plaquetária foi respectivamente de 4,5 e 4,4x10⁶ células/ml (n=9, Tab. I), valores estatisticamente similares aos apresentados por granulócitos não submetidos à pré-incubação (p>0,05 em ambas as situações, n=9, teste de Mann-Whitney).

A superóxido dismutase (60 U/ml) potencializou o efeito inibitório dos granulócitos de pacientes com anemia falciforme e dos controles sadios sobre a agregação das plaquetas estimulada pela trombina (Fig. 6). O mesmo número de células que causou a inibição de 50-60% da agregação plaquetária na ausência da SOD, inibiu 80-90% da agregação plaquetária na presença da SOD (n=9, Tab. I).

Leucócitos mononucleares de pacientes falciformes inibiram a agregação de plaquetas induzida pela trombina apenas na presença de SOD (60 U/ml, n=9, Fig. 7). O número médio de leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme e dos controles que causou 80-90% de inibição da agregação plaquetária na presença da SOD foi, respectivamente: $3,5$ e $3,3 \times 10^6$ células por ml (n=9, Tab. II). Nestas condições a pré-incubação de leucócitos mononucleares com o L-NAME, inibidor da síntese do óxido nítrico (300 μ M), aboliu completamente a capacidade de inibir a agregação plaquetária destas células (n=9, Fig. 7).

Na presença da SOD, o enantiômero D-NAME (300 μ M) não afetou a capacidade de inibir a agregação plaquetária dos leucócitos mononucleares dos pacientes falciformes ou dos controles, em comparação com os leucócitos mononucleares que não sofreram qualquer incubação ($p > 0,05$ em ambas as situações, n=9, teste de Mann-Whitney, Fig. 7). O respectivo número médio de leucócitos mononucleares dos pacientes com anemia falciforme e dos controles que causou 80-90% de inibição da agregação plaquetária após a incubação com D-NAME foi respectivamente de $3,6$ e $3,4 \times 10^6$ células/ml (n=9, Tab. II).

O efeito do L-NAME foi revertido pela pré-incubação de leucócitos mononucleares com L-NAME (300 μ M) e L-arginina (1mM, Fig. 7). Nestas condições, o respectivo número médio de leucócitos mononucleares dos pacientes com anemia falciforme e dos controles que causou 80-90% de inibição da agregação plaquetária foi respectivamente de $3,6$ e $3,5 \times 10^6$ células/ml (n=9, Tab. II), valores estatisticamente similares aos encontrados, quando os leucócitos mononucleares não sofreram qualquer incubação ($p > 0,05$ em ambas as situações, n=9, teste de Mann-Whitney).

A L-arginina (1mM) não restaurou a capacidade de os leucócitos mononucleares dos pacientes com anemia falciforme de inibir a agregação plaquetária na ausência da SOD (n=9), e nem tampouco potencializou o efeito inibitório da agregação plaquetária destas células na presença da SOD em comparação aos leucócitos mononucleares que não sofreram incubação ($p>0,05$ em ambas as situações, n=9, teste de Mann-Whitney, Fig. 7). O respectivo número médio de leucócitos mononucleares dos pacientes com anemia falciforme e dos controles incubados com L-arginina que causou 80-90% de inibição da agregação plaquetária na presença de SOD foi respectivamente de $3,5$ e $3,4 \times 10^6$ células/ml (n=9, Tab. II). Na ausência de leucócitos, a SOD (60 U/ml) não tem efeito na agregação de plaquetas induzida pela trombina.

Tabela 1. Inibição da agregação de plaquetas por granulócitos

A) Número de granulócitos de pacientes com anemia falciforme (10^6 células) que inibiu 50-60% de agregação de plaquetas lavadas induzida pela trombina (50 mU/ml), na ausência de SOD

	HHBSS	L-arginina (1 mM)	D-NAME (300 μ M)	L-arginina (1 mM)+L-NAME (300 μ M)
Máximo	5,0	5,0	5,0	4,9
Percentil 75	4,8	4,7	4,8	4,8
Mediana	4,5	4,4	4,5	4,5
Percentil 25	4,3	4,2	4,2	4,3
Mínimo	4,0	3,9	4,1	4,1

9 experimentos

B) Número de granulócitos de controles sadios (10^6 células) que inibiu 50-60% de agregação de plaquetas lavadas induzida pela trombina (50 mU/ml), na ausência de SOD

	HHBSS	L-arginina (1 mM)	D-NAME (300μM)	L-arginina (1 mM)+L-NAME (300μM)
Máximo	5,0	5,0	4,9	5,0
Percentil 75	4,6	4,7	4,7	4,8
Mediana	4,2	4,3	4,4	4,4
Percentil 25	4,1	4,2	4,2	4,3
Mínimo	4,0	4,2	4,1	4,0

9 experimentos

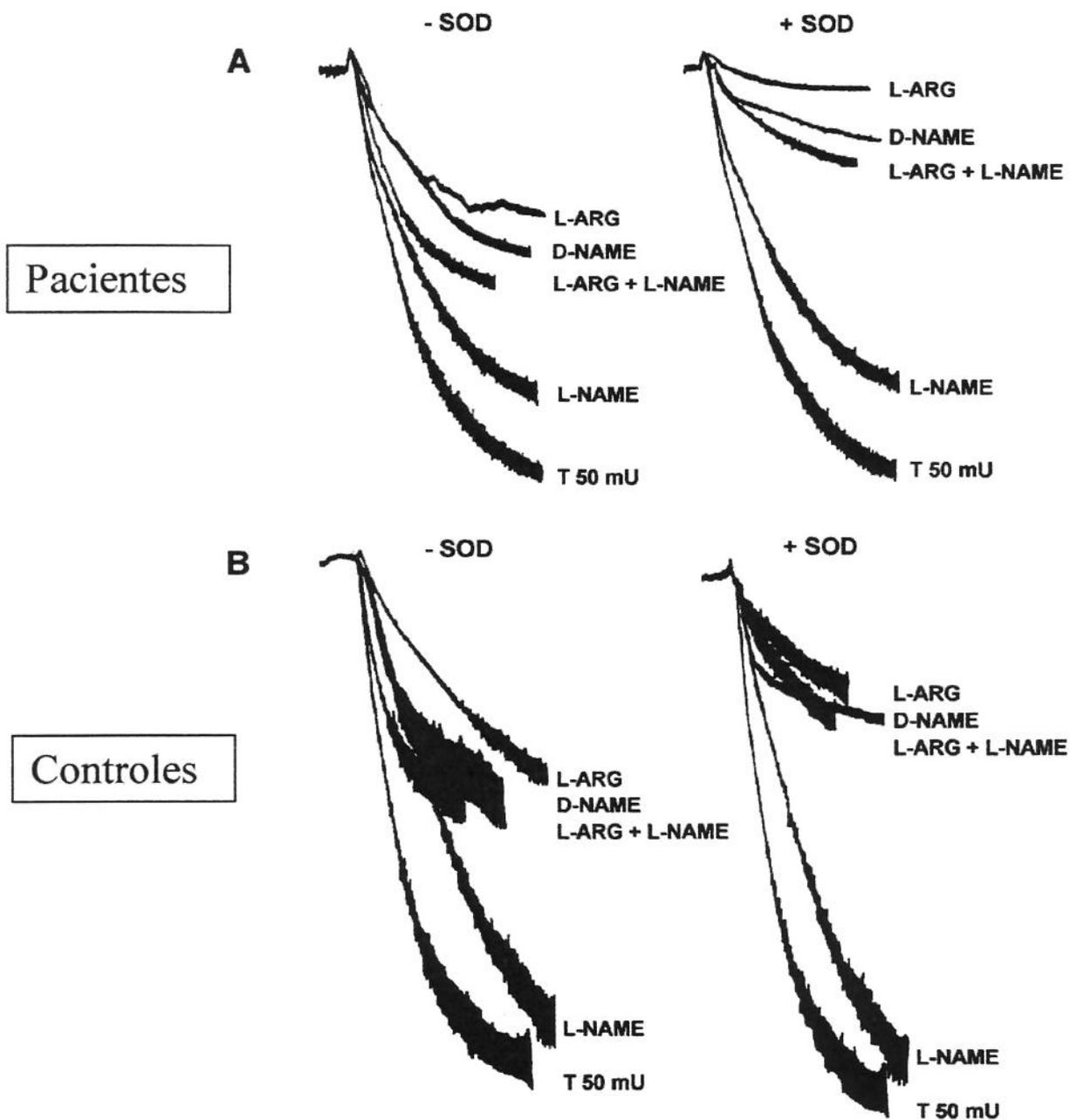


Figura 6. Ensaio para detecção de óxido nítrico liberado por granulócitos. Figura representativa do bioensaio para detecção do óxido nítrico liberado pelos granulócitos. Trombina (T50 mU) induziu agregação submáxima de plaquetas lavadas. Os granulócitos de pacientes com anemia falciforme (mediana $4,4 \times 10^6$ células/ml, Painel A) e dos controles sadios (mediana $4,2 \times 10^6$ células/ml, Painel B) tiveram efeito inibitório na agregação de plaquetas lavadas, o qual

não foi potencializado pela pré-incubação com L-arginina (1 mM, Painéis A e B). A incubação dos granulócitos com o inibidor da síntese do óxido nítrico, L-NAME (300 μ M), aboliu a capacidade destes de inibir a agregação plaquetária (Painéis A e B). Seu enantiômetro D-NAME (300 μ M) não afetou a capacidade dos granulócitos de inibir a agregação plaquetária (Painéis A e B). A L-arginina (1 mM) restaurou a capacidade dos granulócitos de inibir a agregação de plaquetas lavadas, quando usada simultaneamente com o L-NAME (300 μ M, Painéis A e B). A SOD (60 U/ml), potencializou o efeito de inibitório dos granulócitos sobre a agregação de plaquetas lavadas (Painéis A e B).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre granulócitos de pacientes com anemia falciforme e controles sadios para inibir a agregação plaquetária nas diversas situações (n=9 , p>0,05, em todas as situações, teste de Mann-Whitney)

Tabela 2. Inibição da agregação de plaquetas por leucócitos mononucleares

A) Número de leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme (10^6 células) que inibiu 80-90% de agregação de plaquetas lavadas induzida pela trombina (50 mU/ml), na presença de SOD

	HHBSS	L-arginina (1 mM)	D-NAME (300 μ M)	L-arginina (1 mM)+L-NAME (300 μ M)
Máximo	4,0	3,8	4,0	3,9
Percentil 75	3,7	3,6	3,8	3,7
Mediana	3,5	3,5	3,6	3,6
Percentil 25	3,2	3,3	3,3	3,4
Mínimo	3,0	3,2	3,1	3,1

9 experimentos

B) Número de leucócitos mononucleares de controles sadios (10^6 células) que inibiu 80-90% de agregação de plaquetas lavadas induzida pela trombina (50 mU/ml), na presença de SOD

	HHBSS	L-arginina (1 mM)	D-NAME (300 μ M)	L-arginina (1 mM)+L-NAME (300 μ M)
Máximo	3,9	4,0	4,0	3,9
Percentil 75	3,7	3,7	3,8	3,6
Mediana	3,3	3,4	3,4	3,5
Percentil 25	3,2	3,2	3,3	3,4
Mínimo	3,0	3,0	3,2	3,1

9 experimentos

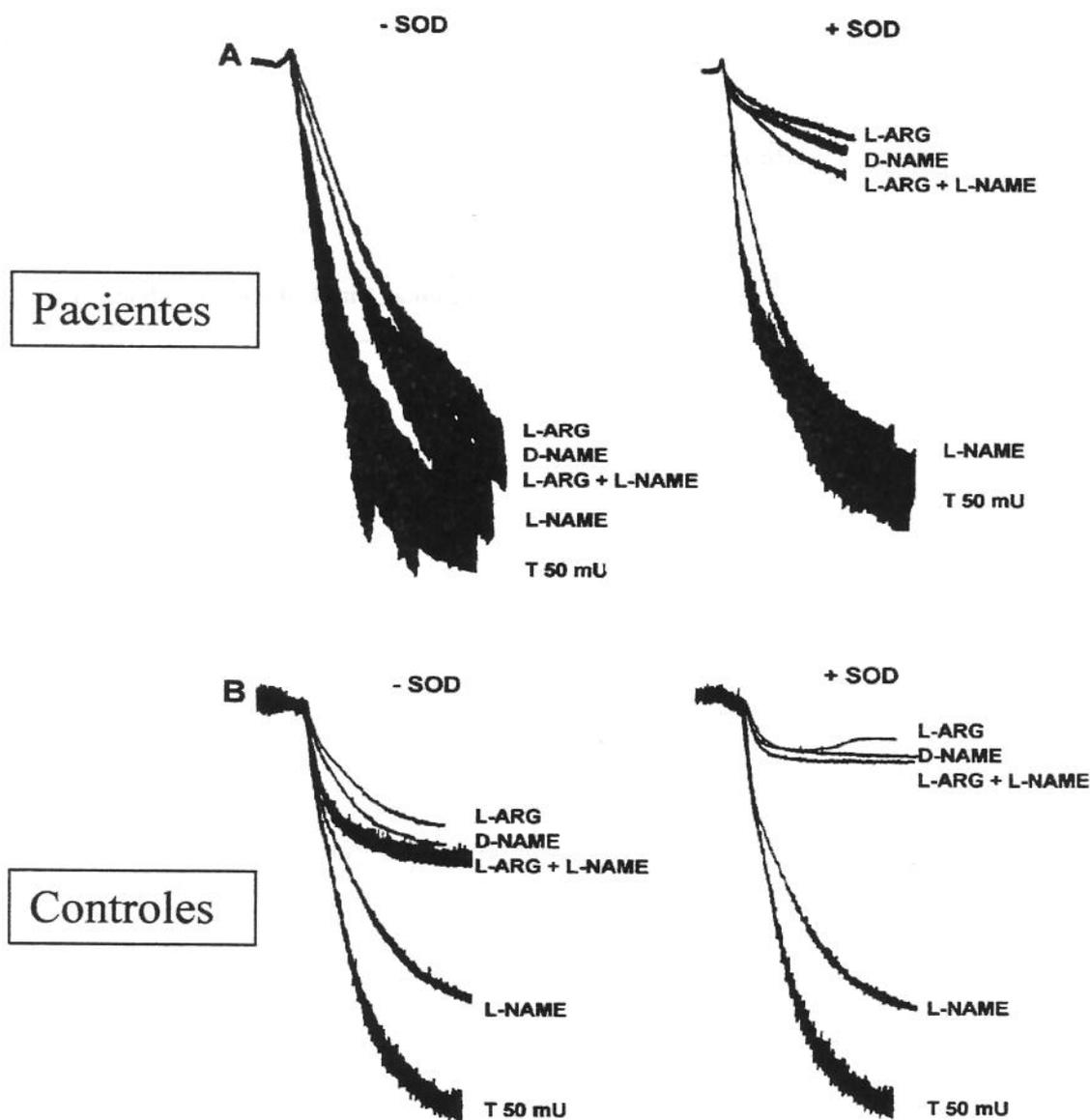


Figura 7. Ensaio para detecção de óxido nítrico liberado por leucócitos mononucleares. Figura representativa da liberação de óxido nítrico pelos leucócitos mononucleares. Trombina induziu agregação de plaquetas (T50mU). Na ausência de SOD, os leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme (mediana $3,5 \times 10^6$ células/ml, Painel A) sozinhos ou pré-incubados com L-arginina (1 mM), D-NAME (300 μ M) ou L-arginina (1 mM) com L-NAME (300 μ M), não inibiram de modo significativo a agregação de plaquetas induzida pela trombina. Contudo, na presença de SOD

(60 U/ml), os leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme (Painel A, +SOD) tiveram efeito inibitório na agregação de plaquetas lavadas (mediana $3,5 \times 10^6$ células/ml), o qual não foi potencializado pela pré-incubação com L-arginina (1 mM). A incubação com o inibidor da síntese do óxido nítrico, L-NAME (300 μ M), aboliu sua capacidade de inibir a agregação plaquetária. O enantiômero D-NAME (300 μ M) não afetou a capacidade dos leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme de inibir a agregação plaquetária. A L-arginina (1 mM) restaurou a capacidade dos leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme de inibir a agregação de plaquetas lavadas, quando usada simultaneamente com o L-NAME (300 μ M).

Os leucócitos mononucleares dos controles sadios (mediana $3,3 \times 10^6$ células/ml, Painel B) tiveram efeito inibitório na agregação de plaquetas e inibiram a agregação de plaquetas lavadas induzida pela trombina quando pré-incubada com L-arginina (1 mM) e D-NAME (300 μ M). A pré-incubação com L-NAME (300 μ M) reduziu este efeito inibitório, que foi revertido com a pré-incubação de L-arginina (1 mM) com L-NAME (300 μ M). A SOD (60 U/ml) potencializou o efeito inibitório na agregação plaquetária dos leucócitos mononucleares de controles sadios, quando incubados com as referidas substâncias (Painel B +SOD). Na presença de SOD não houve diferença estatisticamente significativa entre leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme e controles sadios para inibir a agregação plaquetária (n=9 , p>0,05, em todas as situações, teste de Mann-Whitney).

4.2. DOSAGEM DO SUPERÓXIDO LIBERADO POR GRANULÓCITOS E LEUCÓCITOS MONONUCLEARES

A média da liberação espontânea, estimulada com PMA e estimulada com ZYM, de superóxido por granulócitos de pacientes com anemia falciforme (n=22) e dos granulócitos de controles sadios (n=17), pode ser vista na Fig. 8. Não houve diferença estatisticamente significativa entre estes resultados (p>0,05 em todas as situações, teste de Mann-Whitney).

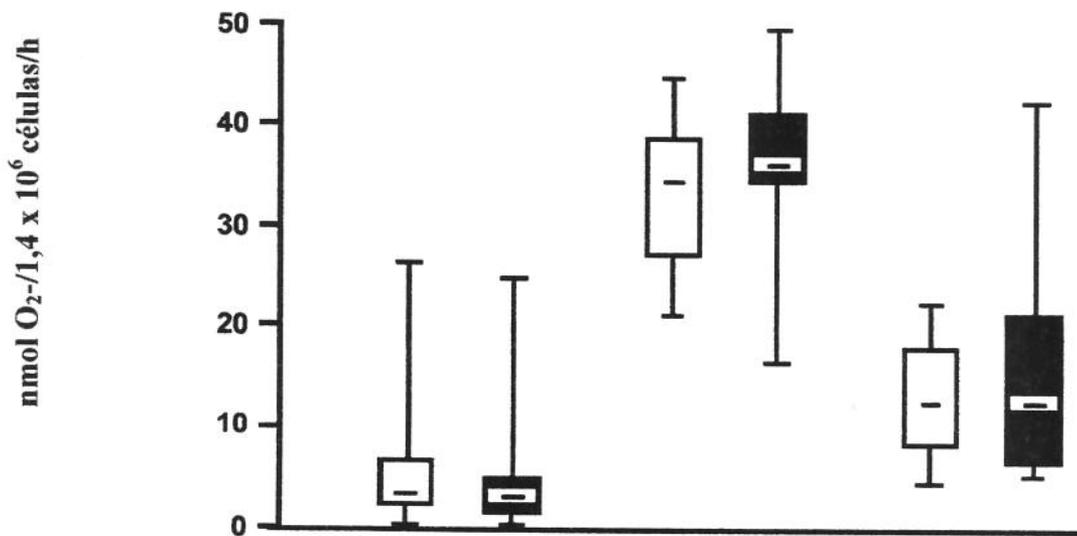


Figura 8. Liberação de superóxido pelos granulócitos de pacientes com anemia falciforme (n=22, ■) e de controles sadios (n=17 □). A liberação de superóxido por granulócitos de pacientes com anemia falciforme e controles sadios foi similar, seja ela espontânea ou após estímulo com PMA (30nM) ou Zimosan (100 partículas/célula) ($p > 0,05$ em todas as situações, teste de Mann-Whitney). “Box-plots” representando o valor mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e valor máximo.

A Fig. 9 mostra a média da liberação espontânea, estimulada com PMA e estimulada com ZYM, de superóxido por leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme (n=22) e de controles sadios (n=17). A liberação estimulada de ânion superóxido por leucócitos mononucleares dos pacientes com anemia falciforme foi significativamente maior do que a observada pelos controles sadios ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente, teste de Mann-Whitney). A liberação espontânea de superóxido por leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme foi similar a dos controles sadios ($p > 0,05$, teste de Mann-Whitney)

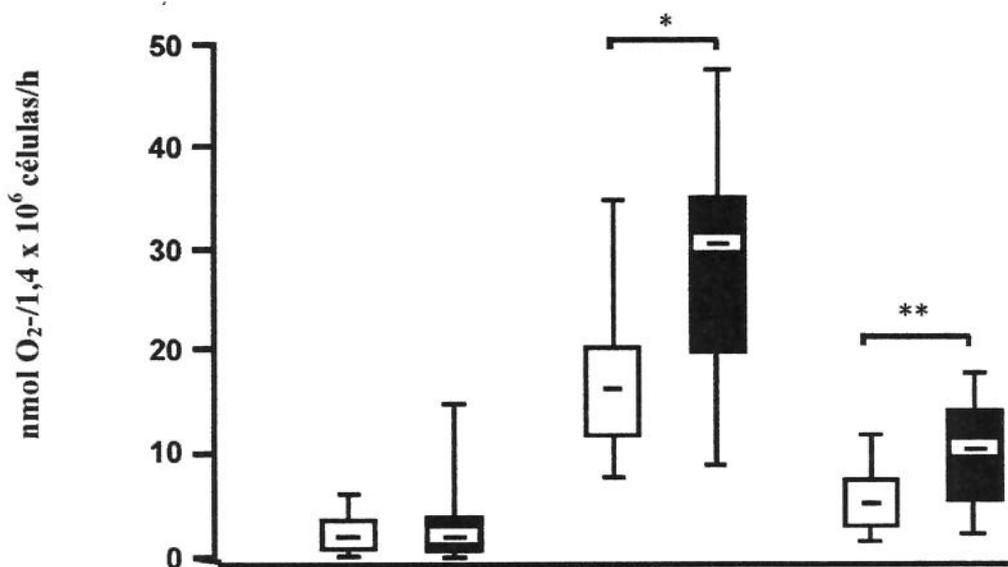


Figura 9. Liberação de superóxido pelos leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme (n=22 ■) e de controles sadios (n=17 □). A liberação espontânea de superóxido por leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme foi similar a dos controles sadios. Quando os leucócitos mononucleares foram estimulados com PMA (30nM) ou Zymosan (100 partículas/célula), a liberação de superóxido por leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme foi superior a dos controles sadios (respectivamente, *p<0,001 e **p<0,01, teste de Mann-Whitney). “Box-plots” representando valor mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e valor máximo.

4.3. ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE CELULAR DOS GRANULÓCITOS E LEUCÓCITOS MONONUCLEARES

A atividade do glutathione peroxidase celular dos granulócitos e dos leucócitos mononucleares dos pacientes com anemia falciforme e dos controles sadios foi avaliada pela técnica da oxidação do NADPH pelo t-butil hidroperóxido. Na Fig. 10, observa-se que a mediana da atividade da glutathione peroxidase dos granulócitos de pacientes com anemia falciforme (n=10) não difere estatisticamente da encontrada nos granulócitos dos controles sadios (n=10, p>0,05, teste de Mann-Whitney).

A Fig. 10 também mostra que a mediana da atividade da glutathiona peroxidase celular nos leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme (n=10) não difere estatisticamente da encontrada nos leucócitos mononucleares de controles sadios (n=10, p>0,05, teste de Mann-Whitney).

Os resultados demonstram que a atividade da enzima glutathiona peroxidase celular nos leucócitos dos pacientes falciformes é semelhante à observada nos leucócitos dos controles sadios.

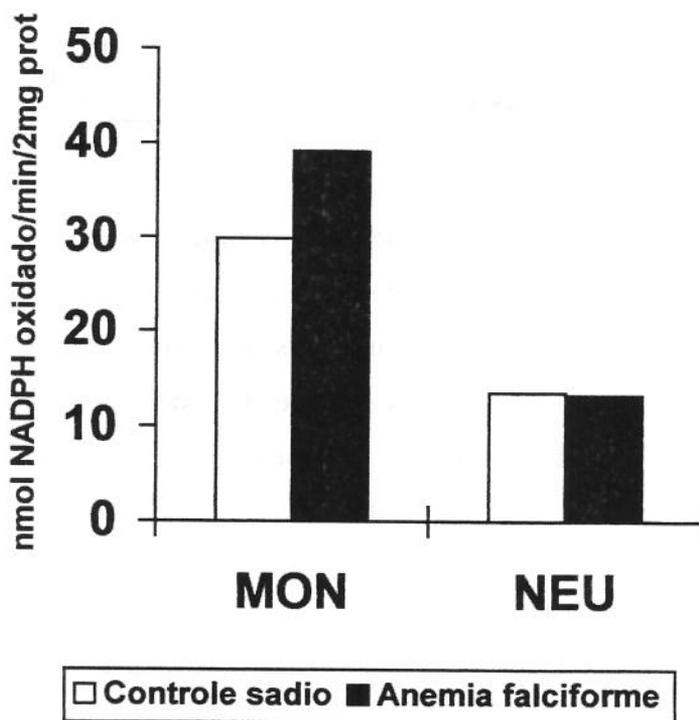


Figura 10. Atividade da glutathiona peroxidase intraleucocitária obtida com a oxidação do NADPH pelo t-butil hidroxiperóxido em um minuto. A mediana da atividade da GSH-Px dos leucócitos mononucleares de pacientes falciformes (3×10^7 células, n=10) não apresentou diferença estatisticamente significativa, quando comparada a dos leucócitos mononucleares dos controles (3×10^7 células, n=10). O mesmo se nota em relação à atividade da GSH-Px dos granulócitos dos pacientes com anemia falciforme (3×10^7 células, n=10) quando comparadas às correspondentes células dos controles sadios (3×10^7 células, n=10, p>0,05, em todas as situações, teste de Mann Whitney).

