

ANDRÉIA AVERCI CANALLI

**AÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