4.4. ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE DOS GRANULÓCITOS E LEUCÓCITOS MONONUCLEARES

As medianas da porcentagem de inibição competitiva da redução do citocromo c induzida pela xantina oxidase pelos granulócitos dos pacientes com anemia falciforme (n=10) e dos controles sadios (n=10) nos diversos volumes do lisado celular (2×10^7 células/ml) podem ser vistas na Fig. 11. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre estes resultados ($p > 0,05$, nas diversas situações, teste de Mann-Whitney).

A Fig. 12 mostra a mediana da porcentagem de inibição da redução do citocromo c pelos leucócitos mononucleares dos pacientes com anemia falciforme (n=10) e dos controles sadios (n=10), nos diversos volumes do lisado celular (2×10^7 células/ml). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre a atividade da SOD nos leucócitos mononucleares dos pacientes com anemia falciforme em relação a dos controles sadios ($p > 0,05$, nas diversas situações, teste de Mann-Whitney).

Os resultados demonstram que a atividade da enzima superóxido dismutase nos leucócitos dos pacientes falciformes é semelhante à observada nos leucócitos dos controles sadios.

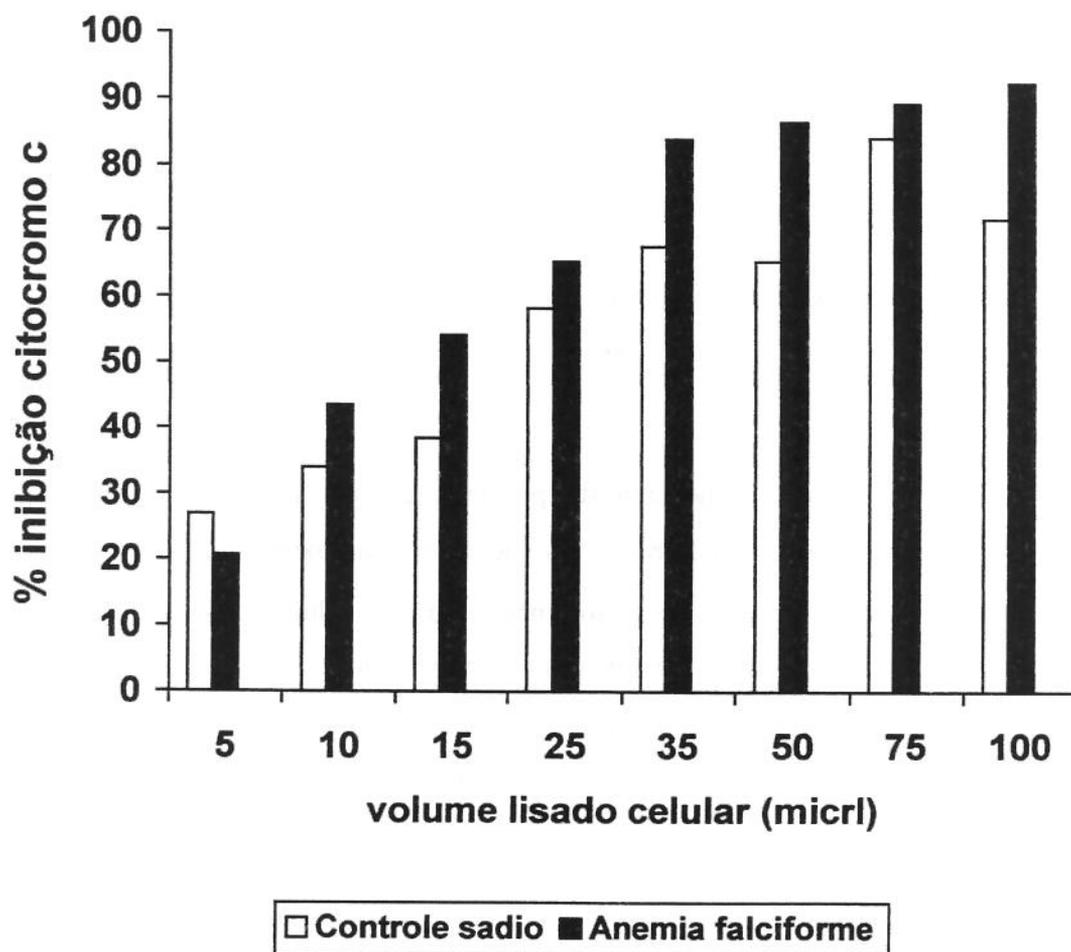


Figura 11. Atividade da SOD nos granulócitos de pacientes com anemia falciforme e de controles sadios, obtida pela inibição competitiva da redução do citocromo c induzida pela xantina oxidase em um minuto. Não houve diferença estatisticamente significativa das medianas da atividade da SOD nos diversos volumes do lisado celular dos leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme (2×10^7 células, n=10) quando comparadas às medianas dos respectivos volumes do lisado celular dos controles sadios (2×10^7 células, n=10, $p > 0,05$ em todas as situações, teste de Mann-Whitney).

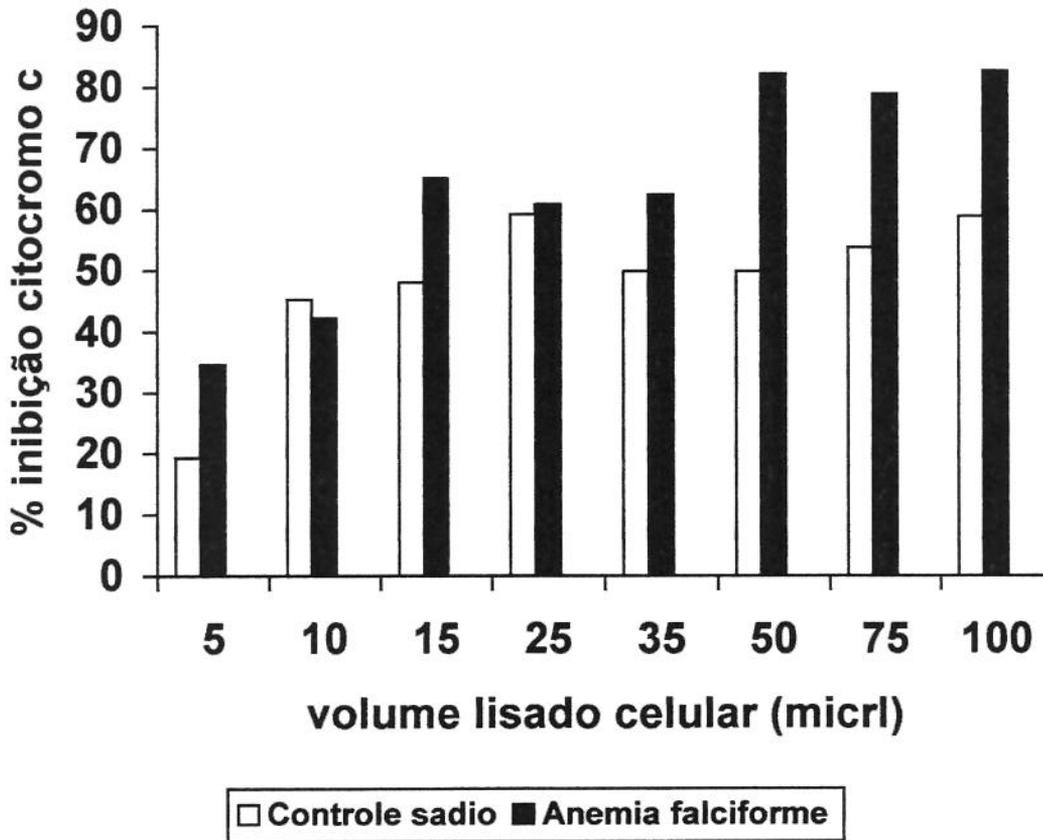


Figura 12. Atividade da SOD dos leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme e de controles sadios, obtida pela inibição competitiva da redução do citocromo c, induzida pela xantina oxidase em um minuto. Nota-se que ao aumentar o volume do lisado celular (2×10^7 células/ml) a mediana da inibição do citocromo c do sistema contendo leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme (n=10) foi se elevando gradualmente. O mesmo não ocorreu com as medianas dos leucócitos mononucleares dos controles sadios (n=10), nos volumes: 35, 50, 75 e 100 μ l, que se mantiveram praticamente nos mesmos valores. Houve tendência da atividade da SOD dos leucócitos mononucleares dos pacientes com anemia falciforme ser maior quando comparada a dos leucócitos mononucleares dos controles sadios, porém sem atingir significado estatístico ($p > 0,05$, em todas as situações, teste de Mann-Whitney).

4.5. EXPRESSÃO DOS GENES DOS COMPONENTES GP91^{-PHOX}, P67^{-PHOX} E P22^{-PHOX} DA NADPH-OXIDASE DOS LEUCÓCITOS MONONUCLEARES

Estudou-se a expressão dos genes *CYBB*, que codifica a proteína gp91^{-phox}, *CYBA*, que codifica a proteína p22^{-phox} e do gene *NCF2*, que codifica a proteína p67^{-phox}, componentes do sistema NADPH-oxidase, responsável pela produção do ânion superóxido, nos leucócitos mononucleares dos pacientes com anemia falciforme e dos controles sadios.

Os resultados obtidos foram calculados dividindo-se os valores da densitometria da amostra (dos pacientes com anemia falciforme ou dos controles sadios) pelos valores da densitometria do respectivo controle interno (r18S), que foram denominados densitometria relativa.

Uma imagem representativa dos produtos da reação de RT-PCR, em que foram usados oligonucleotídeos iniciadores específicos para o componente gp91^{-phox} (pb=415) e r18S (pb=315) é vista na Fig. 13, no seu painel superior. No painel inferior há a representação gráfica da série de resultados das densitometrias relativas da expressão do gene que codifica o componente gp91^{-phox}.

Os leucócitos mononucleares dos pacientes (n=21) expressam mais o gene que codifica o componente gp91^{-phox} em relação aos controles sadios (n=23, p=0,036, teste de Mann-Whitney).

No painel superior da Fig. 14, há uma imagem representativa dos produtos da reação de RT-PCR, em que foram usados oligonucleotídeos iniciadores específicos para o componente p22^{-phox} (pb=146) e r18S (pb=315). O painel inferior desta mesma figura mostra a representação gráfica da série de resultados das densitometrias relativas da expressão do gene que codifica o componente p22^{-phox}.

Os leucócitos mononucleares dos pacientes com anemia falciforme (n=24) expressam o gene que codifica o componente p22^{-phox} em níveis semelhantes aos controles sadios (n=24, p>0,05, teste de Mann-Whitney).

A Fig. 15, no painel superior, mostra uma imagem representativa dos produtos da reação de RT-PCR, em que foram usados oligonucleotídeos iniciadores específicos para o componente p67^{-phox} (pb=181) e do r18S (pb=315). O painel inferior mostra a representação gráfica da série de resultados das densitometrias relativas da expressão do gene que codifica o componente p67^{-phox}.

Os leucócitos mononucleares dos pacientes com anemia falciforme (n=22) expressam o gene que codifica o componente p67^{phox} em níveis semelhantes aos controles sadios (n=22), p>0,05, teste de Mann-Whitney.

Expressão gp91^{phox}

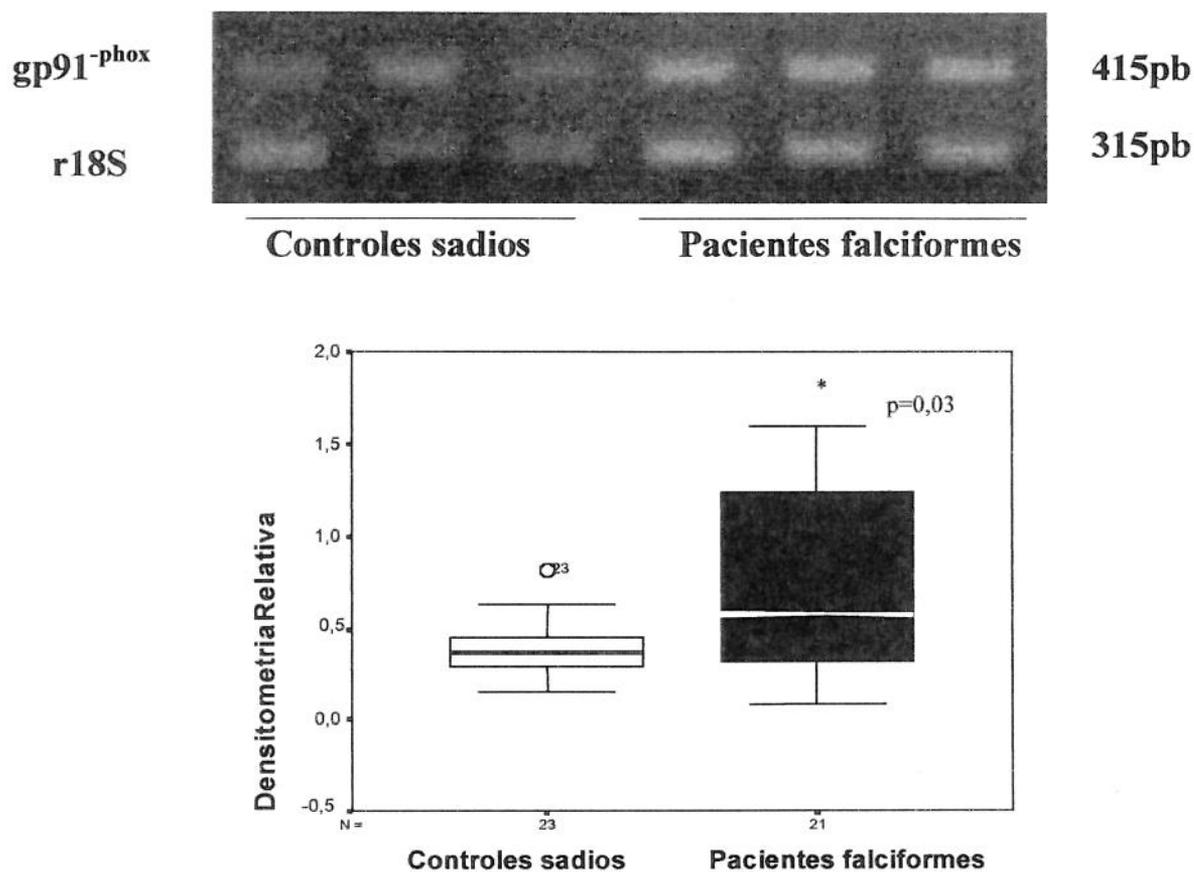


Figura 13. Análise dos transcritos da gp91^{phox} em preparação de RNA total de leucócitos mononucleares por meio de experimento RT-PCR

Painel superior - fotografia representativa do cDNA amplificado por PCR utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos para gp91^{phox} e r18S com produtos de pb=415 e 315, respectivamente, após eletroforese em gel de agarose a 3% e corado com brometo de etídio (1µg/ml). Nota-se maior quantidade de transcritos nas amostras dos pacientes com anemia falciforme, quando comparadas às dos controles sadios. **Painel inferior** - mostra a representação gráfica das densitometrias relativas dos transcritos do

componente gp91^{-phox} nos leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme e dos controles, representadas como “box-plots”, indicando valor mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e valor máximo. A densitometria da banda que compreende o componente gp91^{-phox} foi maior nos leucócitos mononucleares dos pacientes (n=21) em relação a dos controles (n=23, p=0,036, teste de Mann Whithney), indicando maior expressão deste gene nos pacientes.

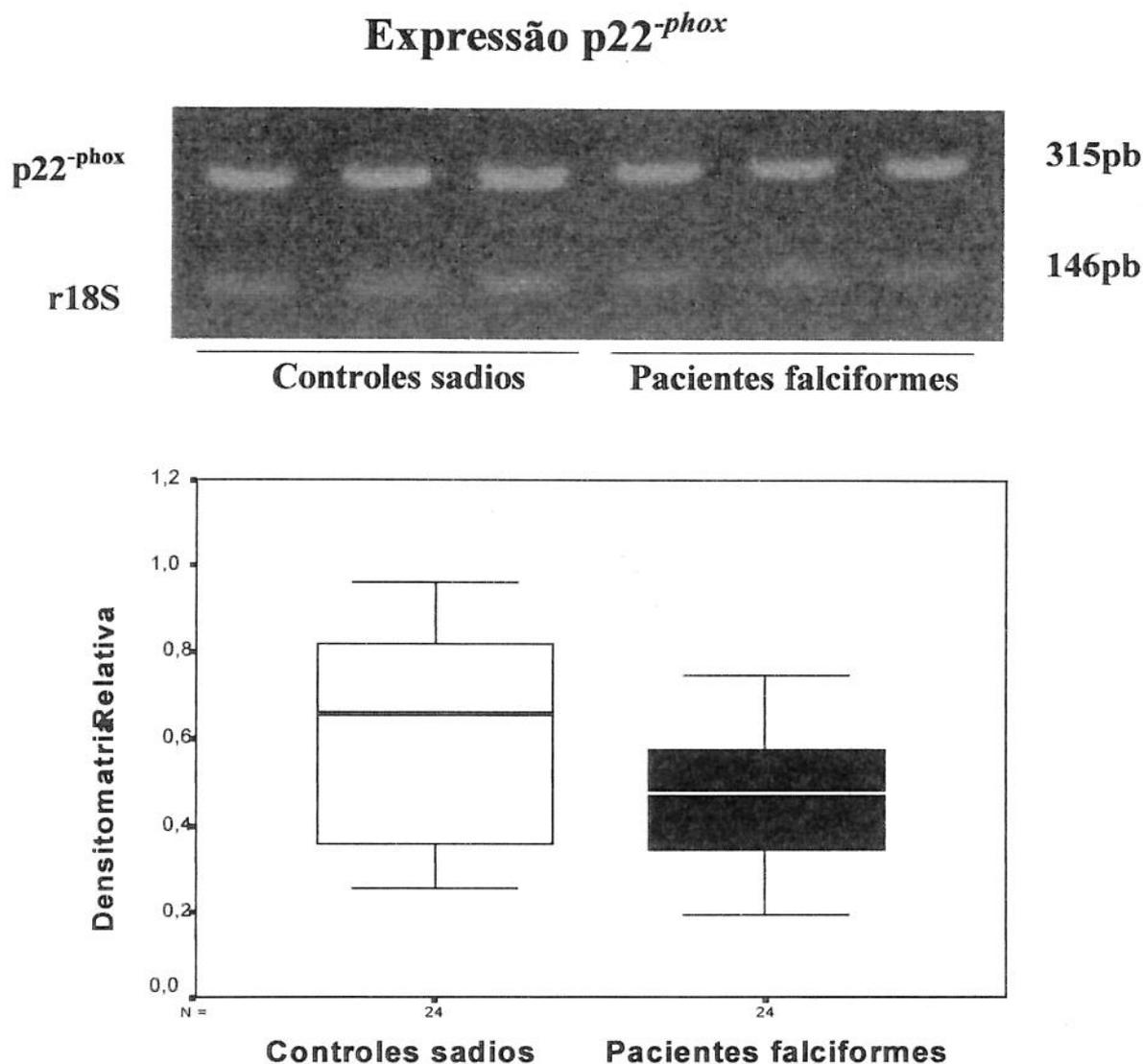


Figura 14. Análise dos transcritos da p22^{phox} em preparação de RNA total de leucócitos mononucleares por meio de experimento RT-PCR

Painel superior - fotografia representativa do cDNA amplificado por PCR utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos para p22^{phox} (pb=146) e r18S (pb=315), após eletroforese em gel de agarose a 3% e corado com brometo de etídio (1µg/ml). Notar quantidade de transcritos semelhantes entre as amostras dos pacientes com anemia falciforme e dos controles sadios.

Painel inferior - mostra a representação gráfica das densitometrias relativas dos transcritos do componente p22^{phox} nos leucócitos mononucleares de

pacientes com anemia falciforme e dos controles, representadas como “box-plots”, indicando valor mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e valor máximo. Não houve diferença estatisticamente significativa ao comparar as densitometrias das bandas que correspondem ao componente $p22^{phox}$ entre os leucócitos mononucleares dos pacientes (n=24) e dos controles (n=24, $p>0,05$, teste de Mann-Whitney).

Expressão p67^{phox}

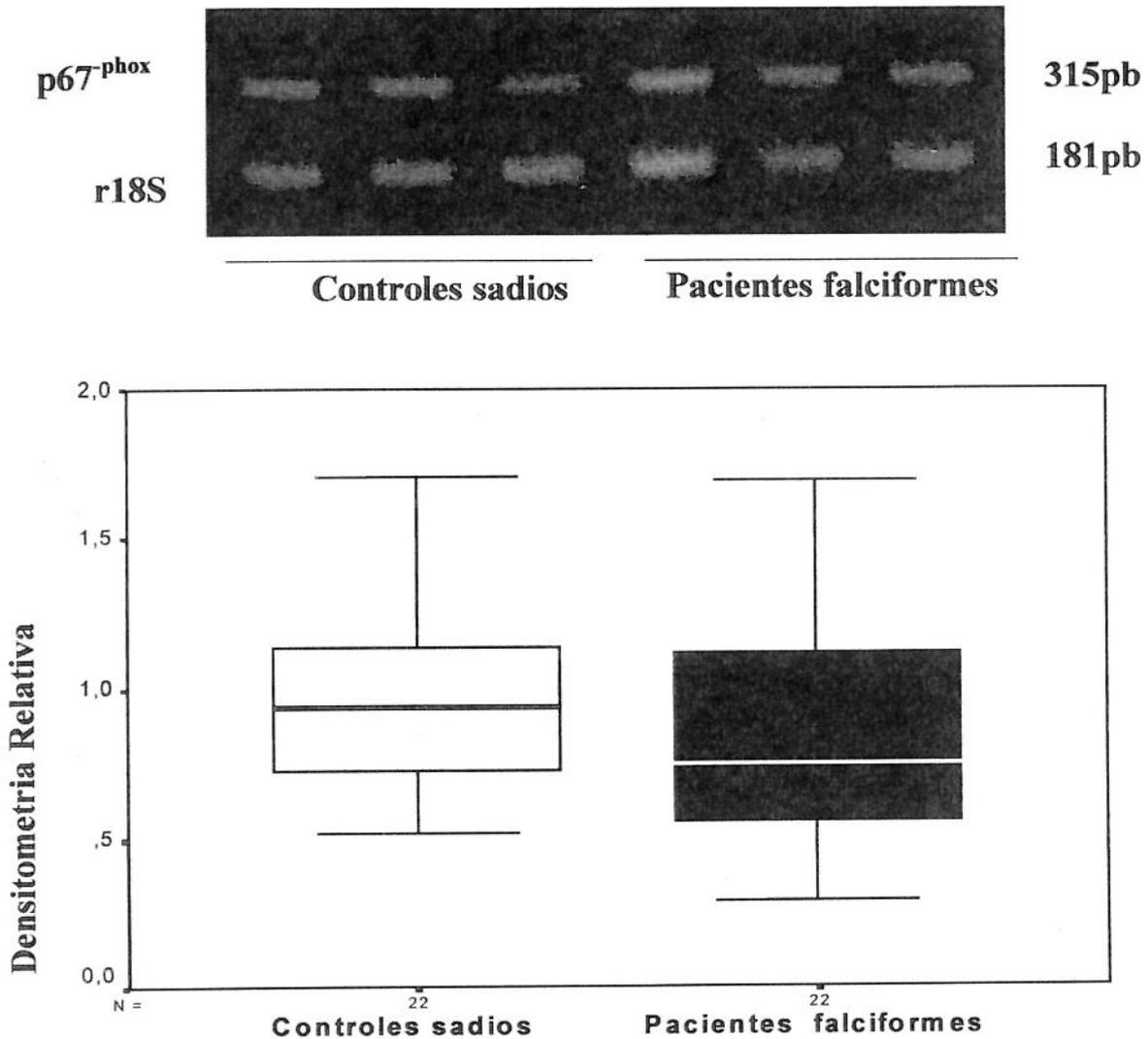


Figura 15. Análise dos transcritos da p67^{phox} em preparação de RNA total de leucócitos mononucleares por meio de experimento RT-PCR.

Painel superior - fotografia representativa do cDNA amplificado por PCR utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos para p67^{phox} (pb=181) e r18S (pb=315), após eletroforese em gel de agarose a 3% e corado com brometo de etídio (1µg/ml). Notar quantidade de transcritos semelhantes entre as amostras dos pacientes com anemia falciforme em relação às dos controles sadios. Painel inferior - mostra a representação gráfica das densitometrias

relativas dos transcritos do componente p67^{phox} nos leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme e dos controles, representadas como box-plots, indicando valor mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e valor máximo. Não houve diferença estatisticamente significativa ao comparar as densitometrias das bandas que correspondem ao componente p67^{phox} nos leucócitos mononucleares dos pacientes (n=22) e dos controles (n=22, p>0,05, teste de Mann Whitney).

4.6. FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS CELULARES DE 47kDa DOS LEUCÓCITOS MONONUCLEARES

Verificou-se a fosforilação do grupo de proteínas celulares com peso de 47kDa dos leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme (n=4) e controles sadios (n=6), no estado basal e após estímulo com PMA (30nM). Estes experimentos, apresentados na Fig. 17, indicam que as medianas das densitometrias, que representam a incorporação do ³²P por estas proteínas celulares, seja no estado basal ou estimulada com PMA nos tempos de 10, 20, 30, 60 e 300 segundos, obtidas após eletroforese em gel poliacrilamida-SDS e auto-radiografia, foram maiores nos pacientes com anemia falciforme em relação as dos controles sadios (p<0,03 no tempo de 20 segundos, p<0,02 nos outros tempos, teste de Mann-Whitney).

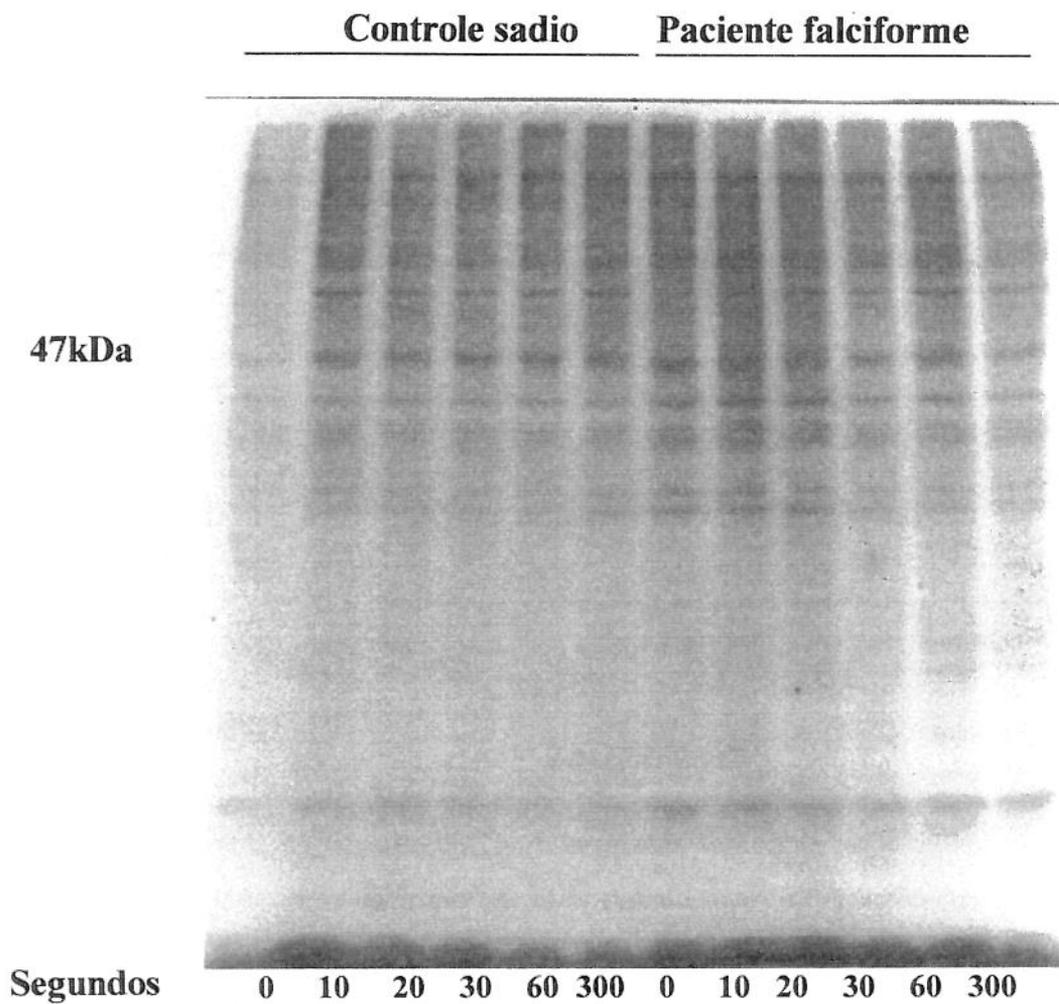


Figura 16. Fotografia representativa da fosforilação de proteínas celulares, obtidas dos leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme e controles sadios, após eletroforese em gel de poliacrilamida e auto-radiografia. Nota-se que nas bandas relativas à massa molecular de 47kDa, houve maior incorporação do ^{32}P nas amostras dos pacientes com anemia falciforme, em todos os tempos, em relação às apresentadas pelos controles sadios.

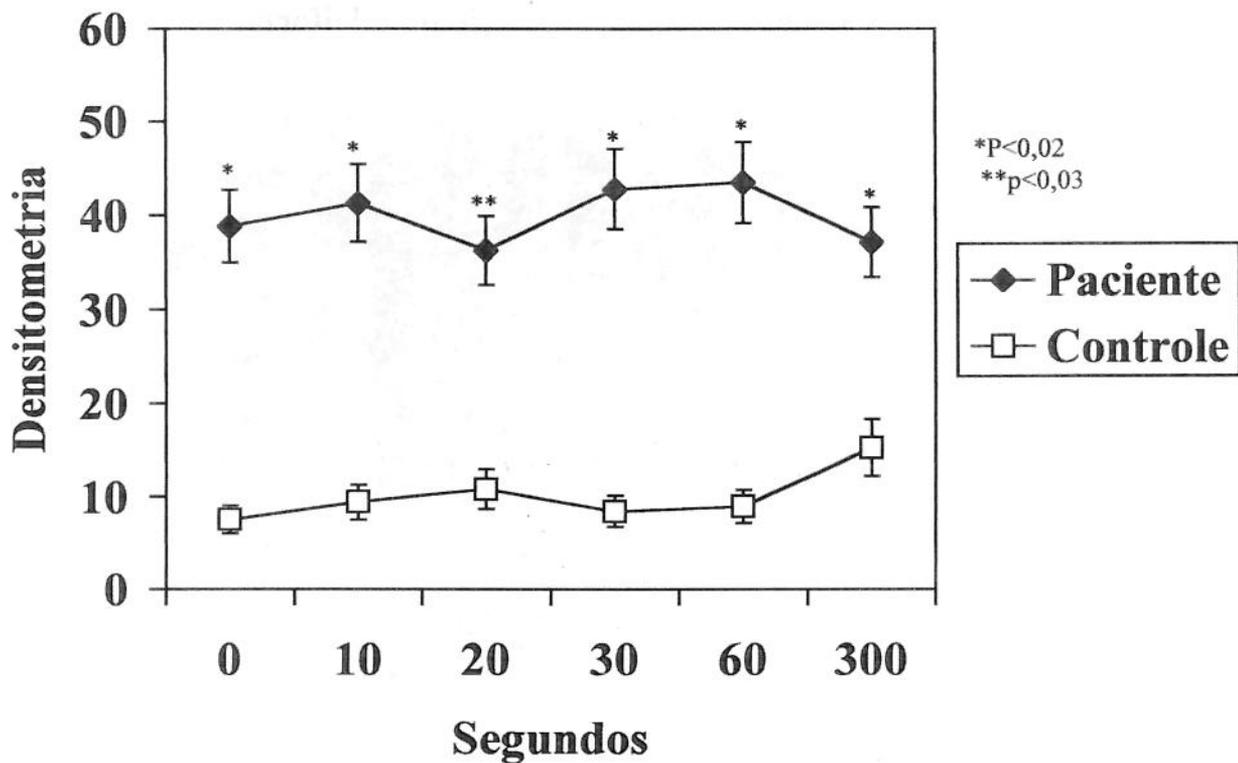


Figura 17. Fosforilação de proteínas celulares de 47kDa dos leucócitos mononucleares (4×10^6 células/ml), de pacientes com anemia falciforme (n=4) e de controles sadios (n=6). A densitometria obtida com a incorporação do ^{32}P , no estado basal (0) e 10, 20, 30, 60 e 300 segundos após estímulo com PMA (30nM), indica que a fosforilação das proteínas celulares dos leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme foi superior a dos controles sadios (* $p < 0,02$ ou ** $p < 0,03$, teste de Mann-Whitney).



5. DISCUSSÃO

O óxido nítrico inibe a agregação plaquetária através de mecanismo dependente do GMPc (RADOMSKI, PALMER, MONCADA, 1987a ; RADOMSKI, PALMER, MONCADA, 1987b). Os resultados mostram claramente que granulócitos de paciente com anemia falciforme liberam óxido nítrico de modo similar aos controles sadios, pois a inibição da agregação de plaquetas lavadas pelos granulócitos de pacientes com anemia falciforme ou de controles sadios é bloqueada por L-NAME, mas não por D-NAME, e é revertida por L-Arginina. Adicionalmente, é similar o número de granulócitos de pacientes com anemia falciforme e de controles sadios requerido para inibir a agregação de plaquetas lavadas.

O superóxido inibe o relaxamento dependente do endotélio pela inativação do óxido nítrico em trânsito (GRYGLEWSKI *et al.*, 1986; RUBANYI & VANHOUTTE, 1986; MONCADA *et al.*, 1986) e é o substrato para a SOD (McCORD & FRIDOVICH, 1969). Nesta pesquisa mostrou-se que a SOD potencializa os efeitos inibitórios dos granulócitos de pacientes com anemia falciforme na agregação plaquetária, indicando claramente que o superóxido interfere na habilidade destas células em inibir a agregação plaquetária.

É notável que a liberação do óxido nítrico pelos leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme, mas não por controles sadios, é detectada somente na presença de SOD. Há que se considerar três fontes de superóxido nos experimentos: plaquetas (JOSEPH *et al.*, 1987), leucócitos (BABIOR, KIPNES, CURNUTTE, 1973) e a solução de Krebs (WARNER, DeNUCCI, VANE, 1989). Considerando que as plaquetas e o tampão utilizados nos ensaios de liberação de óxido nítrico foram idênticos, a única fonte do aumento do superóxido seriam os leucócitos mononucleares, indicando com os achados neste experimento que há maior disponibilidade de superóxido nos leucócitos de pacientes com esta doença, sendo um potencial mecanismo para lesão e inflamação.

Recentes estudos reúnem evidências de que existe na anemia falciforme um estado pró-inflamatório ativado e conseqüente ativação do endotélio, plaquetas e leucócitos, e entre esses, os fagócitos são mecanismos importantes na defesa do organismo contra bactérias, fungos e vírus (BABIOR, 1999), estando ativados nas doenças inflamatórias, com liberação de diversas substâncias, entre elas o superóxido e óxido nítrico (FORMAN & TORRES, 2001).

Os efeitos biológicos do óxido nítrico gerado pelos granulócitos são semelhantes aos do óxido nítrico gerado pelo endotélio (MEHTA *et al.*, 1989; NICOLINI & MEHTA, 1990; MONCADA *et al.*, 1991), sendo uma das ações a inibição de agregação de plaquetas. Nos ensaios desta análise, só houve inibição da agregação plaquetária pelos leucócitos mononucleares quando foi adicionado SOD no sistema, indicando que havia um excesso de superóxido, que inibiu a ação do óxido nítrico. O aumento da liberação do superóxido, pelos leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme, poderia também inibir a ação vasodilatadora do óxido nítrico no endotélio.

O endotélio ocupa uma posição estratégica, pois forma uma barreira de permeabilidade entre as células circulantes e os tecidos subjacentes aos vasos sanguíneos. É composto por fibroblastos e células musculares lisas, estando numa posição capaz de interagir com fatores circulantes e elementos sanguíneos.

O endotélio do paciente com anemia falciforme apresenta comprometimento, já que pela sua interface com as hemácias desoxigenadas-falcizadas é o primeiro local a reagir à obstrução do fluxo sanguíneo (HEBBEL & VERCELLOTTI, 1997), com lesão e inflamação demonstrada pela expressão das moléculas de adesão, ICAM-1, VCAM-1 (SHIU *et al.*, 2000), E-Selectina e P-Selectina (MATSUI *et al.*, 2001) e ativação das células endoteliais circulantes (SOLOVEY *et al.*, 1997) (SOLOVEY *et al.*, 2001)

Nas anomalias endoteliais, a ação do óxido nítrico é de máxima importância e interesse. A ação reguladora do óxido nítrico no controle do tônus vascular ficou evidente quando sua produção endógena foi interrompida ao ser bloqueada a NOsintase, enzima responsável por sua produção, o que induziu a severa hipertensão arterial e permitiu identificar o óxido nítrico como um dos principais mediadores da dilatação vascular dependente do endotélio (RIBEIRO *et al.*, 1992).

Como o óxido nítrico é um potente vasodilatador, a diminuição da sua viabilidade ou produção levaria à vasoconstrição, com aumento da resistência vascular periférica. A diminuição da viabilidade do óxido nítrico poderia ser causada pela degradação acelerada pelos reativos intermediários do oxigênio, pois o óxido nítrico é inativado pelo superóxido e estabilizado pela SOD (RUBANYI & VANHOUTTE, 1986) (OMAR *et al.*, 1991).

Diversas linhas de estudo apontam para a importância do óxido nítrico na doença falciforme. Há elevado nível dos seus metabólitos (REES *et al.*, 1995), e durante as crises, quanto maior a quantidade destes metabólitos, mais grave o quadro clínico (LOPEZ *et al.*, 1996), e quanto menos NO mais intensa a dor (LOPEZ *et al.*, 2000). Há também boa resposta clínica ao uso do óxido nítrico inalado durante as crises (SULLIVAN *et al.*, 1999) e ao uso da hidroxiuréia, que age formando óxido nítrico (ATZ & WESSEL, 1997; GLOVER *et al.*, 1999). Estes dados sugerem que o aumento da atividade do óxido nítrico diminuiria a gravidade clínica, além de diminuir a aderência dos leucócitos e das hemácias ao endotélio (SPACE *et al.*, 2000).

Foi relatada uma instabilidade no endotélio de camundongos transgênicos, usados como modelo de anemia falciforme causada pelo desequilíbrio do sistema óxido nítrico-superóxido (NATH *et al.*, 2000), sugerindo como fontes aumentadas de superóxido: hemácias (HEBBEL, 1990), leucócitos (DIAS-da-MOTTA *et al.*, 1996) (HOFSTRA *et al.*, 1996) e endotélio (SULTANA *et al.*, 1998) nos pacientes com anemia falciforme. Como a HbA e HbS apresentam consumo de óxido nítrico semelhante, este consumo não deve vir diretamente da hemácia falciforme e sim do vaso ou dos leucócitos (ASLAN *et al.*, 2001).

Existe ativação dos leucócitos durante as crises de falcização (LACHANT & OSEAS, 1987) e caso haja interações entre o endotélio e os leucócitos na intercrise é aceitável que isto seja um fator desencadeante das crises de oclusão vascular.

Os resultados indicam claramente que a liberação de superóxido pelos leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme estáveis quando estimulada pelo PMA ou ZYM é significativamente maior quando comparada à de controles sadios, sugerindo que essas células sejam hiper-responsivas. Estes resultados levantam a possibilidade de que pequenas estimulações como a agitação que ocorre durante os ensaios de agregação plaquetária ou durante a circulação *in vivo*, e também as infecções de repetição, a eritrofagocitose aumentada, o estado inflamatório perene, a hipóxia, o contato com as hemácias falciformes e as interleucinas presentes na circulação, possam causar a ativação dos leucócitos mononucleares e a liberação aumentada do superóxido por estes, o que pode inibir a dilatação vascular mediada pelo óxido nítrico. Os leucócitos mononucleares de pacientes falciformes produzem quantidades normais de óxido nítrico

que são potencialmente inativadas pela simultânea liberação de grandes quantidades de superóxido liberadas.

Não foi encontrado aumento da liberação de superóxido pelos granulócitos dos pacientes com anemia falciforme estáveis, quando comparadas a de controles saudáveis. Estes achados foram inesperados, já que estas células apresentam maior capacidade de produção dos reativos intermediários do oxigênio em comparação com os leucócitos mononucleares, porém esses dados são compatíveis com outros trabalhos que estudaram os granulócitos de pacientes falciformes. STRAUSS *et al.* (1976) não encontraram ativação excessiva ao estimular granulócitos de pacientes com anemia falciforme, HAYNES AND OBIAKO (2002) não detectaram ativação da NADPH oxidase em granulócitos que promoveram adesão de hemácias falciformes ao endotélio, e MOLLAPOUR *et al.* (1998) não demonstraram ativação da NADPH-oxidase na intercrise dos falciformes, apesar da maior liberação de fosfolipase A₂. Alguns estudos identificaram alterações na fagocitose e migração leucocitária (BJORNSON & LOBEL, 1987; VILELA *et al.*, 1989; VILELA *et al.*, 1990).

Esta não-demonstração da ativação dos granulócitos poderia dever-se à saída dos granulócitos mais ativados da circulação, como evidenciado por estudos nos quais infusão de citocinas (DEVEREUX *et al.*, 1989) promoveram marginalização e migração dos leucócitos ativados para os tecidos adjacentes. O burst oxidativo nos granulócitos acontece em poucos segundos após o estímulo com PMA, assim, a liberação do superóxido alcançaria rapidamente um “plateau”. (DeLEO *et al.*, 1999) e o desenho deste trabalho levou em consideração a liberação após 60 minutos do estímulo, quando tanto os granulócitos dos controles como os granulócitos do paciente já poderiam ter atingido a liberação máxima de superóxido.

Numa doença na qual há aumento da produção de ânion superóxido, o antagonismo químico entre o óxido nítrico e superóxido pode provocar situações desastrosas, provocando o desequilíbrio entre fatores constritores e relaxadores da vasculatura, afetando profundamente a atividade do óxido nítrico no endotélio (MUGGE *et al.*, 1991) resultando na constrição de células musculares lisas (COSENTINO, SILL, KATUSIC, 1994). Mecanismo semelhante ocorre na hipertensão, na qual, o déficit de óxido

nítrico (PANZA *et al.*, 1993a) (PANZA *et al.*, 1993b) poderia ser explicado pela produção do NO ser próxima ao normal, porém ele (NO) ser inibido rapidamente pelo excesso do superóxido (GRUNFELD *et al.*, 1995) (MONCADA *et al.*, 1991), situação parcialmente revertida em pacientes submetidos à dieta com suplementação de L-Arginina (HISHIKAWA *et al.*, 1992).

Este mesmo mecanismo está presente na anemia falciforme. Relevante para estas considerações seria o fato de que num modelo de camundongo falciforme, ao ser administrado L-NAME, inibidor do óxido nítrico, ocorreu um aumento da pressão sistólica de cinco vezes (NATH *et al.*, 2000), sugerindo uma hipereexpressão de fatores vasoconstritores e demonstrando que a disfunção endotelial encontrada nos pacientes falciformes seria causada por uma excessiva degradação do óxido nítrico recentemente formado.

Na hipertensão humana há um aumento da produção do superóxido pelos leucócitos (MEHTA *et al.*, 1994). O aumento de superóxido pelos leucócitos mononucleares de pacientes falciformes foi observado (DIAS-da-MOTTA *et al.*, 1996), sugerindo uma alteração comum nas fisiopatologias, sendo a excessiva produção do superóxido a base para a reduzida atividade do óxido nítrico, contribuindo com a conseqüente disfunção endotelial encontrada nestas doenças.

Uma outra conseqüência da interação do óxido nítrico e superóxido seria a formação do peroxinitrito (ONOO⁻), modulada pela concentração da SOD, que converte superóxido em H₂O₂. (BECKMAN *et al.*, 1990). A reação entre superóxido e óxido nítrico ocorre rapidamente, numa taxa de $6,7 \times 10^9 \text{ mol l}^{-1}$. (THOMSON *et al.*, 1995), e é três vezes mais rápida do que a reação entre superóxido e SOD, com isso, há sempre superóxido reagindo com óxido nítrico. Dentro das condições fisiológicas, o sistema anti-oxidante minimiza estas alterações e mantém o ténue equilíbrio entre superóxido e óxido nítrico, que pode ser rompido quando há um excesso de superóxido. A produção aumentada e persistente do peroxinitrito causa perturbação das funções fisiológicas, induz dano oxidativo ao DNA, lipídeos e células vasculares, com conseqüente disfunção vascular (BALLINGER *et al.*, 2000), além de causar agregação de plaquetas lavadas e favorecer a reação de Haber-Weiss e Fenton com a formação do radical hidroxila (KANNER, HAREL, GRANIT, 1991), muito mais reativo e deletério do que o superóxido.

Os leucócitos, por produzirem grandes quantidades de reativos intermediários do oxigênio, deveriam ter o sistema antioxidante proporcionalmente induzido para evitar sua auto-oxidação. Neste trabalho não se conseguiu demonstrar diferenças significativas entre a atividade das enzimas superóxido dismutase e glutathione peroxidase celulares nos leucócitos de pacientes com anemia falciforme, comparadas aos de controles sadios, indicando que não há aumento proporcional do sistema antioxidante nesta doença.

Pequenas doses de reativos intermediários do oxigênio são indispensáveis para muitos processos biológicos como imunidade, sinais intracelulares, apoptose, e defesa contra microorganismos (SAHNOUN *et al.*, 1998; SUZUKI *et al.*, 1997), mas, quando não controlados, afetam processos biológicos que levam a disfunções orgânicas, e a função do sistema antioxidante é retirá-los, antes que formem compostos mais reativos, que vão ocasionar severos danos aos tecidos adjacentes.

A produção aumentada de superóxido, combinada com capacidade diminuída do sistema antioxidante, pode contribuir para o desenvolvimento de doenças vasculares, que incluem: aterosclerose (IDE *et al.*, 2002), hipertensão arterial sistêmica (MEHTA *et al.*, 1994), complicações do diabetes (COSENTINO *et al.*, 1997) e síndrome da isquemia seguida da reperfusão (YOUNG, IKEDA, LEFER, 2001), esta última presente e característica da doença falciforme.

Numa doença como a anemia falciforme que tem dano oxidativo aumentado, sem um aumento proporcional do sistema antioxidante para suportar o excesso do metabolismo aeróbico, há a possibilidade de um desequilíbrio entre os sistemas de constrição e dilatação vascular nestes pacientes. Estudos têm demonstrado que a biodisponibilidade dos ROS e o conseqüente tônus vascular é modulado por sistemas protetores como o da SOD (RUBANYI & VANHOUTTE, 1986) pois, ao se promover a inativação da SOD, há inibição do relaxamento mediado por óxido nítrico, indicando que quando há menos SOD há aumento proporcional de superóxido (STRALIN & MARKLUND, 1994). A não elevação da atividade da SOD em pacientes falciformes resulta na maior formação do peroxinitrito, vasodilatador muito menos potente que o óxido nítrico, com todas as conseqüências já descritas anteriormente.

Na anemia falciforme há evidências da presença de episódios de oclusão vascular subclínica, proporcionando hipóxia aos tecidos que, após resolução, volta a ser oxigenado, proporcionando a síndrome da reperfusão, na qual há rápido fluxo de superóxido nos tecidos, liberado em grande parte pela rápida entrada dos leucócitos no tecido isquêmico (HERNANDEZ *et al.*, 1987; HORIE *et al.*, 1998; HU *et al.*, 2002).

O stress oxidativo tem importante participação na disfunção endotelial pós-isquemia, com aumento de oxidantes documentado na aorta (ZWEIER *et al.*, 1994) e veia umbilical humana (MICHIELS *et al.*, 1992), além da perda do relaxamento das artérias coronárias caninas após oclusão seguida de reperfusão, devido à diminuição da reserva vasodilatadora (VANE, ANGGARD, BOTTING, 1990). O sistema antioxidante tem função importante na proteção do endotélio na reperfusão. Protetores contra radicais livres diminuem a adesão de leucócitos no endotélio após oclusão arterial seguida de reperfusão (KUROSE *et al.*, 1997), camundongos transgênicos que hiperexpressam CuZn SOD têm menos acúmulo de leucócitos após oclusão da artéria mesentérica e posterior reperfusão (HORIE *et al.*, 1998) e a SOD aumenta a sobrevivência de tecidos isquêmicos (ABLOVE *et al.*, 1996).

Os episódios de oclusão vascular subclínica e conseqüente hipóxia-reperfusão podem ser agravados com a incapacidade do aumento do sistema antioxidante nos pacientes falciformes, promovendo desequilíbrio entre a biodisponibilidade do óxido nítrico e superóxido, podendo ser um fator de risco para as crises de oclusão vascular.

Não só o superóxido, mas também o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produz efeitos deletérios tanto na vasculatura, como nos tecidos adjacentes. Neste trabalho se não verificou aumento da atividade da glutathione peroxidase intraleucocitária proporcional ao aumento do sistema oxidante, o que leva ao acúmulo de H_2O_2 e, como conseqüência, seus efeitos na regulação do balanço redutor/oxidante regional, interferindo na adequada função de algumas células. Peróxido de hidrogênio induz à expressão da ICAM-1 (D'ANNA *et al.*, 2001), cuja expressão envolve a participação do NF κ B e o ativa diretamente (GILSTON *et al.*, 2001). A glutathione peroxidase parece ter uma participação na regulação da modulação do NF κ B, pois a ativação do mesmo é inibida em células com complementação

de selênio e facilitada quando ocorre deficiência de selênio (MAKROPOULOS, BRUNNING, SCHULZE-OSTHOFF, 1996), além de mimetizadores da glutathione peroxidase protegerem o endotélio de alterações provocadas pelos granulócitos, induzida pelo TNF- α , por inibição da transcrição da E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1 (MOUTET *et al.*, 1998).

Recentemente, foi proposto que a glutathione peroxidase poderia catalisar a redução do peroxinitrito (SIES & ARTEEL, 2000), porém pode ser inativada pelo superóxido (BLUM & FRIDOVICH, 1985), o que a faz ter uma ação limitada nas situações em que haja excesso de superóxido.

A hiperexpressão da SOD extracelular melhora a função do endotélio em comundongos com hipertensão, por aumentar a atividade do óxido nítrico, o que não acontece com a hiperexpressão da MnSOD, indicando que o superóxido passa por compartimentos quando não é inativado intracelularmente (FENNELL *et al.*, 2002).

Não somente o aumento da produção do superóxido pelos leucócitos mononucleares ativados, mas também a mobilidade deste entre compartimentos e sua difusão nos tecidos e células adjacentes, além da incapacidade das enzimas do sistema antioxidante de penetrarem nas células para inativá-lo (FENNELL *et al.*, 2002), faz com que o excesso do superóxido produza efeitos vasculares nefastos na anemia falciforme.

Os resultados obtidos nos ensaios da liberação do superóxido indicaram que os leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme liberaram mais superóxido. O mesmo não foi observado em relação aos granulócitos. Em vista destes resultados, optou-se por investigar o sistema NADPH-oxidase somente dos leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme.

Neste trabalho focalizou-se a atenção no sistema NADPH-oxidase e para estudar-se a expressão dos seus componentes em pacientes com anemia falciforme na intercrise, investigou-se a expressão do RNA mensageiro dos componentes gp91^{-phox}, p22^{-phox}, p67^{-phox}, proteínas envolvidas na ativação do sistema, utilizando-se do método quantitativo-relativo e da reação RT-PCR.

O RT-PCR é uma ferramenta utilizada para verificar a expressão dos genes, tendo grande sensibilidade e potência, porém, caso ocorram variações entre amostras, o resultado não se torna confiável e as comparações inviáveis. Na técnica adotada neste trabalho, esse inconveniente foi contornado ao serem executadas reações contendo, além da amostra-alvo, um controle interno, garantindo um resultado comparável entre amostras, mesmo que ocorresse alguma variação entre elas, pois o resultado da amplificação da amostra é dividido pelo resultado do controle, obtendo-se uma razão que é tomada para comparações (LEE *et al.*, 1996; PALLANSCH *et al.*, 1990).

Neste trabalho encontrou-se uma expressão aumentada do RNA mensageiro do componente gp91^{phox} nos leucócitos mononucleares dos pacientes com anemia falciforme e expressão das demais proteínas do sistema comparável com as dos controles sadios.

O citocromo *b*₅₅₈, é o componente central da NADPH-oxidase e aparenta possuir todo o aparato da cadeia de transporte do elétron (BABIOR, 1999), sua ausência é a forma mais freqüente da DGC, principalmente da subunidade gp91^{phox}, mas a presença das duas subunidades é essencial para a estabilidade do conjunto (DeLEO *et al.*, 2000). Acredita-se que a p22^{phox} atue como uma ponte entre os fatores do citosol e a gp91^{phox} (DAHAN *et al.*, 2002). A proteína gp 91^{phox} parece ser o componente mais induzível e regulável do sistema (NEWBURGER, DAÍ, WHITNEY, 1991) e por isso é mais estudada, sendo interessante lembrar que pacientes com DGC ligada ao sexo geralmente apresentam quadro clínico mais grave que os portadores da forma autossômica da doença (FORREST, FOREHAND, AXTELL, 1988; LIESE *et al.*, 2000), a qual se deve mais freqüentemente a defeitos na p47^{phox}, fato esse que confirma a importância da expressão do gene da gp91^{phox} no estado de ativação do sistema e corrobora com os achados da presente pesquisa.

Não se registrou diferença significativa na expressão da proteína p22^{phox} entre os pacientes e controles sadios, conforme Fig 14. O componente p22^{phox} localiza-se na membrana formando o citocromo *b*₅₅₈, sua deficiência na DGC é rara, ao redor de 3%, e sua expressão é menos induzida do que o outro componente do citocromo *b*₅₅₈ (NEWBURGER *et al.*, 1991).

Ao se estudar a expressão do RNA mensageiro do componente p67^{phox} notou-se que não foi achada diferença estatisticamente significativa da sua expressão entre pacientes com anemia falciforme e controles saudáveis, como mostra a Fig 15.

A função do p67^{phox} é controversa no sistema NADPH-oxidase. Granulócitos com deficiência da p67^{phox} transferem p47^{phox} normalmente para a membrana (HEYWORTH *et al.*, 1991), porém a sua presença é indispensável para a atividade da oxidase. Sua fosforilação é verificada quando granulócitos são estimulados (BENNA *et al.*, 1997), sendo que somente ao redor de 5% da p67^{phox} presente no citosol transloca-se para a membrana durante a ativação da oxidase (QUINN *et al.*, 1993; El BENNA, RUEDI, BABIOR, 1994), onde, mesmo em pequenas quantidades consegue ativar a oxidase de uma forma catalítica (CROSS *et al.*, 1999).

Não se estudou a expressão do RNA mensageiro do componente p40^{phox}. Não se conhece nenhum paciente com DGC que não tenha expressão desta proteína, e sua ação neste sistema seria ainda somente especulativa.

A maior expressão do RNA mensageiro da gp91^{phox}, encontrada nos leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme, indica hiper-regulação transcricional da síntese da proteína gp91^{phox}, que é a proteína mais induzível do sistema NADPH-oxidase, proporcionando maior liberação de superóxido pelos pacientes, podendo participar da fisiopatologia e da inflamação na anemia falciforme, pois os reativos intermediários do oxigênio, além da sua direta ação tóxica nos tecidos, pode também iniciar e amplificar a inflamação através da hiper-regulação de diferentes genes envolvidos na resposta inflamatória, mediante a ativação do fator transcricional NFκB (SCHRECK, RIEBER, BAEUERLE, 1991; SCHMIDT *et al.*, 1995)

O NFκB é um promotor da transcrição e como tal participa da iniciação transcricional dos genes e, como consequência, da síntese de novas proteínas. Foi o primeiro fator transcricional descrito como responsivo diretamente ao stress oxidativo (BAEUERLE & HENKEL, 1994); é um complexo heterodímero, originalmente identificado em células B, composto por cinco subunidades, p50, p65, RelB, c-Rel e p52. Como característica, sua ativação não requer síntese de novas proteínas, pois em células em

repouso, ele está ligado à proteína inibitória chamada I κ B, que mantém o complexo no citoplasma, prevenindo a ligação com o DNA. A ativação do NF κ B envolve a fosforilação e proteólise do I κ B, com dissociação deste do complexo NF κ B / I κ B, permitindo sua translocação para o núcleo, onde vai ligar-se à sua seqüência no DNA. Isto é bem demonstrado pois a ativação do NF κ B coincide com a proteólise do I κ B e vários inibidores da protease previnem a sua ativação (TRAENCKNER, WILK, BAEUERLE, 1994).

O NF κ B é um fator regulador de diversos genes envolvidos na resposta imune e inflamatória (BAEUERLE & HENKEL, 1994; SIEBENLIST, FRANZOSO, BROWN, 1994), como: a IL-2, IL-6, TNF- α , e dos genes envolvidos na adesão como: E-Selectina, ICAM-1, VCAM, que são responsáveis pela adesão dos leucócitos ao endotélio, facilitando sua migração aos locais de inflamação.

Muitos dos agentes que levam à ativação do NF κ B levam também à formação dos reativos intermediários do oxigênio e, em diversas células, a rápida formação dos reativos intermediários do oxigênio induz a formação do NF κ B (SCHRECK *et al.*, 1991), sugerindo um circuito auto-regulatório positivo em condições patológicas, além de que, os reativos intermediários do oxigênio podem atuar no processo de ativação como um segundo mensageiro.

A expressão de genes induzidos por NF κ B são de relevância em doenças causadas por aumento na formação de reativos intermediários da oxigênio (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990), incluindo choque séptico, doenças inflamatórias crônicas e isquemia-reperfusão.

Numa doença como a anemia falciforme com inflamação subclínica, episódios constantes de hipóxia-reperfusão, com indução de moléculas de adesão, é esperado que haja aumento na expressão do NF κ B, com participação dos oxidantes produzidos pelos leucócitos, conforme comprovado em estudo envolvendo interações entre leucócitos mononucleares de pacientes falciformes e culturas de células de veia umbilical humana, no qual demonstrou-se que os leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme estão ativados e podem aumentar a oclusão vascular através de um processo inflamatório

mediado pelo fator NFκB hiper-regulado pelas moléculas de adesão e fator tissular na superfície da célula endotelial (BELCHER *et al.*, 2000), e também, no estudo em que a aderência das hemácias falciformes ao endotélio induziu o dano oxidativo, translocação do fator NFκB e migração transendotelial de leucócitos mononucleares (SULTANA *et al.*, 1998).

A interdependência entre NFκB e reativos intermediários do oxigênio na fisiopatologia das crises de oclusão vascular que ocorrem na anemia falciforme é sustentada também pela semelhança dos mecanismos que os ativam. Vários estímulos patogênicos ou pró-inflamatórios como LPS, infecção viral, citocinas IL-1 e TNF-α, rapidamente levam à ativação do NFκB, assim como desencadeiam as crises de espasmo vascular nos pacientes com anemia falciforme.

As crises de oclusão vascular são sempre acompanhadas por hipóxia, de diferentes magnitudes, e sempre seguidas de reperfusão, quando ocorre intensa migração de leucócitos (HERNANDEZ *et al.*, 1987) e produção de grandes quantidades de reativos intermediários do oxigênio, com potencial estímulo para a ativação do NFκB, como visto em estudos nos quais o NFκB foi extrema e rapidamente ativado em células submetidas à hipóxia (KOONG, CHEN, GIACCIA, 1994), quando células hipóxicas foram reexpostas ao oxigênio (RUPEC & BAEUERLE, 1995; KOKURA *et al.*, 2001), e outro no qual a veia umbilical humana submetida à hipóxia, e em contato com hemácias falciformes, promoveu indução do fator NFκB (SULTANA *et al.*, 1999), além da hiperexpressão, após reperfusão, de genes pró-inflamatórios que codificam TNF-α, IL-1 e ICAM-1.

Uma segunda linha de evidência para a idéia da ativação do NFκB estar relacionado à formação dos reativos intermediários do oxigênio recai sobre estudos envolvendo o sistema antioxidante, pois numerosos trabalhos mostram que há prevenção (SCHRECK *et al.*, 1992), e até mesmo supressão (SCHRECK *et al.*, 1991; SCHRECK *et al.*, 1992; FERRAN *et al.*, 1995) da sua ativação quando células são pré-tratadas com compostos antioxidantes. O mesmo aconteceu com a expressão dos genes de proteínas que codificam TNF-α, IL-1 e ICAM-1 (FERRAN *et al.*, 1995), que são ativados pelo NFκB. Células que hiperexpressam antioxidantes também têm ativação do NFκB comprometida (SCHENK *et al.*, 1994).

A metodologia empregada para se estudar a expressão dos RNA mensageiros dos componentes do sistema NADPH-oxidase dos leucócitos mononucleares não pode ser utilizada em relação ao componente p47^{phox}. O gene NCF1, que codifica a p47^{phox}, tem um pseudogene, que é 98,6% homólogo a ele e localiza-se na mesma região do cromossomo 7q11.23 (GORLACH *et al.*, 1997; CHANOCK *et al.*, 2000). Devido à esta grande homologia entre o gene NCF1 e seu pseudogen, é muito difícil o estudo do RNA mensageiro utilizando-se a técnica do RT-PCR (DEKKER, DE BOER, ROOS, 2001). Estudos que utilizaram a técnica do RT-PCR ao estudar a p47^{phox} utilizaram-se do “*nested PCR*” (VAZQUEZ *et al.*, 2001), o que impossibilitaria o uso da técnica da quantificação relativa inicialmente proposta.

Foi utilizada outra técnica, que indica indiretamente o estado de ativação da proteína p47^{phox}, através do estudo da fosforilação das proteínas celulares dos leucócitos mononucleares de pacientes falciformes em comparação com a fosforilação das mesmas proteínas de controles sadios.

Os experimentos mostraram que na banda compatível com 47kDa houve maior incorporação do fósforo nos leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme em todos os momentos, quando comparada a dos controles sadios, indicando que a fosforilação dos mesmos é mais intensa e estão mais ativados.

Alterações na atividade do sistema NADPH-oxidase estão relacionados à fosforilação de proteínas citoplasmáticas com massa molecular ao redor de 47kDa (KREBS & BEAVO, 1979; HAYAKAWA *et al.*, 1986), com incorporação de fosfato quando os granulócitos ficam ativados e perda deles quando as células voltam ao estado inativo (HAYAKAWA *et al.*, 1986), não sendo verificada esta fosforilação em pacientes portadores de doença granulomatosa crônica (HAYAKAWA *et al.*, 1986; OKAMURA *et al.*, 1988), o que indica a importância desta fosforilação na ativação do sistema.

O componente citosólico p47^{phox} é a subunidade responsável pela translocação do complexo formado pelas proteínas citoplasmáticas para a membrana durante a ativação da oxidase. Isto torna-se evidente na medida em que granulócitos que não contêm esta proteína são incapazes de transferir o restante do complexo (HEYWORTH *et al.*, 1991).

Antes de haver a migração do complexo citosólico para a membrana, há intensa fosforilação da p47^{phox}, sendo um dos eventos característicos da ativação da oxidase. Esta fosforilação pode ser dividida em três eventos sucessivos: fosforilação parcial da p47^{phox}, translocação da p47^{phox} e demais componentes citosólicos para membrana e a fosforilação final da p47^{phox} com aquisição da atividade do sistema NADPH-oxidase. Nas etapas iniciais de ativação, a p47^{phox} sofre fosforilação em nove resíduos de serina na seqüência C-terminal, em particular nos resíduos S359 e S370, cuja fosforilação é necessária para a ativação (JOHNSON *et al.*, 1998), seguida pelo resíduo S379, necessária para a translocação e ativação da oxidase e finalmente a fosforilação dos resíduos 303 e 304 (EL BENNA *et al.*, 1994; INANAMI *et al.*, 1998), cuja mutação resulta em diminuição da atividade da oxidase sem afetar a translocação (INANAMI *et al.*, 1998). A fosforilação da p47^{phox} é regulada pela proteína quinase A. Apesar de sua deficiência causar uma das formas de doença granulomatosa crônica, sua presença não é absolutamente indispensável para a atividade da oxidase, como demonstrado em estudos com sistemas livres de células, nos quais foi adicionado o citocromob₅₅₈ purificado e fatores citosólicos isolados. A ausência da p47^{phox} não impediu a formação do superóxido, sendo sua principal ação aumentar em 100 vezes o acoplamento dos outros fatores citosólicos para a ativação da oxidase (HEYWORTH *et al.*, 1991).



6. *CONCLUSÃO*

Os resultados dos trabalhos demonstraram que, nos pacientes com anemia falciforme homocigotos, estáveis e fora de crises, seus leucócitos mononucleares e granulócitos liberam óxido nítrico em quantidade similar aos dos controles sadios; seus leucócitos mononucleares produzem mais superóxido *in vitro*, quando estimulados com PMA ou ZYM do que leucócitos mononucleares de controles sadios; seus leucócitos mononucleares e granulócitos apresentam atividades da SOD e da GSH-Px celulares semelhantes aos dos controles sadios; seus leucócitos mononucleares expressam mais o gene que codifica o componente gp91^{phox} do sistema NADPH-oxidase do que leucócitos mononucleares de controles sadios, e que seus leucócitos mononucleares têm a fosforilação das proteínas celulares de peso 47kDa mais intensa do que a de controles sadios.

Considerando que na anemia falciforme há múltiplos fatores desencadeantes para as crises, indícios de inflamação crônica, lesão endotelial e ativação dos leucócitos mononucleares, conclui-se que a maior liberação de superóxido e a ativação de componentes do sistema NADPH-oxidase, sem aumento proporcional do sistema antioxidante, em leucócitos mononucleares de pacientes com anemia falciforme podem resultar, pelo menos em parte, na inativação do óxido nítrico, constituindo-se um fator de risco para as crises de oclusão vascular e perpetuação do ciclo vicioso: isquemia - lesão endotelial - inflamação crônica - lesão tecidual.



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABLOVE, R. H.; MOY, O. J.; PEIMER, C. A.; SEVERIN, C. M. ; SHERWIN, F. M. - Effect of high-energy phosphates and free radical scavengers on replant survival in an ischemic extremity model. **Microsurgery** 17: 481-6, 1996.

ADLER, V.; YIN, Z.; TEW, K. D.; RONAI, Z. - Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. **Oncogene** 18: 6104-11, 1999.

ALVARES FILHO, F.; NAOUM, P. C.; MOREIRA, H. W.; CRUZ, R.; MANZATO, A. J.; DOMINGOS, C. R. - [Age and racial geographic distribution of S hemoglobin in Brazil]. **Sangre (Barc)** 40: 97-102, 1995.

ARKIN, S.; NAPRSTEK, B.; GUARINI, L.; FERRONE, S.; LIPTON, J. M. - Expression of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) on hematopoietic progenitors. **Blood** 77: 948-53, 1991.

ASAKURA, T.; MATTIELLO, J. A.; OBATA, K.; ASAKURA, K.; REILLY, M. P.; TOMASSINI, N.; SCHWARTZ, E.; OHENE-FREMPOG, K. - Partially oxygenated sickled cells: sickle-shaped red cells found in circulating blood of patients with sickle cell disease. **Proc Natl Acad Sci U S A** 91: 12.589-93, 1994.

ASLAN, M.; RYAN, T. M.; ADLER, B.; TOWNES, T. M.; PARKS, D. A.; THOMPSON, J. A.; TOUSSON, A.; GLADWIN, M. T.; PATEL, R. P.; TARPEY, M. M.; BATINIC-HABERLE, I.; WHITE, C. R.; FREEMAN, B. A. - Oxygen radical inhibition of nitric oxide-dependent vascular function in sickle cell disease. **Proc Natl Acad Sci U S A** 98: 15.215-20, 2001.

ATZ, A. M. & WESSEL, D. L. - Inhaled nitric oxide in sickle cell disease with acute chest syndrome. **Anesthesiology** 87: 988-90, 1997.

BABIOR, B. M. - NADPH oxidase: an update. **Blood** 93: 1.464-76, 1999.

BABIOR, B. M.; CURNUTTE, J. T.; MCMURRICH, B. J. - The particulate superoxide-forming system from human neutrophils. Properties of the system and further evidence supporting its participation in the respiratory burst. **J Clin Invest** 58: 989-96, 1976.

- BABIOR, B. M.; KIPNES, R. S.; CURNUTTE, J. T. - Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. **J Clin Invest** **52**: 741-4, 1973.
- BABIOR, B. M.; LAMBETH, J. D.; NAUSEEF, W. - The neutrophil NADPH oxidase. **Arch Biochem Biophys** **397**: 342-4, 2002.
- BABIOR, B. M. & PETERS, W. A. - The O₂--producing enzyme of human neutrophils. Further properties. **J Biol Chem** **256**: 2.321-3, 1981.
- BADWEY, J. A. & KARNOVSKY, M. L. - Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. **Annu Rev Biochem** **49**: 695-726, 1980.
- BAEHNER, R. L.; BOXER, L. A.; ALLEN, J. M.; DAVIS, J. - Autooxidation as a basis for altered function by polymorphonuclear leukocytes. **Blood** **50**: 327-35, 1977.
- BAEHNER, R. L.; KUNKEL, L. M.; MONACO, A. P.; HAINES, J. L.; CONNEALLY, P. M.; PALMER, C.; HEEREMA, N.; ORKIN, S. H. - DNA linkage analysis of X chromosome-linked chronic granulomatous disease. **Proc Natl Acad Sci U S A** **83**: 3.398-401, 1986.
- BAEUEERLE, P. A. & HENKEL, T. - Function and activation of NF-kappa B in the immune system. **Annu Rev Immunol** **12**: 141-79, 1994.
- BAKER, R. D.; BAKER, S. S.; LAROSA, K.; WHITNEY, C.; NEWBURGER, P. E. - Selenium regulation of glutathione peroxidase in human hepatoma cell line Hep3B. **Arch Biochem Biophys** **304**: 53-7, 1993.
- BAKER, S. S. & COHEN, H. J. - Altered oxidative metabolism in selenium-deficient rat granulocytes. **J Immunol** **130**: 2.856-60, 1983.
- BALLINGER, S. W.; PATTERSON, C.; YAN, C. N.; DOAN, R.; BUROW, D. L.; YOUNG, C. G.; YAKES, F. M.; VAN HOUTEN, B.; BALLINGER, C. A.; FREEMAN, B. A.; RUNGE, M. S. - Hydrogen peroxide- and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. **Circ Res** **86**: 960-6, 2000.

BECKMAN, J. S.; BECKMAN, T. W.; CHEN, J.; MARSHALL, P. A.; FREEMAN, B. A.
- Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc Natl Acad Sci U S A 87**: 1.620-4, 1990.

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 vaso-occlusion. **Blood 96**: 2.451-9, 2000.

BENNA, J. E.; DANG, P. M.; GAUDRY, M.; FAY, M.; MOREL, F.; HAKIM, J. and GOUGEROT-POCIDALO, M. A. - Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p67(phox) during human neutrophil activation. Regulation by protein kinase C-dependent and independent pathways. **J Biol Chem 272**: 17.204-8, 1997.

BEUTLER E. Glutathione peroxidase. In: **Red Cell Metabolism: a manual of biochemical methods**. New York: Grune & Stratton, p.74-6, 1975.

BJORNSON, A. B.& LOBEL, J. S. - Direct evidence that decreased serum opsonization of *Streptococcus pneumoniae* via the alternative complement pathway in sickle cell disease is related to antibody deficiency. **J Clin Invest 79**: 388-98, 1987.

BLUM, J.& FRIDOVICH, I. - Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. **Arch Biochem Biophys 240**: 500-8, 1985.

BREDT, D. S.& SNYDER, S. H. - Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. **Proc Natl Acad Sci U S A 87**: 682-5, 1990.

BUSSE, R.& MULSCH, A. - Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. **FEBS Lett 275**: 87-90, 1990.

CHADA, S.; WHITNEY, C.; NEWBURGER, P. E. - Post-transcriptional regulation of glutathione peroxidase gene expression by selenium in the HL-60 human myeloid cell line. **Blood 74**: 2.535-41, 1989.

CHANOCK, S. J.; ROESLER, J.; ZHAN, S.; HOPKINS, P.; LEE, P.; BARRETT, D. T.; CHRISTENSEN, B. L.; CURNUTTE, J. T.; GORLACH, A. - Genomic structure of the human p47-phox (NCF1) gene. **Blood Cells Mol Dis** **26**: 37-46, 2000.

CHARTRAIN, N. A.; GELLER, D. A.; KOTY, P. P.; SITRIN, N. F.; NUSSLER, A. K.; HOFFMAN, E. P.; BILLIAR, T. R.; HUTCHINSON, N. I.; MUDGETT, J. S. - Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. **J Biol Chem** **269**: 6.765-72, 1994.

CHIEN, S.; USAMI, S.; BERTLES, J. F. - Abnormal rheology of oxygenated blood in sickle cell anemia. **J Clin Invest** **49**: 623-34, 1970.

CHIRGWIN, J. M.; PRZYBYLA, A. E.; MACDONALD, R. J.; RUTTER, W. J. - Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. **Biochemistry** **18**: 52.94-9, 1979.

CHU, F. F.; DOROSHOW, J. H.; ESWORTHY, R. S. - Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. **J Biol Chem** **268**: 2.571-6, 1993.

CLARK, M. R.; MOHANDAS, N.; SHOHET, S. B. - Deformability of oxygenated irreversibly sickled cells. **J Clin Invest** **65**: 189-96, 1980.

COHEN, H. J. & CHOVANIC, M. E. Superoxide release measured continuously at 37°C by following SOD-inhibitable reduction of ferricytochrome C at 550 nm. **J. Clin. Invest.**, **61**: 1.081-5, 1978.

COSENTINO, F.; HISHIKAWA, K.; KATUSIC, Z. S.; LUSCHER, T. F. - High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. **Circulation** **96**: 25-8, 1997.

COSENTINO, F.; SILL, J. C.; KATUSIC, Z. S. - Role of superoxide anions in the mediation of endothelium-dependent contractions. **Hypertension** **23**: 229-35, 1994.

CROIZAT, H. - Circulating cytokines in sickle cell patients during steady state. **Br J Haematol** **87**: 592-7, 1994.

CROSS, A. R.; ERICKSON, R. W.; CURNUTTE, J. T. - The mechanism of activation of NADPH oxidase in the cell-free system: the activation process is primarily catalytic and not through the formation of a stoichiometric complex. **Biochem J** **341 (Pt 2)**: 251-5, 1999.

DAHAN, I.; ISSAEVA, I.; GORZALCZANY, Y.; SIGAL, N.; HIRSHBERG, M.; PICK, E. - Mapping of functional domains in the p22(phox) subunit of flavocytochrome b(559) participating in the assembly of the NADPH oxidase complex by "peptide walking". **J Biol Chem** **277**: 8.421-32, 2002.

D'ANNA, R.; LE BUANEC, H.; BIZZINI, B.; BURNY, A.; GIANNOULI, C.; ZAGURY, J. F.; GALLO, R. C.; ZAGURY, D.; D'ALESSIO, P. - Human papillomavirus-16-E7 oncoprotein enhances the expression of adhesion molecules in cervical endothelial cells but not in human umbilical vein endothelial cells. **J Hum Virol** **4**: 85-95, 2001.

DE PAIVA E SILVA, R. B.; RAMALHO, A. S.; CASSORLA, R. M. - [Sickle cell disease as a public health problem in Brazil]. **Rev Saúde Pública** **27**: 54-8, 1993.

DEAGEN, J. T.; BUTLER, J. A.; ZACHARA, B. A.; WHANGER, P. D. - Determination of the distribution of selenium between glutathione peroxidase, selenoprotein P, and albumin in plasma. **Anal Biochem** **208**: 176-81, 1993.

De DUVE C. - A re-examination of the physiological role of peroxisomes. In **Tocopherol; oxygen and biomembranes**; ed. by C. de Duve and O. Hayashi;; Elsevier; Amsterdam; 1978, pp. 351-61.

DEKKER, J.; DE BOER, M.; ROOS, D. - Gene-scan method for the recognition of carriers and patients with p47(phox)-deficient autosomal recessive chronic granulomatous disease. **Exp Hematol** **29**: 1.319-25, 2001.

DeLEO, F. R.; ALLEN, L. A.; APICELLA, M.; NAUSEEF, W. M. - NADPH oxidase activation and assembly during phagocytosis. **J Immunol** **163**: 6.732-40, 1999.

DeLEO, F. R.; BURRITT, J. B.; YU, L.; JESAITIS, A. J.; DINAUER, M. C.; NAUSEEF, W. M. - Processing and maturation of flavocytochrome b558 include incorporation of heme as a prerequisite for heterodimer assembly. **J Biol Chem** **275**: 13.986-93, 2000.

DEVEREUX, S.; BULL, H. A.; CAMPOS-COSTA, D.; SAIB, R.; LINCH, D. C. - Granulocyte macrophage colony stimulating factor induced changes in cellular adhesion molecule expression and adhesion to endothelium: in-vitro and in-vivo studies in man. **Br J Haematol** **71**: 323-30, 1989.

DIAS-da-MOTTA, P.; ARRUDA, V. R.; MUSCARA, M. N.; SAAD, S. T.; DE NUCCI, G.; COSTA, F. F.; CONDINO-NETO, A. - The release of nitric oxide and superoxide anion by neutrophils and mononuclear cells from patients with sickle cell anaemia. **Br J Haematol** **93**: 333-40, 1996.

DIEKMANN, D.; ABO, A.; JOHNSTON, C.; SEGAL, A. W.; HALL, A. - Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity. **Science** **265**: 531-3, 1994.

DIGGS, L. M. - Anatomic lesions in sickle cell disease. In: **Sickle cell disease: diagnosis, management, education and research**. Eds Abramson H, Bertles J.F, Wethers, D. L. St. Louis, p 189-229, 1973.

DUPUY, C.; OHAYON, R.; VALENT, A.; NOEL-HUDSON, M. S.; DEME; D.; VIRION; A. - Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cDNAs. **J Biol Chem** **274**: 37.265-9, 1999.

DYKES, G. W.; CREPEAU, R. H.; EDELSTEIN, S. J. - Three-dimensional reconstruction of the 14-filament fibers of hemoglobin S. **J Mol Biol** **130**: 451-72, 1979.

EATON, W. A.& HOFRICHTER, J. - Hemoglobin S gelation and sickle cell disease. **Blood** **70**: 1.245-66, 1987.

EBERT, B. L.& BUNN, H. F. - Regulation of transcription by hypoxia requires a multiprotein complex that includes hypoxia-inducible factor 1, an adjacent transcription factor, and p300/CREB binding protein. **Mol Cell Biol** **18**: 4.089-96, 1998.

EL BENNA, J.; RUEDI, J. M.; BABIOR, B. M. - Cytosolic guanine nucleotide-binding protein Rac2 operates in vivo as a component of the neutrophil respiratory burst oxidase. Transfer of Rac2 and the cytosolic oxidase components p47phox and p67phox to the submembranous actin cytoskeleton during oxidase activation. **J Biol Chem** **269**: 6.729-34, 1994.

EMBURY, S. H.; MOHANDAS, N.; PASZTY, C.; COOPER, P.; CHEUNG, A. T. - In vivo blood flow abnormalities in the transgenic knockout sickle cell mouse. **J Clin Invest** **103**: 915-20, 1999.

EMERSON, J.D. & STRENIO, H. Box-plots and batch comparison. In: **Understanding: Robust and Exploratory data analysis**. Eds. D.C. Hoaglin; F. Mosteller; J.M. Tukey. New York, John Wiley, p. 58, 1983.

ENGLISH, D.& ANDERSEN, B. R. - Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque. **J Immunol Methods** **5**: 249-52, 1974.

ESWORTHY, R. S.; CHU, F. F.; PAXTON, R. J.; AKMAN, S.; DOROSHOW, J. H. - Characterization and partial amino acid sequence of human plasma glutathione peroxidase. **Arch Biochem Biophys** **286**: 330-6, 1991.

FABRY, M. E.; RAJANAYAGAM, V.; FINE, E.; HOLLAND, S.; GORE, J. C.; NAGEL, R. L.; KAUL, D. K. - Modeling sickle cell vasoocclusion in the rat leg: quantification of trapped sickle cells and correlation with ³¹P metabolic and ¹H magnetic resonance imaging changes. **Proc Natl Acad Sci U S A** **86**: 3.808-12, 1989.

FENNELL, J. P.; BROSNAN, M. J.; FRATER, A. J.; HAMILTON, C. A., ALEXANDER, M. Y.; NICKLIN, S. A.; HEISTAD, D. D.; BAKER, A. H.; DOMINICZAK, A. F. - Adenovirus-mediated overexpression of extracellular superoxide dismutase improves endothelial dysfunction in a rat model of hypertension. **Gene Ther** **9**: 110-7, 2002.

- FERRAN, C.; MILLAN, M. T.; CSIZMADIA, V.; COOPER, J. T.; BROSTJAN, C.; BACH, F. H. & WINKLER, H. - Inhibition of NF-kappa B by pyrrolidine dithiocarbamate blocks endothelial cell activation. **Biochem Biophys Res Commun** **214**: 212-23, 1995.
- FORMAN, H. J. & TORRES, M. - Redox signaling in macrophages. **Mol Aspects Med** **22**: 189-216, 2001.
- FORREST, C. B.; FOREHAND, J. R.; AXTELL, R. A.; ROBERTS, R. L.; JOHNSTON, R. B., JR. - Clinical features and current management of chronic granulomatous disease. **Hematol Oncol Clin North Am** **2**: 253-66, 1988.
- FORSTERMANN, U.; KLEINERT, H.; GATH, I.; SCHWARZ, P.; CLOSS, E. I.; DUN, N. J. - Expression and expressional control of nitric oxide synthases in various cell types. **Adv Pharmacol** **34**: 171-86, 1995.
- FRANCIS, R. B., JR. & HAYWOOD, L. J. - Elevated immunoreactive tumor necrosis factor and interleukin-1 in sickle cell disease. **J Natl Med Assoc** **84**: 611-5, 1992.
- FRANCKE, U.; HSIEH, C. L.; FOELLMER, B. E.; LOMAX, K. J.; MALECH, H. L.; LETO, T. L. - Genes for two autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease assigned to 1q25 (NCF2) and 7q11.23 (NCF1). **Am J Hum Genet** **47**: 483-92, 1990.
- FRENCH, J. A., 2ND; KENNY, D.; SCOTT, J. P.; HOFFMANN, R. G.; WOOD, J. D.; HUDETZ, A. G.; HILLERY, C. A. - Mechanisms of stroke in sickle cell disease: sickle erythrocytes decrease cerebral blood flow in rats after nitric oxide synthase inhibition. **Blood** **89**: 4.591-9, 1997.
- FUCHS, A.; BOUIN, A. P.; RABILLOUD, T.; VIGNAIS, P. V. - The 40-kDa component of the phagocyte NADPH oxidase (p40phox) is phosphorylated during activation in differentiated HL60 cells. **Eur J Biochem** **249**: 531-9, 1997.
- FURCHGOTT, R. F. & ZAWADZKI, J. V. - The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature** **288**: 373-6, 1980.

FURCHGOTT, R.F. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for proposal that the acid-activatable inhibitory factor from retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In: **Vasodilatation: vascular smooth muscle, peptides, autonomic nervous and endothelium.** New York, Ed. P.M. Vanhoutte., Raven Press, p. 401-14, 1988.

GABIG, T. G.; CREAN, C. D.; MANTEL, P. L.; ROSLI, R. - Function of wild-type or mutant Rac2 and Rap1a GTPases in differentiated HL60 cell NADPH oxidase activation. **Blood 85:** 804-11, 1995.

GEISZT, M.; KOPP, J. B.; VARNAI, P.; LETO, T. L. - Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. **Proc Natl Acad Sci U S A 97:** 8.010-4, 2000.

GELLER, D. A.; LOWENSTEIN, C. J.; SHAPIRO, R. A.; NUSSLER, A. K.; DI SILVIO, M.; WANG, S. C.; NAKAYAMA, D. K.; SIMMONS, R. L.; SNYDER, S. H.; BILLIAR, T. R. - Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A 90:** 3.491-5, 1993.

GILSTON, V.; WILLIAMS, M. A.; NEWLAND, A. C.; WINYARD, P. G. - Hydrogen peroxide and tumour necrosis factor-alpha induce NF-kappaB-DNA binding in primary human T lymphocytes in addition to T cell lines. **Free Radic Res 35:** 681-91, 2001.

GINIS, I.; MENTZER, S. J.; FALLER, D. V. - Hypoxia induces lymphocyte adhesion to human mesenchymal cells via an LFA-1-dependent mechanism. **Am J Physiol 264:** C617-24, 1993a.

GINIS, I.; MENTZER, S. J.; FALLER, D. V. - Oxygen tension regulates neutrophil adhesion to human endothelial cells via an LFA-1-dependent mechanism. **J Cell Physiol 157:** 569-78, 1993b.

GINIS, I.; MENTZER, S. J.; LI, X.; FALLER, D. V. - Characterization of a hypoxia-responsive adhesion molecule for leukocytes on human endothelial cells. **J Immunol 155:** 802-10, 1995.

- GLOVER, R. E.; IVY, E. D.; ORRINGER, E. P.; MAEDA, H.; MASON, R. P. - Detection of nitrosyl hemoglobin in venous blood in the treatment of sickle cell anemia with hydroxyurea. **Mol Pharmacol** **55**: 1.006-10, 1999.
- GONCALVES, M. S.; NECHTMAN, J. F.; FIGUEIREDO, M. S.; KERBAUY, J.; ARRUDA, V. R.; SONATI, M. F.; SAAD, S. O.; COSTA, F. F.; STOMING, T. A. - Sickle cell disease in a Brazilian population from Sao Paulo: a study of the beta s haplotypes. **Hum Hered** **44**: 322-7, 1994.
- GORLACH, A.; LEE, P. L.; ROESLER, J.; HOPKINS, P. J.; CHRISTENSEN, B.; GREEN, E. D.; CHANOCK, S. J.; CURNUTTE, J. T. - A p47-phox pseudogene carries the most common mutation causing p47-phox- deficient chronic granulomatous disease. **J Clin Invest** **100**: 1.907-18, 1997.
- GOVERS, R. & RABELINK, T. J. - Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. **Am J Physiol Renal Physiol** **280**: F193-206, 2001.
- GRIFFITH, T. M.; EDWARDS, D. H.; LEWIS, M. J.; NEWBY, A. C.; HENDERSON, A. H. - The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. **Nature** **308**: 645-7, 1984.
- GRINSTEIN, S. & FURUYA, W. - Tyrosine phosphorylation and oxygen consumption induced by G proteins in neutrophils. **Am J Physiol** **260**: C1.019-27, 1991.
- GRUNFELD, S.; HAMILTON, C. A.; MESAROS, S.; MCCLAIN, S. W.; DOMINICZAK, A. F.; BOHR, D. F.; MALINSKI, T. - Role of superoxide in the depressed nitric oxide production by the endothelium of genetically hypertensive rats. **Hypertension** **26**: 854-7, 1995.
- GRYGLEWSKI, R. J.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. - Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. **Nature** **320**: 454-6, 1986.
- HABER F & WEISS J. - The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. **Proc R Soc Surg** **147**: 332-51, 1934.

HALL, A. V.; ANTONIOU, H.; WANG, Y.; CHEUNG, A. H.; ARBUS, A. M.; OLSON, S. L.; LU, W. C.; KAU, C. L.; MARSDEN, P. A. - Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1). **J Biol Chem** **269**: 33.082-90, 1994.

HALLIWELL, B.& GUTTERIDGE, J. M. - Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol** **186**: 1-85, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M.; CROSS, C. E. - Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? **J Lab Clin Med** **119**: 598-620, 1992.

HARRISON, D. G. - Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. **J Clin Invest** **100**: 2.153-7, 1997.

HAYAKAWA, T.; SUZUKI, K.; SUZUKI, S.; ANDREWS, P. C.; BABIOR, B. M. - A possible role for protein phosphorylation in the activation of the respiratory burst in human neutrophils. Evidence from studies with cells from patients with chronic granulomatous disease. **J Biol Chem** **261**: 9.109-15, 1986.

HAYNES, J. JR.& OBIAKO, B. - Activated polymorphonuclear cells increase sickle red blood cell retention in lung: role of phospholipids. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** **282**: H122-30, 2002.

HEBBEL, R. P. - The sickle erythrocyte in double jeopardy: autoxidation and iron decompartmentalization. **Semin Hematol** **27**: 51-69, 1990.

HEBBEL, R. P. - Beyond hemoglobin polymerization: the red blood cell membrane and sickle disease pathophysiology. **Blood** **77**: 214-37, 1991.

HEBBEL, R. P. - Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. **J Clin Invest** **100**: S83-6, 1997.

HEBBEL, R. P. - Blockade of adhesion of sickle cells to endothelium by monoclonal antibodies. **N Engl J Med** **342**: 1.910-2, 2000.

HEBBEL, R. P.; BOOGAERTS, M. A.; EATON, J. W.; STEINBERG, M. H. - Erythrocyte adherence to endothelium in sickle-cell anemia. A possible determinant of disease severity. **N Engl J Med** **302**: 992-5, 1980a.

HEBBEL, R. P. & MILLER, W. J. - Phagocytosis of sickle erythrocytes: immunologic and oxidative determinants of hemolytic anemia. **Blood** **64**: 733-41, 1984.

HEBBEL, R. P. & VERCELLOTTI, G. M. - The endothelial biology of sickle cell disease. **J Lab Clin Med** **129**: 288-93, 1997.

HEBBEL, R. P.; VISSER, M. R.; GOODMAN, J. L.; JACOB, H. S.; VERCELLOTTI, G. M. - Potentiated adherence of sickle erythrocytes to endothelium infected by virus. **J Clin Invest** **80**: 1503-6, 1987.

HEBBEL, R. P.; YAMADA, O.; MOLDOW, C. F.; JACOB, H. S.; WHITE, J. G.; EATON, J. W. - Abnormal adherence of sickle erythrocytes to cultured vascular endothelium: possible mechanism for microvascular occlusion in sickle cell disease. **J Clin Invest** **65**: 154-60, 1980b.

HERNANDEZ, L. A.; GRISHAM, M. B.; TWOHIG, B.; ARFORS, K. E.; HARLAN, J. M.; GRANGER, D. N. - Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury. **Am J Physiol** **253**: H699-703, 1987.

HEYWORTH, P. G.; CURNUTTE, J. T.; NAUSEEF, W. M.; VOLPP, B. D.; PEARSON, D. W.; ROSEN, H.; CLARK, R. A. - Neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase assembly. Translocation of p47-phox and p67-phox requires interaction between p47-phox and cytochrome b558. **J Clin Invest** **87**: 352-6, 1991.

HIBBS, J. B. JR.; VAVRIN, Z.; TAINTOR, R. R. - L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. **J Immunol** **138**: 550-65, 1987.

HILL, K. E.; LYONS, P. R.; BURK, R. F. - Differential regulation of rat liver selenoprotein mRNAs in selenium deficiency. **Biochem Biophys Res Commun** **185**: 260-3, 1992.

HILLERY, C. A.; DU, M. C.; MONTGOMERY, R. R.; SCOTT, J. P. - Increased adhesion of erythrocytes to components of the extracellular matrix: isolation and characterization of a red blood cell lipid that binds thrombospondin and laminin. **Blood** **87**: 4.879-86, 1996.

HISHIKAWA, K.; NAKAKI, T.; SUZUKI, H.; KATO, R.; SARUTA, T. - L-arginine as an antihypertensive agent. **J Cardiovasc Pharmacol** **20 Suppl 12**: S196-7, 1992.

HOFSTRA, T. C.; KALRA, V. K.; MEISELMAN, H. J.; COATES, T. D. - Sickle erythrocytes adhere to polymorphonuclear neutrophils and activate the neutrophil respiratory burst. **Blood** **87**: 4.440-7, 1996.

HORIE, Y.; WOLF, R.; FLORES, S. C.; MCCORD, J. M.; EPSTEIN, C. J.; GRANGER, D. N. - Transgenic mice with increased copper/zinc-superoxide dismutase activity are resistant to hepatic leukostasis and capillary no-reflow after gut ischemia/reperfusion. **Circ Res** **83**: 691-6, 1998.

HU, G.; VINTEN-JOHANSEN, J.; SALEM, M. R.; ZHAO, Z. Q.; CRYSTAL, G. J. - Isoflurane inhibits neutrophil-endothelium interactions in the coronary circulation: lack of a role for adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. **Anesth Analg** **94**: 849-56, table of contents, 2002.

IDE, T.; TSUTSUI, H.; OHASHI, N.; HAYASHIDANI, S.; SUEMATSU, N.; TSUCHIHASHI, M.; TAMAI, H.; TAKESHITA, A. - Greater oxidative stress in healthy young men compared with premenopausal women. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** **22**: 438-42, 2002.

IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E.; CHAUDHURI, G. - Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc Natl Acad Sci U S A** **84**: 9.265-9, 1987.

INANAMI, O.; JOHNSON, J. L.; MCADARA, J. K.; BENNA, J. E.; FAUST, L. R.; NEWBURGER, P. E.; BABIOR, B. M. - Activation of the leukocyte NADPH oxidase by phorbol ester requires the phosphorylation of p47PHOX on serine 303 or 304. **J Biol Chem** **273**: 9.539-43, 1998.

- JOHNSON, J. L.; PARK, J. W.; BENNA, J. E.; FAUST, L. P.; INANAMI, O.; BABIOR, B. M. - Activation of p47(PHOX), a cytosolic subunit of the leukocyte NADPH oxidase. Phosphorylation of ser-359 or ser-370 precedes phosphorylation at other sites and is required for activity. **J Biol Chem** **273**: 35.147-52, 1998.
- JONECKIS, C. C.; ACKLEY, R. L.; ORRINGER, E. P.; WAYNER, E. A.; PARISE, L. V. - Integrin alpha 4 beta 1 and glycoprotein IV (CD36) are expressed on circulating reticulocytes in sickle cell anemia. **Blood** **82**: 3.548-55, 1993.
- JOSEPH, M.; CAPRON, A.; TSICOPOULOS, A.; AMEISEN, J. C.; MARTINOT, J. B.; TONNEL, A. B. - Platelet activation by IgE and aspirin. **Agents Actions Suppl** **21**: 169-77, 1987.
- KANNER, J.; HAREL, S.; GRANIT, R. - Nitric oxide as an antioxidant. **Arch Biochem Biophys** **289**: 130-6, 1991.
- KASSCHAU, M. R.; BARABINO, G. A.; BRIDGES, K. R.; GOLAN, D. E. - Adhesion of sickle neutrophils and erythrocytes to fibronectin. **Blood** **87**: 771-80, 1996.
- KAUL, D. K.; FABRY, M. E.; COSTANTINI, F.; RUBIN, E. M.; NAGEL, R. L. - In vivo demonstration of red cell-endothelial interaction, sickling and altered microvascular response to oxygen in the sickle transgenic mouse. **J Clin Invest** **96**: 2.845-53, 1995.
- KAUL, D. K.; FABRY, M. E.; NAGEL, R. L. - Microvascular sites and characteristics of sickle cell adhesion to vascular endothelium in shear flow conditions: pathophysiological implications. **Proc Natl Acad Sci U S A** **86**: 3.356-60, 1989.
- KAUL, D. K. & XUE, H. - Rate of deoxygenation and rheologic behavior of blood in sickle cell anemia. **Blood** **77**: 1.353-61, 1991.
- KLEBANOFF, S. J. - Myeloperoxidase: contribution to the microbicidal activity of intact leukocytes. **Science** **169**: 1.095-7, 1970.
- KLEBANOFF, S. J. & CLARK, R. A. (Eds.). **The neutrophil: function and clinical disorders**. Amsterdam, North Holland Publishing Co., 1978. p. 641-80.

KNAUS, U. G.; MORRIS, S.; DONG, H. J.; CHERNOFF, J.; BOKOCH, G. M. - Regulation of human leukocyte p21-activated kinases through G protein--coupled receptors. **Science** **269**: 221-3, 1995.

KOKURA, S.; RHOADS, C. A.; WOLF, R. E.; YOSHIKAWA, T.; GRANGER, D. N.; AW, T. Y. - NF kappa b signaling in posthypoxic endothelial cells: relevance to E-selectin expression and neutrophil adhesion. **J Vasc Res** **38**: 47-58, 2001.

KONTOS, H. A.; WEI, E. P.; POVLISHOCK, J. T.; CHRISTMAN, C. W. - Oxygen radicals mediate the cerebral arteriolar dilation from arachidonate and bradykinin in cats. **Circ Res** **55**: 295-303, 1984.

KOONG, A. C.; CHEN, E. Y.; GIACCIA, A. J. - Hypoxia causes the activation of nuclear factor kappa B through the phosphorylation of I kappa B alpha on tyrosine residues. **Cancer Res** **54**: 1.425-30, 1994.

KOSHKIN, V.& PICK, E. - Superoxide production by cytochrome b559. Mechanism of cytosol-independent activation. **FEBS Lett** **338**: 285-9, 1994.

KREBS, E. G.& BEAVO, J. A. - Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. **Annu Rev Biochem** **48**: 923-59, 1979.

KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D. N. - Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proc Natl Acad Sci U S A** **88**: 4.651-5, 1991.

KURANTSIN-MILLS, J.; OFOSU, F. A.; SAFA, T. K.; SIEGEL, R. S.; LESSIN, L. S. - Plasma factor VII and thrombin-antithrombin III levels indicate increased tissue factor activity in sickle cell patients. **Br J Haematol** **81**: 539-44, 1992.

KUROSE, I.; ARGENBRIGHT, L. W.; WOLF, R.; LIANXI, L.; GRANGER, D. N. - Ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction: role of oxidants and lipid mediators. **Am J Physiol** **272**: H2.976-82, 1997.

- 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** **89**: 609-15, 1997.
- LACHANT, N. A. & OSEAS, R. S. - Vaso-occlusive crisis-associated neutrophil dysfunction in patients with sickle-cell disease. **Am J Med Sci** **294**: 253-7, 1987.
- LAMBETH, J. D.; CHENG, G.; ARNOLD, R. S.; EDENS, W. A. - Novel homologs of gp91phox. **Trends Biochem Sci** **25**: 459-61, 2000.
- LEE, P. J.; WASHER, L. L.; LAW, D. J.; BOLAND, C. R.; HORON, I. L.; FEINBERG, A. P. - Limited up-regulation of DNA methyltransferase in human colon cancer reflecting increased cell proliferation. **Proc Natl Acad Sci U S A** **93**: 10366-70, 1996.
- LEE, S. P.; CUNNINGHAM, M. L.; HINES, P. C.; JONECKIS, C. C.; ORRINGER, E. P.; PARISE, L. V. - Sickle cell adhesion to laminin: potential role for the alpha5 chain. **Blood** **92**: 2951-8, 1998.
- LIESE, J.; KLOOS, S.; JENDROSSEK, V.; PETROPOULOU, T.; WINTERGERST, U.; NOTHEIS, G.; GAHR, M.; BELOHRADSKY, B. H. - Long-term follow-up and outcome of 39 patients with chronic granulomatous disease. **J Pediatr** **137**: 687-93, 2000.
- LOPEZ, B. L.; BARNETT, J.; BALLAS, S. K.; CHRISTOPHER, T. A.; DAVIS-MOON, L.; MA, X. - Nitric oxide metabolite levels in acute vaso-occlusive sickle-cell crisis. **Acad Emerg Med** **3**: 1098-103, 1996.
- LOPEZ, B. L.; DAVIS-MOON, L.; BALLAS, S. K.; MA, X. L. - Sequential nitric oxide measurements during the emergency department treatment of acute vasoocclusive sickle cell crisis. **Am J Hematol** **64**: 15-9, 2000.
- LUTTY, G. A.; PHELAN, A.; MCLEOD, D. S.; FABRY, M. E.; NAGEL, R. L. - A rat model for sickle cell-mediated vaso-occlusion in retina. **Microvasc Res** **52**: 270-80, 1996.

- MACKIE, L. H.& HOCHMUTH, R. M. - The influence of oxygen tension, temperature, and hemoglobin concentration on the rheologic properties of sickle erythrocytes. **Blood** **76**: 1.256-61, 1990.
- MAKROPOULOS, V.; BRUNING, T.; SCHULZE-OSTHOFF, K. - Selenium-mediated inhibition of transcription factor NF-kappa B and HIV-1 LTR promoter activity. **Arch Toxicol** **70**: 277-83, 1996.
- MALAVE, I.; PERDOMO, Y.; ESCALONA, E.; RODRIGUEZ, E.; ANCHUSTEGUI, M.; MALAVE, H.; ARENDS, T. - Levels of tumor necrosis factor alpha/cachectin (TNF alpha) in sera from patients with sickle cell disease. **Acta Haematol** **90**: 172-6, 1993.
- MARLETTA, M. A.; YOON, P. S.; IYENGAR, R.; LEAF, C. D.; WISHNOK, J. S. - Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry** **27**: 8.706-11, 1988.
- MARSDEN, P. A.; HENG, H. H.; DUFF, C. L.; SHI, X. M.; TSUI, L. C.; HALL, A. V. - Localization of the human gene for inducible nitric oxide synthase (NOS2) to chromosome 17q11.2-q12. **Genomics** **19**: 183-5, 1994.
- MATSUI, N. M.; BORSIG, L.; ROSEN, S. D.; YAGHMAI, M.; VARKI, A.; EMBURY, S. H. - P-selectin mediates the adhesion of sickle erythrocytes to the endothelium. **Blood** **98**: 1955-62, 2001.
- McCALL, T. B.; FEELISCH, M.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. - Identification of N-iminoethyl-L-ornithine as an irreversible inhibitor of nitric oxide synthase in phagocytic cells. **Br J Pharmacol** **102**: 234-8, 1991.
- McCORD, J. M.& FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. - An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **J Biol Chem** **244**: 6.049-55, 1969.
- MEHTA, J. L.; LAWSON, D. L.; NICHOLS, W. W.; MEHTA, P. - Modulation of vascular tone by neutrophils: dependence on endothelial integrity. **Am J Physiol** **257**: H1315-20, 1989.

- MEHTA, J. L.; LOPEZ, L. M.; CHEN, L.; COX, O. E. - Alterations in nitric oxide synthase activity, superoxide anion generation, and platelet aggregation in systemic hypertension, and effects of celiprolol. **Am J Cardiol** **74**: 901-5, 1994.
- MICHIELS, C.; ARNOULD, T.; HOUBION, A.; REMACLE, J. - Human umbilical vein endothelial cells submitted to hypoxia-reoxygenation in vitro: implication of free radicals, xanthine oxidase, and energy deficiency. **J Cell Physiol** **153**: 53-61, 1992.
- MIYAHARA, K.; KAWAMOTO, T.; SASE, K.; YUI, Y.; TODA, K.; YANG, L. X.; HATTORI, R.; AOYAMA, T.; YAMAMOTO, Y.; DOI, Y.; ET AL. - Cloning and structural characterization of the human endothelial nitric-oxide-synthase gene. **Eur J Biochem** **223**: 719-26, 1994.
- MOHANDAS, N.& EVANS, E. - Sickle erythrocyte adherence to vascular endothelium. Morphologic correlates and the requirement for divalent cations and collagen-binding plasma proteins. **J Clin Invest** **76**: 1.605-12, 1985.
- MOLLAPOUR, E.; PORTER, J. B.; KACZMARSKI, R.; LINCH, D. C.; ROBERTS, P. - J. Raised neutrophil phospholipase A2 activity and defective priming of NADPH oxidase and phospholipase A2 in sickle cell disease. **Blood** **91**: 3.423-9, 1998.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M.; GRYGLEWSKI, R. J. - Mechanism of action of some inhibitors of endothelium-derived relaxing factor. **Proc Natl Acad Sci U S A** **83**: 9.164-8, 1986.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. - Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev** **43**: 109-42, 1991.
- MOORE, C. M.; EHLAYEL, M.; LEIVA, L. E.; SORENSEN, R. U. - New concepts in the immunology of sickle cell disease. **Ann Allergy Asthma Immunol** **76**: 385-400; quiz 400-3, 1996.
- MOORE, P. K.; AL-SWAYEH, O. A.; CHONG, N. W.; EVANS, R. A.; GIBSON, A. - L-NG-nitro arginine (L-NOARG), a novel, L-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilatation in vitro. **Br J Pharmacol** **99**: 408-12, 1990.

MOUTET, M.; D'ALESSIO, P.; MALETTE, P.; DEVAUX, V.; CHAUDIERE, J. - Glutathione peroxidase mimics prevent TNFalpha- and neutrophil-induced endothelial alterations. **Free Radic Biol Med** **25**: 270-81, 1998.

MOZZARELLI, A.; HOFRICHTER, J.; EATON, W. A. - Delay time of hemoglobin S polymerization prevents most cells from sickling in vivo. **Science** **237**: 500-6, 1987.

MUGGE, A.; ELWELL, J. H.; PETERSON, T. E.; HARRISON, D. G. - Release of intact endothelium-derived relaxing factor depends on endothelial superoxide dismutase activity. **Am J Physiol** **260**: C219-25, 1991.

MULLENBACH, G. T.; TABRIZI, A.; IRVINE, B. D.; BELL, G. I.; HALLEWELL, R. A. - Sequence of a cDNA coding for human glutathione peroxidase confirms TGA encodes active site selenocysteine. **Nucleic Acids Res** **15**: 5.484, 1987.

NAGEL, R. L.; JOHNSON, J.; BOOKCHIN, R. M.; GAREL, M. C.; ROSA, J.; SCHILIRO, G.; WAJCMAN, H.; LABIE, D.; MOO-PENN, W.; CASTRO, O. - Beta-chain contact sites in the haemoglobin S polymer. **Nature** **283**: 832-4, 1980.

NASH, G. B.; JOHNSON, C. S.; MEISELMAN, H. J. - Mechanical properties of oxygenated red blood cells in sickle cell (HbSS) disease. **Blood** **63**: 73-82, 1984.

NASMITH, P. E.; MILLS, G. B.; GRINSTEIN, S. - Guanine nucleotides induce tyrosine phosphorylation and activation of the respiratory burst in neutrophils. **Biochem J** **257**: 893-7, 1989.

NATARAJAN, M.; UDDEN, M. M.; MCINTIRE, L. V. - Adhesion of sickle red blood cells and damage to interleukin-1 beta stimulated endothelial cells under flow in vitro. **Blood** **87**: 4.845-52, 1996.

NATH, K. A.; SHAH, V.; HAGGARD, J. J.; CROATT, A. J.; SMITH, L. A.; HEBBEL, R. P. & KATUSIC, Z. S. - Mechanisms of vascular instability in a transgenic mouse model of sickle cell disease. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** **279**: R1.949-55, 2000.

- NEWBURGER, P. E.; DAI, Q.; WHITNEY, C. - In vitro regulation of human phagocyte cytochrome b heavy and light chain gene expression by bacterial lipopolysaccharide and recombinant human cytokines. **J Biol Chem** **266**: 16.171-7, 1991.
- NICOLINI, F. A.& MEHTA, J. L. - Inhibitory effect of unstimulated neutrophils on platelet aggregation by release of a factor similar to endothelium-derived relaxing factor (EDRF). **Biochem Pharmacol** **40**: 22.65-9, 1990.
- OHASHI, Y.; KAWASHIMA, S.; HIRATA, K.; YAMASHITA, T.; ISHIDA, T.; INOUE, N.; SAKODA, T.; KURIHARA, H.; YAZAKI, Y.; YOKOYAMA, M. - Hypotension and reduced nitric oxide-elicited vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. **J Clin Invest** **102**: 2.061-71, 1998.
- OKAMURA, N.; CURNUTTE, J. T.; ROBERTS, R. L.; BABIOR, B. M. - Relationship of protein phosphorylation to the activation of the respiratory burst in human neutrophils. Defects in the phosphorylation of a group of closely related 48-kDa proteins in two forms of chronic granulomatous disease. **J Biol Chem** **263**: 6.777-82, 1988.
- OLIVIERI, O.; VITOUX, D.; GALACTEROS, F.; BACHIR, D.; BLOUQUIT, Y.; BEUZARD, Y.& BRUGNARA, C. - Hemoglobin variants and activity of the (K+Cl-) cotransport system in human erythrocytes. **Blood** **79**: 793-7, 1992.
- OMAR, H. A.; CHERRY, P. D.; MORTELLITI, M. P.; BURKE-WOLIN, T.; WOLIN, M. S. - Inhibition of coronary artery superoxide dismutase attenuates endothelium-dependent and -independent nitrovasodilator relaxation. **Circ Res** **69**: 601-8, 1991.
- ORTEGA MATEO, A. & ARTINANO, A. A. - Nitric oxide reactivity and mechanisms involved in its biological effects. **Pharmacol Res** **42**: 421-7, 2000.
- PALLANSCH, L.; BESWICK, H.; TALIAN, J.; ZELENKA, P. - Use of an RNA folding algorithm to choose regions for amplification by the polymerase chain reaction. **Anal Biochem** **185**: 57-62, 1990.
- PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. - Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature** **327**: 524-6, 1987.

PALMER, R. M.; HICKERY, M. S.; CHARLES, I. G.; MONCADA, S.; BAYLISS, M. - T. Induction of nitric oxide synthase in human chondrocytes. **Biochem Biophys Res Commun** **193**: 398-405, 1993.

PALMER, R. M.; REES, D. D.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. - L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. **Biochem Biophys Res Commun** **153**: 1.251-6, 1988.

PANZA, J. A.; CASINO, P. R.; BADAR, D. M.; QUYYUMI, A. A. - Effect of increased availability of endothelium-derived nitric oxide precursor on endothelium-dependent vascular relaxation in normal subjects and in patients with essential hypertension. **Circulation** **87**: 1.475-81, 1993a.

PANZA, J. A.; CASINO, P. R.; KILCOYNE, C. M.; QUYYUMI, A.A. - Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. **Circulation** **87**: 1.468-74, 1993b.

PARKOS, C. A.; DINAUER, M. C.; WALKER, L. E.; ALLEN, R. A.; JESAITIS, A. J.; ORKIN, S. H. - Primary structure and unique expression of the 22-kilodalton light chain of human neutrophil cytochrome b. **Proc Natl Acad Sci U S A** **85**: 3.319-23, 1988.

PAULING, L.; ITANO, H. A.; SINGER, S. J.; WELLS, I. C. – Sickle cell anemia: a molecular disease. **Science** **110**: 543-48, 1949.

PHELAN, M.; PERRINE, S. P.; BRAUER, M.; FALLER, D. V. - Sickle erythrocytes, after sickling, regulate the expression of the endothelin-1 gene and protein in human endothelial cells in culture. **J Clin Invest** **96**: 1.145-51, 1995.

PLATT, O. S.; BRAMBILLA, D. J.; ROSSE, W. F.; MILNER, P. F.; CASTRO, O.; STEINBERG, M. H.; KLUG, P. P. - Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. **N Engl J Med** **330**: 1.639-44, 1994.

POWARS, D.; CHAN, L. S.; SCHROEDER, W. A. - The variable expression of sickle cell disease is genetically determined. **Semin Hematol** **27**: 360-76, 1990.

- QUINN, M. T.; EVANS, T.; LOETTERLE, L. R.; JESAITIS, A. J.; BOKOCH, G. M. - Translocation of Rac correlates with NADPH oxidase activation. Evidence for equimolar translocation of oxidase components. **J Biol Chem** **268**: 20.983-7, 1993.
- QUINN, M. T.; PARKOS, C. A.; WALKER, L.; ORKIN, S. H.; DINAUER, M. C.; JESAITIS, A. J. - Association of a Ras-related protein with cytochrome b of human neutrophils. **Nature** **342**: 198-200, 1989.
- RADOMSKI, M. & MONCADA, S. - An improved method for washing of human platelets with prostacyclin. **Thromb Res** **30**: 383-9, 1983.
- RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. - Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. **Lancet** **2**: 1.057-8, 1987a.
- RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. - The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. **Biochem Biophys Res Commun** **148**: 1.482-9, 1987b.
- RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. - Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** **87**: 10.043-7, 1990.
- RAKUGI, H.; TABUCHI, Y.; NAKAMARU, M.; NAGANO, M.; HIGASHIMORI, K.; MIKAMI, H.; OGIHARA, T.; SUZUKI, N. - Evidence for endothelin-1 release from resistance vessels of rats in response to hypoxia. **Biochem Biophys Res Commun** **169**: 973-7, 1990.
- REDDY, A. P.; HSU, B. L.; REDDY, P. S.; LI, N. Q.; THYAGARAJU, K.; REDDY, C. C.; TAM, M. F.; TU, C. P. - Expression of glutathione peroxidase I gene in selenium-deficient rats. **Nucleic Acids Res** **16**: 5.557-68, 1988.
- REES, D. C.; CERVI, P.; GRIMWADE, D.; O'DRISCOLL, A.; HAMILTON, M.; PARKER, N. E.; PORTER, J. B. - The metabolites of nitric oxide in sickle-cell disease. **Br J Haematol** **91**: 834-7, 1995.

RIBEIRO, M. O.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G.; LOVISOLO, S. M.; ZATZ, R. - Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. **Hypertension** **20**: 298-303, 1992.

RISTER, M.& BAEHNER, R. L. - The alteration of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and NAD(P)H cytochrome c reductase in guinea pig polymorphonuclear leukocytes and alveolar macrophages during hyperoxia. **J Clin Invest** **58**: 1.174-84, 1976.

ROBINSON, L. J.; WEREMOWICZ, S.; MORTON, C. C.; MICHEL, T. - Isolation and chromosomal localization of the human endothelial nitric oxide synthase (NOS3) gene. **Genomics** **19**: 350-7, 1994.

ROOS, D.; DE BOER, M.; KURIBAYASHI, F.; MEISCHL, C.; WEENING, R. S.; SEGAL, A. W.; AHLIN, A.; NEMET, K.; HOSSLE, J. P.; BERNATOWSKA-MATUSZKIEWICZ, E.; MIDDLETON-PRICE, H. - Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. **Blood** **87**: 1.663-81, 1996.

ROSSI, F.& ZATTI, M. - Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells. **Experientia** **20**: 21-3, 1964.

ROTRUCK, J. T.; POPE, A. L.; GANTHER, H. E.; SWANSON, A. B.; HAFEMAN, D. G.; HOEKSTRA, W. G. - Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. **Science** **179**: 588-90, 1973.

ROYER-POKORA, B.; KUNKEL, L. M.; MONACO, A. P.; GOFF, S. C.; NEWBURGER, P. E.; BAEHNER, R. L.; COLE, F. S.; CURNUTTE, J. T.; ORKIN, S. H. - Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location. **Nature** **322**: 32-8, 1986.

RUBANYI, G. M.& VANHOUTTE, P. M. - Hypoxia releases a vasoconstrictor substance from the canine vascular endothelium. **J Physiol** **364**: 45-56, 1985.

- RUBANYI, G. M.& VANHOUTTE, P. M. - Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. **Am J Physiol** **250**: H822-7, 1986.
- RUPEC, R. A.& BAEUERLE, P. A. - The genomic response of tumor cells to hypoxia and reoxygenation. Differential activation of transcription factors AP-1 and NF-kappa B. **Eur J Biochem** **234**: 632-40, 1995.
- SAEDI, M. S.; SMITH, C. G.; FRAMPTON, J.; CHAMBERS, I.; HARRISON, P. R.; SUNDE, R. A. - Effect of selenium status on mRNA levels for glutathione peroxidase in rat liver. **Biochem Biophys Res Commun** **153**: 855-61, 1988.
- SAHNOUN, Z.; JAMOUCSI, K.; ZEGHAL, K. M. - [Free radicals and antioxidants: physiology, human pathology and therapeutic aspects (part II)]. **Therapie** **53**: 315-39, 1998.
- SALVEMINI, D.; DE NUCCI, G.; GRYGLEWSKI, R. J.; VANE, J. R. - Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor. **Proc Natl Acad Sci U S A** **86**: 6.328-32, 1989.
- SATHYAMOORTHY, M.; DE MENDEZ, I.; ADAMS, A. G.; LETO, T. L. - p40(phox) down-regulates NADPH oxidase activity through interactions with its SH3 domain. **J Biol Chem** **272**: 9.141-6, 1997.
- SCHENK, H.; KLEIN, M.; ERDBRUGGER, W.; DROGE, W.; SCHULZE-OSTHOFF, K. - Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1. **Proc Natl Acad Sci U S A** **91**: 1.672-6, 1994.
- SCHMALZER, E. A.; MANNING, R. S.; CHIEN, S. - Filtration of sickle cells: recruitment into a rigid fraction as a function of density and oxygen tension. **J Lab Clin Med** **113**: 727-34, 1989.
- SCHMIDT, K. N.; AMSTAD, P.; CERUTTI, P.; BAEUERLE, P. A. - The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF-kappa B. **Chem Biol** **2**: 13-22, 1995.

- SCHRECK, R.; MEIER, B.; MANNEL, D. N.; DROGE, W.; BAEUERLE, P. A. - Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells. **J Exp Med** **175**: 1.181-94, 1992.
- SCHRECK, R.; RIEBER, P.; BAEUERLE, P. A. - Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. **Embo J** **10**: 2.247-58, 1991.
- SCHWARTZ, R. S.; DUZGUNES, N.; CHIU, D. T.; LUBIN, B. - Interaction of phosphatidylserine-phosphatidylcholine liposomes with sickle erythrocytes. Evidence for altered membrane surface properties. **J Clin Invest** **71**: 1570-80, 1983.
- SEGAL, A. W. & JONES, O. T. - Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes. **Nature** **276**: 515-7, 1978.
- SHEN, Q.; CHADA, S.; WHITNEY, C.; NEWBURGER, P. E. - Regulation of the human cellular glutathione peroxidase gene during in vitro myeloid and monocytic differentiation. **Blood** **84**: 3.902-8, 1994.
- SHIU, Y. T.; UDDEN, M. M.; McINTIRE, L. V. - Perfusion with sickle erythrocytes up-regulates ICAM-1 and VCAM-1 gene expression in cultured human endothelial cells. **Blood** **95**: 3.232-41, 2000.
- SIEBENLIST, U.; FRANZOSO, G.; BROWN, K. - Structure, regulation and function of NF-kappa B. **Annu Rev Cell Biol** **10**: 405-55, 1994.
- SIES, H. & ARTEEL, G. E. - Interaction of peroxynitrite with selenoproteins and glutathione peroxidase mimics. **Free Radic Biol Med** **28**: 1.451-5, 2000.
- SIGEL, S. - **Mann Whitney test**. In: Non parametric statistics for the behaviors sciences. Ed. McGraw Hil, inc, 1956.
- SKALNIK, D. G.; DORFMAN, D. M.; PERKINS, A. S.; JENKINS, N. A.; COPELAND, N. G.; ORKIN, S. H. - Targeting of transgene expression to monocyte/macrophages by the gp91-phox promoter and consequent histiocytic malignancies. **Proc Natl Acad Sci U S A** **88**: 8.505-9, 1991.

- SNYDER, S. H.& BREDT, D. S. - Nitric oxide as a neuronal messenger. **Trends Pharmacol Sci** **12**: 125-8, 1991.
- SOLOVEY, A.; GUI, L.; KEY, N. S.; HEBBEL, R. P. - Tissue factor expression by endothelial cells in sickle cell anemia. **J Clin Invest** **101**: 1.899-904, 1998.
- SOLOVEY, A.; LIN, Y.; BROWNE, P.; CHOONG, S.; WAYNER, E.; HEBBEL, R. P. - Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. **N Engl J Med** **337**: 1.584-90, 1997.
- SOLOVEY, A. A.; SOLOVEY, A. N.; HARKNESS, J.; HEBBEL, R. P. - Modulation of endothelial cell activation in sickle cell disease: a pilot study. **Blood** **97**: 1.937-41, 2001.
- SPACE, S. L.; LANE, P. A.; PICKETT, C. K.; WEIL, J. V. - Nitric oxide attenuates normal and sickle red blood cell adherence to pulmonary endothelium. **Am J Hematol** **63**: 200-4, 2000.
- STRALIN, P.& MARKLUND, S. L. - Effects of oxidative stress on expression of extracellular superoxide dismutase, CuZn-superoxide dismutase and Mn-superoxide dismutase in human dermal fibroblasts. **Biochem J** **298** (Pt 2): 347-52, 1994.
- STRAUSS, R. G.; JOHNSTON, R. B. JR.; ASBROCK, T.; MORENO, H.; LEHMEYER, J. E. - Neutrophil oxidative metabolism in sickle cell disease. **J Pediatr** **89**: 391-4, 1976.
- STUART, M. J.& SETTY, B. N. - Sickle cell acute chest syndrome: pathogenesis and rationale for treatment. **Blood** **94**: 1.555-60, 1999.
- SUGIHARA, K.; SUGIHARA, T.; MOHANDAS, N.; HEBBEL, R. P. - Thrombospondin mediates adherence of CD36+ sickle reticulocytes to endothelial cells. **Blood** **80**: 2.634-42, 1992.
- SUH, Y. A.; ARNOLD, R. S.; LASSEGUE, B.; SHI, J.; XU, X.; SORESCU, D.; CHUNG, A. B.; GRIENDLING, K. K.; LAMBETH, J. D. - Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. **Nature** **401**: 79-82, 1999.

SULLIVAN, K. J.; GOODWIN, S. R.; EVANGELIST, J.; MOORE, R. D.; MEHTA, P. - Nitric oxide successfully used to treat acute chest syndrome of sickle cell disease in a young adolescent. **Crit Care Med** 27: 2.563-8, 1999.

SULTANA, C.; SHEN, Y.; JOHNSON, C.; KALRA, V. K. - Cobalt chloride-induced signaling in endothelium leading to the augmented adherence of sickle red blood cells and transendothelial migration of monocyte-like HL-60 cells is blocked by PAF-receptor antagonist. **J Cell Physiol** 179: 67-78, 1999.

SULTANA, C.; SHEN, Y.; RATTAN, V.; JOHNSON, C.; KALRA, V. K. - Interaction of sickle erythrocytes with endothelial cells in the presence of endothelial cell conditioned medium induces oxidant stress leading to transendothelial migration of monocytes. **Blood** 92: 3.924-35, 1998.

SUZUKI, Y. J.; FORMAN, H. J.; SEVANIAN, A. - Oxidants as stimulators of signal transduction. **Free Radic Biol Med** 22: 269-85, 1997.

TAKAHASHI, K.; NEWBURGER, P. E.; COHEN, H. J. - Glutathione peroxidase protein. Absence in selenium deficiency states and correlation with enzymatic activity. **J Clin Invest** 77: 1.402-4, 1986.

TAPPEL, A. L. - Selenium--glutathione peroxidase: properties and synthesis. **Curr Top Cell Regul** 24: 87-97, 1984.

TAPPEL, A. L.; HAWKES, W. C.; WILHELMSSEN, E. C.; MOTSENBOCKER, M. A. - Selenocysteine-containing proteins and glutathione peroxidase. **Methods Enzymol** 107: 602-19, 1984.

TAUBE, H. - Mechanisms of oxidation with oxygen. **J Gen Physiol** 49: Suppl:29-52, 1965.

THOMSON, L.; TRUJILLO, M.; TELLERI, R.; RADI, R. - Kinetics of cytochrome c2+ oxidation by peroxynitrite: implications for superoxide measurements in nitric oxide-producing biological systems. **Arch Biochem Biophys** 319: 491-7, 1995.

TRAENCKNER, E. B.; WILK, S.; BAEUERLE, P. A. - A proteasome inhibitor prevents activation of NF-kappa B and stabilizes a newly phosphorylated form of I kappa B-alpha that is still bound to NF-kappa B. **Embo J** **13**: 5.433-41, 1994.

TSUNAWAKI, S.; KAGARA, S.; YOSHIKAWA, K.; YOSHIDA, L. S.; KURATSUJI, T.; NAMIKI, H. - Involvement of p40phox in activation of phagocyte NADPH oxidase through association of its carboxyl-terminal, but not its amino-terminal, with p67phox. **J Exp Med** **184**: 893-902, 1996.

TSUNAWAKI, S.; MIZUNARI, H.; NAGATA, M.; TATSUZAWA, O.; KURATSUJI, T. - A novel cytosolic component, p40phox, of respiratory burst oxidase associates with p67phox and is absent in patients with chronic granulomatous disease who lack p67phox. **Biochem Biophys Res Commun** **199**: 1.378-87, 1994.

VANE, J. R.; ANGGARD, E. E.; BOTTING, R. M. - Regulatory functions of the vascular endothelium. **N Engl J Med** **323**: 27-36, 1990.

VAZQUEZ, N.; LEHRNBECHER, T.; CHEN, R.; CHRISTENSEN, B. L.; GALLIN, J. I.; MALECH, H.; HOLLAND, S.; ZHU, S.; CHANOCK, S. J. - Mutational analysis of patients with p47-phox-deficient chronic granulomatous disease: The significance of recombination events between the p47-phox gene (NCF1) and its highly homologous pseudogenes. **Exp Hematol** **29**: 234-43, 2001.

VILELA, M. M.; SAMPAIO, M. S.; BRANDALISE, S. R.; COSTA, F. F. - Normal monocyte migratory response in patients with sickle cell disease. **J Trop Pediatr** **36**: 266-7, 1990.

VILELA, M. M.; SAMPAIO, M. S.; COSTA, F. F.; BRANDALISE, S. R. - Reduced phagocytic activity mediated by C3b and Fc monocyte receptors from children with sickle-cell disease. **Braz J Med Biol Res** **22**: 725-8, 1989.

WARNER, T. D.; DE NUCCI, G.; VANE, J. R. - Comparison of the survival of endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide within the isolated perfused mesenteric arterial bed of the rat. **Br J Pharmacol** **97**: 777-82, 1989.

WEATHERALL, D. J. & CLEGG, J. B. - Genetic disorders of hemoglobin. **Semin Hematol** **36**: 24-37, 1999.

WICK, T. M.; MOAKE, J. L.; UDDEN, M. M.; ESKIN, S. G.; SEARS, D. A.; MCINTIRE, L. V. - Unusually large von Willebrand factor multimers increase adhesion of sickle erythrocytes to human endothelial cells under controlled flow. **J Clin Invest** **80**: 905-10, 1987.

WICK, T. M.; MOAKE, J. L.; UDDEN, M. M.; MCINTIRE, L. V. - Unusually large von Willebrand factor multimers preferentially promote young sickle and nonsickle erythrocyte adhesion to endothelial cells. **Am J Hematol** **42**: 284-92, 1993.

WIENJES, F. B.; HSUAN, J. J.; TOTTY, N. F.; SEGAL, A. W. - p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. **Biochem J** **296 (Pt 3)**: 557-61, 1993.

YOUNG, L. H.; IKEDA, Y. & LEFER, A. M. Protein kinase inhibition exerts cardioprotective effects in myocardial ischemia/reperfusion via inhibition of superoxide release. **Methods Find Exp Clin Pharmacol** **23**: 107-14, 2001.

ZHAN, S.; VAZQUEZ, N.; WIENJES, F. B.; BUDARF, M. L.; SCHROCK, E.; RIED, T.; GREEN, E. D.; CHANOCK, S. J. - Genomic structure, chromosomal localization, start of transcription, and tissue expression of the human p40-phox, a new component of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase complex. **Blood** **88**: 2.714-21, 1996.

ZWEIER, J. L.; BRODERICK, R.; KUPPUSAMY, P.; THOMPSON-GORMAN, S.; LUTTY, G. A. - Determination of the mechanism of free radical generation in human aortic endothelial cells exposed to anoxia and reoxygenation. **J Biol Chem** **269**: 24.156-62, 1994.



8. *ANEXOS*

The release of nitric oxide and superoxide anion by neutrophils and mononuclear cells from patients with sickle cell anaemia

PÉRICLES M. DIAS-DA-MOTTA,* VALDER R. ARRUDA,† MARCELO N. MUSCARÁ,‡ SARA T. O. SAAD,† GILBERTO DE NUCCI,‡ FERNANDO F. COSTA† AND ANTONIO CONDINO-NETO* Departments of *Paediatrics, †Medicine and ‡Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

Received 15 June 1995; accepted for publication 11 January 1996

Summary. The aim of this work was to investigate the release of nitric oxide and superoxide by neutrophils and mononuclear cells from patients with sickle cell anaemia. Nitric oxide release was assayed by the ability of leucocytes to inhibit thrombin-induced washed platelet aggregation. Superoxide release was assessed by a cytochrome c reduction assay. Neutrophils from sickle cell anaemia patients released nitric oxide in a similar manner to those from healthy controls, because inhibition of platelet aggregation by neutrophils from sickle cell anaemia or from healthy controls was blocked by the inhibitor of nitric oxide synthesis N^G -nitro-L-arginine methyl ester ($300 \mu\text{M}$), but not by N^G -nitro-D-arginine methyl ester ($300 \mu\text{M}$) and was reversed by L-arginine (1 mM). Additionally, a similar number of neutrophils from sickle cell anaemia patients and from healthy controls was required to inhibit platelet aggregation. Mononuclear cells from sickle cell anaemia patients inhibited platelet aggregation only in the presence of superoxide dismutase (60 U ml^{-1}). Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 30 nM)- or zymosan ($100 \text{ particles/cell}$)-induced

release of superoxide by mononuclear cells from sickle cell anaemia patients was significantly higher than that observed in mononuclear cells from healthy controls ($P < 0.001$ and $P < 0.01$ respectively, Mann-Whitney test). The levels of superoxide released by neutrophils from sickle cell anaemia patients were similar to those from healthy controls. We conclude that mononuclear cells from sickle cell anaemia patients release more superoxide than those from healthy controls, when stimulated with PMA or zymosan *in vitro*. Considering that superoxide inactivates nitric oxide, that nitric oxide is an important endogenous vasodilator, and that superoxide produces oxidant damage, this greater production of superoxide by mononuclear cells from sickle cell anaemia patients may represent an additional risk factor for the obstruction of the microcirculation and tissue damage in these patients.

Keywords: free radicals, sickle cell disease, microcirculation, leucocytes, human.

The main pathophysiologic manifestations of sickle cell anaemia stem directly from the obstruction of blood flow in the microcirculation by rigid sickled erythrocytes (Briehl & Ewert, 1974; Bookchin & Lew, 1983). The vaso-occlusive manifestations of sickle cell disease involve a complex and dynamic sequence of events in the microcirculation (Chien *et al.* 1970; Smith *et al.* 1981; Mosseri *et al.* 1993).

The endothelium, platelets and leucocytes modulate vascular tone by the release of vasoactive substances. The endothelium plays a major role by releasing relaxing substances such as prostacyclin (Moncada *et al.* 1976) and nitric oxide (Furchgott & Zawadzki, 1980), and contracting factors such as prostaglandin G_2/H_2 (Kato *et al.* 1990) and

endothelin (Yanagisawa *et al.* 1988). Platelets are a major source of thromboxane (Hamberg *et al.* 1975), which is a potent vasoconstrictor. Following activation, monocytes/macrophages release products of the cyclo-oxygenase pathway such as prostaglandins D_2 , E_2 and $F_{2\alpha}$, and thromboxane B_2 (MacDermot *et al.* 1984). Neutrophils and eosinophils are a potential source of a wide variety of mediators, including prostaglandins, thromboxanes, leucotriene B_4 , platelet activating factor and cytotoxic proteins (Kay & Corrigan, 1992). These leucocyte-derived mediators contribute to the inflammatory response and in turn affect the vascular tone and permeability.

Human leucocytes independently release nitric oxide and superoxide (Condino-Neto *et al.* 1993). Nitric oxide arises from the oxidation of the terminal guanidino nitrogen atom of L-arginine by the action of the nitric oxide-synthases (Palmer *et al.* 1988). Nitric oxide relaxes vascular smooth

Correspondence: Dr Antonio Condino-Neto, Program in Molecular Medicine, University of Massachusetts Medical Center, Biotech II Park, 373 Plantation Street, Suite 318, Worcester, MA 01605, U.S.A.

muscle and inhibits platelet function through the activation of soluble guanylate cyclase and the formation of cyclic GMP (Rapoport & Murad, 1983). The pharmacological actions of nitric oxide are inhibited not only by haemoglobin and methylene blue (Martin *et al.* 1985), dithiothreitol and hydroquinone (Griffith *et al.* 1984) but also by superoxide. The vaso-relaxing effects of nitric oxide are prolonged in the presence of superoxide scavengers such as superoxide dismutase (SOD; Gryglewski *et al.* 1986; Rubanyi & Vanhoute, 1986) and cytochrome c (Moncada *et al.* 1986) and are inhibited by conditions favouring superoxide generation, including Fe^{2+} (Gryglewski *et al.* 1986) and hyperoxia (Rubanyi & Vanhoute, 1986).

Superoxide arises from the one-electron reduction of oxygen, catalysed in phagocytes by the enzyme nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-oxidase (Babior *et al.* 1973; Segal & Abo, 1993). There is abundant evidence that products of the leucocyte respiratory burst, such as superoxide, play an important role in defence mechanisms against infections (Holmes *et al.* 1967; Curnutte *et al.* 1974; Curnutte, 1993) and in tissue injury associated with the inflammatory process (Fridovich, 1978; Babior, 1984).

The aim of this work was to investigate the release of nitric oxide and superoxide by neutrophils and mononuclear cells from patients with sickle cell anaemia.

PATIENTS AND METHODS

Materials. The composition of the Krebs solution was (in mM): NaCl 137, KCl 2.7, $NaHCO_3$ 11.9, NaH_2PO_4 0.3, $MgSO_4$ 0.8, glucose 5.6, and $CaCl_2$ 1. The Hanks solution (HHBSS) consisted of (in mM): NaCl 137, KCl 2.7, Na_2HPO_4 0.5, KH_2PO_4 0.4, glucose 5.5 and was supplemented with 10 mM HEPES at pH 7.4. Superoxide dismutase (from bovine erythrocytes), L-arginine (free base), *N*⁻-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), HEPES, Histopaque 1119, Histopaque 1077, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), zymosan (ZYM), cytochrome c (type III), *N*⁻-nitro-D-arginine methyl ester (D-NAME), thrombin (bovine), and indomethacin were obtained from Sigma. Iloprost (prostacyclin) was a gift from Schering.

Selection of patients and healthy controls. The study included 22 patients with sickle cell anaemia in steady state who had not received blood transfusions in the last 3 months (15 male, seven female; age 15–32 years; height 148–162 cm; weight 43–64 kg). Diagnosis was based on clinical, familial and laboratory data such as haemoglobin electrophoresis on cellulose acetate at pH 8.9 and on agar gel at pH 6.2 (Weatherall & Clegg, 1981), a solubility test (Zago *et al.* 1982), and the estimation of haemoglobin F (Pembrey *et al.* 1972) and haemoglobin A₂ (Weatherall & Clegg, 1981). Healthy male controls ranging in age from 20 to 35 years were selected after clinical examination and laboratory screening. All patients and healthy controls were HIV negative. Written informed consent was provided by the participants prior to the study and the protocol was approved by the Medical School Ethics Committee.

Preparation of washed platelets. Blood from healthy controls was collected by venepuncture into a plastic flask containing

3.8% sodium citrate (final citrate concentration 0.38%). Platelet-rich plasma was prepared by centrifuging the blood at 200 *g* for 12 min at room temperature. The platelets were subsequently collected for washing by a further centrifugation of the platelet-rich plasma at 900 *g* for 8 min at room temperature in the presence of iloprost (300 ng/ml). The supernatant was removed and the platelet pellet was resuspended in 15 ml of calcium-free oxygenated (95% O₂/5% CO₂) Krebs solution. Iloprost (300 ng/ml) was again added and the platelet suspension was further centrifuged at 900 *g* for 8 min at room temperature. The supernatant was aspirated and the pellet was resuspended in calcium-free Krebs solution (Radomski & Moncada, 1983). The platelet count was determined automatically (Coulter Counter model T 890, Hialeah, Fla., U.S.A.) and adjusted to 1×10^8 cells/ml. Indomethacin (10 μ M, to inhibit the formation of cyclo-oxygenase products) and $CaCl_2$ (1 mM) were added to the final platelet suspension.

Isolation of neutrophils and mononuclear cells. Blood samples from healthy controls and from sickle cell anaemia patients were collected as described above. Neutrophils and mononuclear cells were obtained as pure cell populations using a Sigma Histopaque discontinuous density gradient kit (density 1.077 g/ml and 1.119 g/ml) according to the manufacturer's instructions (English & Andersen, 1974). Contaminating erythrocytes were removed by hypotonic lysis. The leucocyte count was determined automatically (Coulter Counter model T 890, Hialeah, Fla., U.S.A.) and the cell number adjusted in HHBSS containing 10 μ M indomethacin and 1 mM $CaCl_2$ to give the desired concentration.

Nitric oxide release by neutrophils and mononuclear cells. Nitric oxide release by neutrophils and mononuclear cells (from sickle cell anaemia patients and from healthy controls) was assessed by the ability of these leucocytes to inhibit thrombin-induced washed platelet aggregation (Salvemini *et al.* 1989). Briefly, a suspension of 1×10^8 cells/ml of washed platelets (500 μ l) was incubated at 37°C for 1 min in a Payton dual-channel aggregometer (Born & Cross, 1963) with continuous stirring at 900 rpm and then stimulated with thrombin (50–200 mU/ml). The decrease in optical density was recorded for 5 min after thrombin stimulation.

Neutrophils or mononuclear cells (5×10^7 cells/ml) in a volume of 10–50 μ l were added to the platelet suspension and the incubation continued for a further 1 min before stimulation with thrombin. When required, SOD (60 U/ml) was added immediately before the leucocytes. Neutrophils and mononuclear cells (5×10^7 cells/ml) were pre-incubated (60 min, room temperature) in HHBSS alone or with either L-arginine (1 mM), the nitric oxide synthesis inhibitor L-NAME (300 μ M; Moore *et al.* 1990), its enantiomer D-NAME (300 μ M) or with both L-arginine (1 mM) and L-NAME (300 μ M) before the cells were added to the platelet suspension. The experiments were performed in order to determine the number of leucocytes which caused 50–60% inhibition of platelet aggregation in the absence of SOD and 80–90% inhibition of platelet aggregation in the presence of SOD.

Superoxide anion release by neutrophils and mononuclear cells. The release of superoxide by neutrophils and mononuclear

cells (from sickle cell anaemia patients and from healthy controls) was assessed by a SOD inhibitable cytochrome c reduction assay (McCord & Fridovich, 1969). Briefly, the neutrophil or mononuclear cell suspension (1.4×10^6 /ml) was incubated with PMA (30 nM) or ZYM (100 particles/cell) in the presence of cytochrome c (80 μ M) for 60 min at 37°C. The spontaneous superoxide release was determined by incubating leucocytes in HHBSS without PMA or ZYM. Half of the tubes contained SOD (90 U/ml) at the beginning of the experiment as a control for nonspecific cytochrome c reduction. The reaction was stopped by placing the tubes in an ice bath and by adding SOD (90 U/ml) to the tubes which did not contain it. After centrifuging the tubes (2200g for 15 min at 4°C), the supernatant absorbance was measured at 550 nm. The amount of superoxide released was calculated using an extinction coefficient of $21100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. The results (nmoles of superoxide/ 1.4×10^6 cells/h) were expressed as a difference spectrum from the tubes which contained SOD or not. All experiments were performed in duplicate.

Statistics. The results are represented by box-plots (Emerson & Strenio, 1983) which indicate descriptive statistics as the minimum, 25th percentile, median, 75th percentile, and maximum values. Comparisons among groups were performed by the Mann-Whitney test (Zar, 1988). Values of $P < 0.05$ were considered to be significant.

RESULTS

Nitric oxide release by neutrophils and mononuclear cells

The minimum concentration of thrombin required to induce irreversible washed platelet aggregation within 5 min varied from 50 to 200 mU/ml. The median numbers of sickle cell anaemia and healthy control neutrophils which caused 50–60% inhibition of platelet aggregation were respectively 4.5 and 4.2×10^6 cells/ml ($n = 9$, detailed descriptive statistics in Table I). Preincubating sickle cell anaemia or healthy control neutrophils with 1 mM L-arginine did not potentiate the inhibitory effect of these cells on platelet aggregation ($P > 0.05$ in both situations, $n = 9$, Mann-Whitney test, Fig 1). Under these conditions, the respective median numbers of sickle cell anaemia and healthy control neutrophils which caused 50–60% inhibition of platelet aggregation were 4.4 and 4.3×10^6 cells/ml ($n = 9$, detailed descriptive statistics in Table I).

In contrast, preincubating sickle cell anaemia or healthy control neutrophils with the inhibitor of nitric oxide synthesis L-NAME (300 μ M) abolished the capacity of these cells to inhibit platelet aggregation ($n = 9$, Fig 1). The enantiomer D-NAME (300 μ M) did not affect the inhibitory capacity of sickle cell anaemia or healthy control neutrophils on platelet aggregation when compared to standard neutrophils ($P > 0.05$ in both situations, $n = 9$, Mann-Whitney test, Fig 1). The respective median numbers of sickle cell anaemia and healthy control neutrophils which caused 50–60% inhibition of platelet aggregation after incubation with D-NAME were 4.5 and 4.4×10^6 cells/ml ($n = 9$, detailed descriptive statistics in Table I).

The effect of L-NAME was reversed by preincubating

neutrophils with both L-NAME (300 μ M) and L-arginine (1 mM). Under these conditions, the median numbers of sickle cell anaemia and healthy control neutrophils which caused 50–60% inhibition of platelet aggregation were respectively 4.5 and 4.4×10^6 cells/ml ($n = 9$, detailed descriptive statistics in Table I), which were statistically similar values compared to standard neutrophils ($P > 0.05$ in both situations, $n = 9$, Mann-Whitney test, Fig 1).

Superoxide dismutase (60 U/ml) potentiated the inhibitory effect of sickle cell anaemia and healthy control neutrophils on platelet aggregation. The same number of cells which caused 50–60% inhibition of platelet aggregation in the absence of SOD, inhibited 80–90% of platelet aggregation in the presence of SOD ($n = 9$, Fig 1).

Sickle cell anaemia mononuclear cells inhibited thrombin-induced washed platelet aggregation only in the presence of SOD (60 U/ml, $n = 9$, Fig 2). The median numbers of sickle cell anaemia and healthy control mononuclear cells which caused 80–90% inhibition of platelet aggregation in the presence of SOD were respectively: 3.5 and 3.3×10^6 cells/ml ($n = 9$, detailed descriptive statistics in Table II). Under these conditions, preincubating mononuclear cells with the inhibitor of nitric oxide synthesis L-NAME (300 μ M) abolished the capacity of these cells to inhibit platelet aggregation ($n = 9$, Fig 2).

In the presence of SOD, the enantiomer D-NAME (300 μ M) did not affect the inhibitory capacity of sickle cell anaemia or healthy control mononuclear cells on platelet aggregation when compared to standard mononuclear cells ($P > 0.05$ in both situations, $n = 9$, Mann-Whitney test, Fig 2). The respective median numbers of sickle cell anaemia and healthy control mononuclear cells which caused 80–90% inhibition of platelet aggregation after incubation with

Table I. Number of sickle cell anaemia or healthy control neutrophils (maximum, 75th percentile, median, 25th percentile and minimum) which caused 50–60% inhibition of thrombin-induced (50–200 mU/ml) washed platelet aggregation in the absence of superoxide dismutase ($n = 9$). Results from neutrophils which were pre-incubated (60 min, room temperature) in HHBSS alone or with L-arginine (1 mM), D-NAME (300 μ M) or with both L-NAME (300 μ M) and L-arginine (1 mM).

	HHBSS	L-Arginine	D-NAME	L-NAME + L-arginine
Sickle cell anaemia neutrophils $\times 10^6$ /ml				
Maximum	5.0	5.0	5.0	4.9
75th percentile	4.8	4.7	4.8	4.8
Median	4.5	4.4	4.5	4.5
25th percentile	4.3	4.2	4.2	4.3
Minimum	4.0	3.9	4.1	4.1
Healthy control neutrophils $\times 10^6$ /ml				
Maximum	5.0	5.0	4.9	5.0
75th percentile	4.6	4.7	4.7	4.8
Median	4.2	4.3	4.4	4.4
25th percentile	4.1	4.2	4.2	4.3
Minimum	4.0	4.2	4.1	4.0

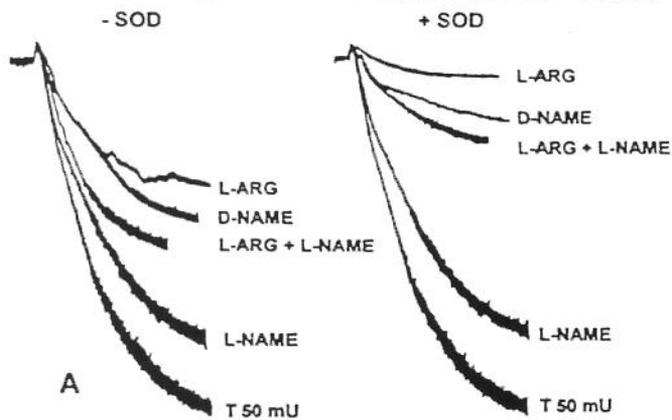
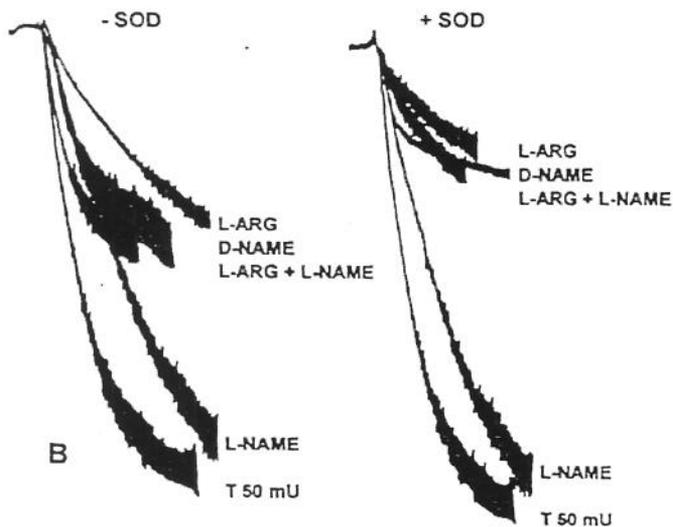
Nitric oxide release by NEU from a SCA patient (4.5×10^6 cells/ml)Nitric oxide release by NEU from a healthy control (4.2×10^6 cells/ml)

Fig 1. Nitric oxide release by neutrophils (NEU) from patients with sickle cell anaemia (representative trace in panel A, 4.5×10^6 cells/ml) and from healthy controls (representative trace in panel B, 4.2×10^6 cells/ml). N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, $300 \mu\text{M}$), but not N^G -nitro-D-arginine methyl ester (D-NAME, $300 \mu\text{M}$), reduced the inhibitory effect of the neutrophils on thrombin-induced (T, 50 mU/ml) washed platelet aggregation. This reduction was reversed by simultaneously incubating the neutrophils with L-NAME ($300 \mu\text{M}$) and L-arginine (1 mM). L-Arginine alone (1 mM) did not potentiate the basal release of nitric oxide by neutrophils. Superoxide dismutase (SOD, 60 U/ml) potentiated the inhibitory effect of neutrophils on platelet aggregation.

D-NAME were 3.6 and 3.4×10^6 cells/ml ($n = 9$, detailed descriptive statistics in Table II).

The effect of L-NAME was reversed by preincubating mononuclear cells with both L-NAME ($300 \mu\text{M}$) and L-arginine (1 mM). Under these conditions, the median numbers of sickle cell anaemia and healthy control mononuclear cells which caused 80–90% inhibition of platelet aggregation were respectively 3.6 and 3.5×10^6 cells/ml ($n = 9$, detailed descriptive statistics in Table II), which were statistically similar values compared to standard mononuclear cells ($P > 0.05$ in both situations, $n = 9$, Mann-Whitney test, Fig 2).

L-Arginine (1 mM) did not restore the ability of sickle cell

anaemia mononuclear cells to inhibit platelet aggregation in the absence of SOD ($n = 9$, Fig 2), nor did it potentiate the platelet aggregation inhibitory effect of these cells in the presence of SOD, when compared to standard mononuclear cells ($P > 0.05$ in both situations, $n = 9$, Mann-Whitney test, Fig 2). The median numbers of L-arginine preincubated sickle cell anaemia and healthy control mononuclear cells which caused 80–90% inhibition of platelet aggregation in the presence of SOD were respectively: 3.5 and 3.4×10^6 cells/ml ($n = 9$, detailed descriptive statistics in Table II). In the absence of added leucocytes, SOD (60 U/ml) had no effect on thrombin-induced (50–200 mU/ml) washed platelet aggregation.

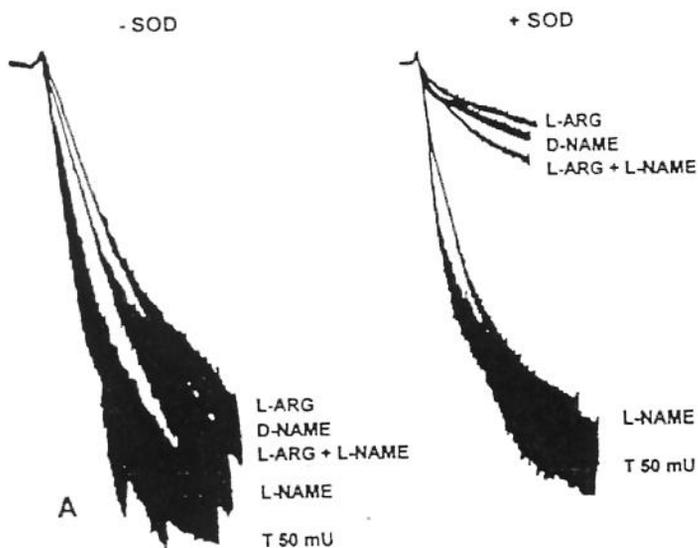
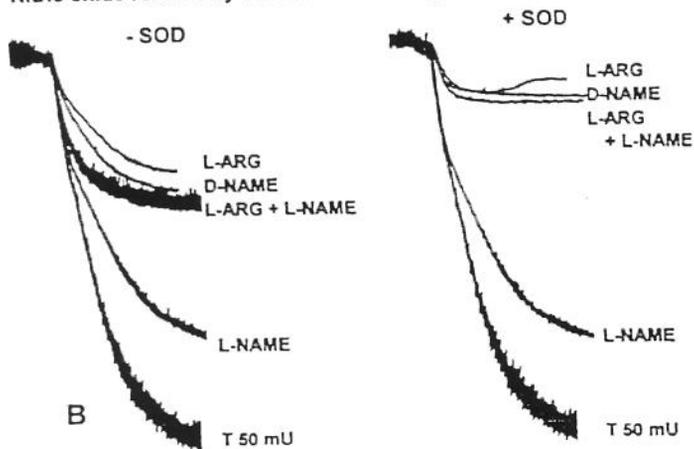
Nitric oxide release by MON from a SCA patient (3.5×10^6 cells/ml)Nitric oxide release by MON from a healthy control (3.3×10^6 cells/ml)

Fig 2. Mononuclear cells (MON) from patients with sickle cell anaemia (representative trace in panel A, 3.5×10^6 cells/ml), but not from healthy controls (representative trace in panel B, 3.3×10^6 cells/ml) failed to inhibit thrombin-induced (T, 50 mU/ml) washed platelet aggregation in the absence of superoxide dismutase (SOD, 60 U/ml). In the presence of SOD (60 U/ml), *N*^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 300 μM), but not *N*^ω-nitro-D-arginine methyl ester (D-NAME, 300 μM), reduced the inhibitory effect of sickle cell anaemia or healthy control mononuclear cells on washed platelet aggregation. This reduction was reversed by simultaneously incubating these mononuclear cells with L-NAME (300 μM) and L-arginine (1 mM). L-Arginine alone (1 mM) did not restore the ability of mononuclear cells from sickle cell anaemia patients to inhibit platelet aggregation in the absence of SOD nor did it potentiate the basal release of nitric oxide from these cells in the presence of SOD.

Superoxide anion release by neutrophils and mononuclear cells

The median spontaneous PMA- and ZYM-induced release of superoxide by neutrophils from sickle cell anaemia patients were respectively 3.4, 36.7 and 13.5 nmoles of superoxide/ 1.4×10^6 cells/h ($n = 22$, Fig 3). For neutrophils from healthy controls, these values were respectively 2.9, 35.2 and 13.4 ($n = 17$, Fig 3). There was no significant difference between these two sets of data ($P > 0.05$ in all situations, Mann-Whitney test).

The median spontaneous PMA- and ZYM-induced release of superoxide by mononuclear cells from sickle cell anaemia

patients were respectively 2.1, 31.3 and 11.3 nmoles of superoxide/ 1.4×10^6 cells/h ($n = 22$, Fig 3). For mononuclear cells from healthy controls these values were respectively 2.5, 15.2 and 6.1 ($n = 17$, Fig 3). The PMA- and ZYM-induced release of superoxide by mononuclear cells from sickle cell anaemia patients was significantly higher than that observed in mononuclear cells from healthy controls ($P < 0.001$ and $P < 0.01$, respectively, Mann-Whitney test). The spontaneous release of superoxide by mononuclear cells from sickle cell anaemia patients and from healthy controls was similar ($P > 0.05$, Mann-Whitney test).

Table II. Number of sickle cell anaemia or healthy control mononuclear cells (maximum, 75th percentile, median, 25th percentile and minimum) which caused 80–90% inhibition of thrombin-induced (50–200 nM/ml) washed platelet aggregation in the presence of superoxide dismutase (60 U/ml, $n = 9$). Results from mononuclear cells which were pre-incubated (60 min, room temperature) in HHBSS alone or with L-arginine (1 mM), D-NAME (300 μ M) or with both L-NAME (300 μ M) and L-arginine (1 mM).

	HHBSS	L-Arginine	D-NAME	L-NAME + L-arginine
Sickle cell anaemia mononuclear cells $\times 10^6$/ml				
Maximum	4.0	3.8	4.0	3.9
75th percentile	3.7	3.6	3.8	3.7
Median	3.5	3.5	3.6	3.6
25th percentile	3.2	3.3	3.3	3.4
Minimum	3.0	3.2	3.1	3.1
Healthy control mononuclear cells $\times 10^6$/ml				
Maximum	3.9	4.0	4.0	3.9
75th percentile	3.7	3.7	3.8	3.6
Median	3.3	3.4	3.4	3.5
25th percentile	3.2	3.2	3.3	3.4
Minimum	3.0	3.0	3.2	3.1

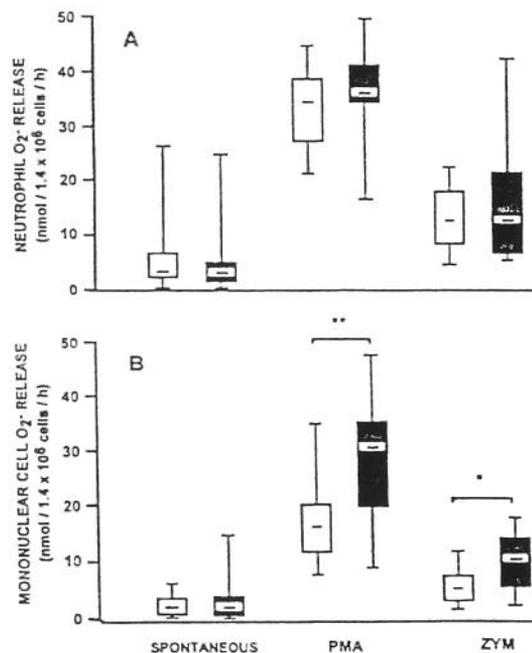


Fig 3. Spontaneous and PMA- or ZYM-induced superoxide anion (O_2^-) release by neutrophils (A) and mononuclear cells (B) from sickle cell anaemia patients ($n = 22$, solid boxes) and from healthy controls ($n = 17$, open boxes) represented as box-plots (minimum, 25th percentile, median, 75th percentile, maximum). Mononuclear cells from sickle cell anaemia patients release greater amounts of superoxide anion (under PMA or ZYM stimulation) than the corresponding cells from healthy controls (respectively $**P < 0.001$ and $*P < 0.01$, Mann-Whitney test).

DISCUSSION

Nitric oxide inhibits platelet aggregation through a cGMP-dependent mechanism (Radomski *et al.* 1987a–d). Our results clearly show that neutrophils from sickle cell anaemia patients release nitric oxide in a similar manner to those from healthy controls, because inhibition of washed platelet aggregation by neutrophils from sickle cell anaemia patients or from healthy controls is blocked by L-NAME (Moore *et al.* 1990), but not by D-NAME, and is reversed by L-arginine. Additionally, a similar number of neutrophils from sickle cell anaemia patients and from healthy controls is required to inhibit platelet aggregation.

Superoxide depresses endothelium-dependent relaxations by inactivating nitric oxide in transit (Gryglewski *et al.* 1986; Rubanyi & Vanhoute, 1986; Moncada *et al.* 1986) and is the specific substrate of SOD (McCord & Fridovich, 1969). We show that SOD potentiates the inhibitory effect of sickle cell anaemia neutrophils on platelet aggregation, clearly indicating that superoxide interferes with the ability of these cells to inhibit platelet aggregation.

It is noteworthy that the release of nitric oxide by mononuclear cells from sickle cell anaemia patients, but not from healthy controls, is detected only in the presence of SOD. One has to consider three sources of superoxide in our experimental system: platelets (Joseph *et al.* 1987), leucocytes (Babior *et al.* 1973) and Krebs solution (Warner *et al.* 1989). Considering that the platelets and the buffer used to assay the release of nitric oxide by both neutrophils and mononuclear cells were identical, the mononuclear cells from sickle cell anaemia patients are the most likely source of the increased superoxide.

Our results clearly indicate that the PMA- or ZYM-induced release of superoxide by sickle cell anaemia mononuclear cells is significantly higher than that observed in healthy control mononuclear cells, suggesting that these cells are hyper-responsive. These results raise the possibility that mild stimulation such as the stirring that occurs during aggregation experiments, and also the shear stress in the circulation *in vivo*, could cause the release of superoxide which would impair the nitric oxide-mediated vasodilation. Therefore, mononuclear cells from sickle cell anaemia patients can release normal amounts of nitric oxide but it may be inactivated by the simultaneous release of greater amounts of superoxide.

Cyclo-oxygenase products such as prostaglandin endoperoxides (Hamberg *et al.* 1974) and thromboxane A_2 (Hamberg *et al.* 1975) also cause platelet activation. The hypothesis that mononuclear cells from sickle cell anaemia patients produced cyclo-oxygenase products which caused the platelet aggregation or stimulated these cells to release more superoxide is unlikely in our study, since indomethacin was used in all experiments.

We conclude that mononuclear cells from sickle cell anaemia patients release more superoxide than mononuclear cells from healthy controls when stimulated with PMA or ZYM. Considering that superoxide inactivates nitric oxide (Gryglewski *et al.* 1986; Rubanyi & Vanhoute, 1986; Moncada *et al.* 1986), that nitric oxide is an important

endogenous vasodilator (Furchgott & Zawadski, 1980) and that superoxide produces oxidant damage (Fridovich, 1978; Babior, 1984), this phenomenon could represent an additional risk factor for the obstruction of the microcirculation and tissue damage in sickle cell anaemia patients. Whether mononuclear cells from sickle cell anaemia patients are hyper-responsive or have a defective antioxidant system is currently under investigation.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr Stephen Hyslop (Department of Pharmacology, State University of Campinas, Brazil) and Dr Peter E. Newburger (Department of Pediatrics, University of Massachusetts Medical School, U.S.A.) for advice on the revision of this paper.

REFERENCES

- Babior, B.M. (1984) Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood*, **64**, 959–966.
- Babior, B.M., Curnutte, J.T. & McMurrich, B.J. (1973) The particulate superoxide-forming system from human neutrophils: Properties of the system and further evidence supporting its participation in the respiratory burst. *Journal of Clinical Investigation*, **58**, 989–992.
- Bookchin, R.M. & Lew, V.L. (1983) Red cell membrane abnormalities in sickle-cell anemia. *Progress in Hematology*, **13**, 1–13.
- Born, G.V.R. & Cross, M.J. (1963) The aggregation of blood platelets. *Journal of Physiology*, **168**, 178–195.
- Briehl, R.W. & Ewert, S. (1974) Gelatin of sickle cell hemoglobin. II. Methemoglobin. *Journal of Molecular Biology*, **89**, 759–766.
- Chien, S., Usami, S. & Bertles, J.F. (1970) Abnormal rheology of oxygenated blood in sickle cell anemia. *Journal of Clinical Investigation*, **49**, 623–629.
- Condino-Neto, A., Muscarà, M.N., Grumach, A.S., Carneiro-Sampaio, M.M.S. & de Nucci, G. (1993) Neutrophils and mononuclear cells from patients with chronic granulomatous disease release nitric oxide. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **35**, 485–490.
- Curnutte, J.T. (1993) Chronic granulomatous disease: the solving of a clinical riddle at the molecular level. *Clinical Immunology and Immunopathology*, **67**, (Suppl.), 2–15.
- Curnutte, J.T., Whitten, D.M. & Babior, B.M. (1974) Defective superoxide production by granulocytes from patients with chronic granulomatous disease. *New England Journal of Medicine*, **290**, 593–597.
- Emerson, J.D. & Strenio, H. (1983) Box-plots and batch comparison. *Understanding Robust and Exploratory Data Analysis* (ed. by D. C. Hoaglin, F. Mosteller and J. M. Tukey), p. 58. John Wiley & Sons, New York.
- English, D. & Andersen, B.R. (1974) Single-step separation of red blood cells, granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradient of Ficoll-Hypaque. *Journal of Immunological Methods*, **5**, 249–252.
- Fridovich, I. (1978) The biology of oxygen radicals. *Science*, **201**, 875–880.
- Furchgott, R.F. & Zawadski, J.V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, **288**, 373–376.
- Griffith, T.M., Edwards, D.H., Lewis, M.J., Newby, A.C. & Henderson, A.H. (1984) The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. *Nature*, **308**, 645–647.
- Gryglewski, R.J., Palmer, R.M.J. & Moncada, S. (1986) Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*, **320**, 454–456.
- Hamberg, M., Svensson, J. & Samuelsson, B. (1975) Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **72**, 2994–3001.
- Hamberg, M., Svensson, J., Wakabayashi, T. & Samuelsson, B. (1974) Isolation and structures of two prostaglandin endoperoxides that cause platelet aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **71**, 345–352.
- Holmes, B., Page, A.R. & Good, R.A. (1967) Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocyte function. *Journal of Clinical Investigation*, **46**, 1422–1432.
- Joseph, M., Capron, A., Tsicopoulos, A., Ameisen, J.C., Martinot, J.B. & Tonnel, A.B. (1987) Platelet activation by IgE and aspirin. *Agents and Actions*, **21**, (Suppl. 1), 169–177.
- Kato, T., Iwama, Y., Okomura, K., Hashimoto, H., Ito, T. & Sakabe, T. (1990) Prostaglandin H₂ may be the endothelium-derived contracting factor released by acetylcholine in the aorta of the rat. *Hypertension*, **15**, 475–481.
- Kay, A.B. & Corrigan, C.J. (1992) Eosinophils and neutrophils. *British Medical Bulletin*, **48**, 51–64.
- MacDermot, J., Kelsey, C.R., Waddell, K.A., Richmond, R., Knight, R.K., Cole, P.J., Dollery, C.T., Landon, D.N. & Blair, I.A. (1984) Synthesis of leukotriene B₄ and prostanoids by human alveolar macrophages: analysis by gas chromatography/mass spectrometry. *Prostaglandins*, **27**, 163–179.
- Martin, W., Villani, G.M., Jothianandan, D. & Furchgott, R.F. (1985) Selective blockade of endothelial-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **232**, 708–716.
- McCord, J. & Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte protein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, **244**, 6044–6055.
- Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S. & Vane, J.R. (1976) An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*, **263**, 663–665.
- Moncada, S., Palmer, R.M.J. & Gryglewski, R.J. (1986) Mechanism of action of some inhibitors of endothelium-derived relaxing factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **83**, 9164–9168.
- Moore, P.K., Al-Swayeh, O.A., Chong, N.W.S., Evans, R.A. & Gibson, A. (1990) L-N^G-Nitroarginine (L-NOARG) a novel L-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilatation *in vitro*. *British Journal of Pharmacology*, **99**, 408–412.
- Mosseri, M., Bartlett-Pandite, A.N., Wenc, K., Isner, J.M. & Weinstein, R. (1993) Inhibition of endothelium-dependent vasorelaxation by sickle erythrocytes. *American Heart Journal*, **126**, 338–346.
- Palmer, R.M.J., Ashton, D.S. & Moncada, S. (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, **333**, 664–666.
- Pembrey, M.E., MacWade, P. & Weatherall, D.J. (1972) Reliable routine estimation of small amounts of foetal haemoglobin by alkali denaturation. *Journal of Clinical Pathology*, **25**, 738–740.
- Radomski, M.W. & Moncada, S. (1983) An improved method for washing human platelets with prostacyclin. *Thrombosis Research*, **30**, 383–399.
- Radomski, M.W., Palmer, R.M.J. & Moncada, S. (1987a) Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric

- oxide and prostacyclin in platelets. *British Journal of Pharmacology*, 92, 181-187.
- Radomski, M.W., Palmer, R.M.J. & Moncada, S. (1987b) The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *British Journal of Pharmacology*, 92, 639-646.
- Radomski, M.W., Palmer, R.M.J. & Moncada, S. (1987c) The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 148, 1482-1489.
- Radomski, M.W., Palmer, R.M.J. & Moncada, S. (1987d) Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesions to vascular endothelium. *Lancet*, ii, 1057-1058.
- Rapoport, R.M. & Murad, F. (1983) Agonist induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cyclic GMP. *Circulation Research*, 52, 352-357.
- Rubanyi, G.M. & Vanhoute, P.M. (1986) Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *American Journal of Physiology*, 250, 822-827.
- Salvemini, D., de Nucci, G., Gryglewski, R.J. & Vane, J.R. (1989) Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing an EDRF-like factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 6328-6332.
- Segal, A.W. & Abo, A. (1993) The biochemical basis of the NADPH-oxidase of phagocytes. *Trends in Biochemical Sciences*, 18, 43-47.
- Smith, C.M., Kuettner, J.F., Tukey, D.P., Burris, S.M. & White, J.G. (1981) Variable deformability of irreversibly sickled erythrocytes. *Blood*, 58, 71-76.
- Warner, T.D., De Nucci, G. & Vane, J.R. (1989) Comparison of the survival of endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide within the isolated perfused mesentery of the rat. *British Journal of Pharmacology*, 97, 777-782.
- Weathrall, D.J. & Clegg, B. (1981) *The Thalassaemia Syndromes*, pp. 754-769. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Yanagisawa, K., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K. & Masaki, T. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332, 411-415.
- Zago, M.A., Costa, F.F. & Bottura, C. (1982) Teste de solubilidade quantitativo modificado em hemolisados normais e em variantes de hemoglobina. *Revista Paulista de Medicina*, 100, 15-17.
- Zar, J.H. (1988) Non-parametric statistical methods. *Biostatistical Analysis*, pp. 138-141. Prentice Hall, New York.

VII Congresso Brasileiro



de Alergia e Imunologia
em Pediatria

17 a 21 de abril de 1999
Brasília

Certificado

Conferido a **PÉRICLES M. DIAS DA MOTTA**

pela sua participação como **AUTOR DO TEMA LIVRE DOSAGEM DE SOD E GLUTATONA
PEROXIDASE DOS NEU E MON DOS PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME.**

Brasília, 21 de abril de 1999

Presidência



Sociedade
Brasileira de
Pediatria



Nestlé
NUTRIÇÃO INFANTIL

Charles K. Nagitz
Presidente do Comitê Científico

Wellington G. Borges
Presidente do Congresso



Por un niño sano
en su mundo mejor

Sociedad Argentina de Pediatría

MIEMBRO DE LA ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE PEDIATRÍA Y DE LA ASOCIACIÓN INTERNACIONAL DE PEDIATRÍA

COMISION DIRECTIVA

Presidente

Dr. Horacio Lejman

Vicepresidente 1º

Dra. Elena Cisaruk de Lanzotti

Vicepresidente 2º

Dr. Daniel Bellamino

Secretario General

Dr. Mario Angel Granoville

Tesoroero

Dr. Paul Soto Merech

Pro-Tesoroero

Dr. Gerardo Enrique Vaucheret

Secretaria de Educación Continua

Dra. Marganta Ramonet

Secretario de Actas y Reglamentos

Dr. Diego Gustavo Faingold

Secretario de Relaciones Institucionales

Dr. Jesus Maria Roy

Secretario de Regiones, Filiales y Delegaciones

Dr. Ernesto Raul Aida

Secretaria de Subcomisiones, Comités y Grupos de Trabajo

Dra. Lilia E. Garboto

Secretaria de Medios y Relaciones Comunitarias

Dra. Gloria Muzzio de Califano

Vocal 1º

Dr. Miguel Angel Naser

Vocal 2º

Dra. Angela Gentile

Vocal 3º

Dr. Eduardo Ramos

Coordinación Técnica

Dr. F. Alejandro Mohr

Inscripción Per. Jurídica Nº C 4029
Registro Nac. de Instituc. N. 0159

1^{ras.} Jornadas Argentinas de Inmunología Pediátrica 7^{ma.} Reunión del Grupo Latinoamericano de Inmunodeficiencias (LAGID)

Por el presente certificamos que

Dias-da-Motta, P.M.; Whitney, C.B.; Saad, S.T.O.; Costa, F.F.; Newburger, P.E.; Condino-Neto, A.

han presentado el **TRABAJO LIBRE**

- Presentación: Orales II-

"Upregulation of gp91 phox gene expression in mononuclear leukocytes from sickle cell anemia patients."

en el 1^{ras.} Jornadas Argentinas de Inmunología Pediátrica – 7^{ma.} Reunión del Grupo Latinoamericano de Inmunodeficiencias (LAGID).

Buenos Aires, 19 de Octubre de 2001

Dr. Matías Oleastro
Secretario Científico

Dra. Marta Zelazko
Presidenta

AV. CORONEL DIAZ 1971/75 - (1425) BUENOS AIRES - REPUBLICA ARGENTINA - TELEFAX (54-11) 4821-8612
Correo Electrónico: sap@sap.org.ar - Internet: http://www.sap.org.ar

[2029] Upregulation of gp91^{phox} Gene Expression in Mononuclear Leukocytes from Sickle Cell Anemia Patients.

Percicles M. Dias-de-Motta, Constance B. Whitney, Sarah T.O. Saad, Fernando F. Costa, Peter E. Newburger, Antonio Condino-Neto, Centro de Investigaçao em Pediatria, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, S.P., Brazil; Dept. Pediatrics, Univ. Massachusetts Medical School, Worcester, MA; Hemocentro, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, S.P., Brazil

Monday, December 10, 2001, 10:00 AM, Poster Session: Sickle Cell Disease: Basic Investigation (10:00 AM-6:30 PM) Hall C, Poster Board Number 14

Sickle cell anemia (SCA) is a genetic disorder affecting red blood cells and characterized by chronic hemolysis and episodic vaso-occlusive crises. A single point mutation results in a clinically heterogeneous disorder, suggesting that different mechanisms may be involved in this disease. It is still not completely understood how sickle erythrocytes interrupt blood flow. Current evidence indicates that endothelial damage and subclinical inflammation contribute to the initiation and progression of vascular occlusion. The role of leukocytes in the tissue injury of SCA patients is a current subject of investigation. The NADPH oxidase system of professional phagocytes catalyzes the one electron reduction of oxygen to superoxide anion, a potential tissue injury mediator. We have previously shown an increased release of superoxide anion by mononuclear leukocytes from SCA patients (Dias da Motta et al., *Br. J. Haematol.*, 93: 333-340, 1996). In the present study we have investigated the expression of the gene encoding gp91^{phox}, the heavy chain component of cytochrome b558 of the phagocyte NADPH oxidase, in mononuclear leukocytes of SCA patients. Total RNA obtained from mononuclear leukocytes of 21 steady state SCA patients (without recent or ongoing infection) and 23 comparable healthy individuals subjects was used in a quantitative-relative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). This technique uses 2 pairs of primers set in a single PCR reaction, one to amplify cDNA of gp91^{phox} and the other to amplify a internal control (18S-rRNA) to normalize the results. We determined the relative levels of gp91^{phox} gene expression in SCA and healthy individuals. The median relative level of gp91^{phox} gene expression in mononuclear leukocytes of SCA patients was 0.57 (range 0.086 - 1.6). In healthy controls, the relative level was 0.37 median (range 0.15 - 0.82). These results indicate that gp91^{phox} gene expression in mononuclear leukocytes of SCA was significantly higher than in healthy individuals (p=0.03, Mann-Whitney test). Transcription factors such as NF- κ B and AP-1, which are redox-sensitive, have been shown to be activated during oxidative stress and inflammation, leading to the upregulation of a number of pro-inflammatory genes in endothelial cells including E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1, intercellular adhesion molecule-1, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Thus the observed upregulation of gp91^{phox} gene expression in mononuclear leukocytes may serve, at least in part, to dysregulate the microvascular bed and to amplify and maintain inflammation in SCA.

Keywords: Phagocyte | NADPH oxidase | Sickle cell

Supported by an unrestricted educational grant from AstraZeneca.
Page 1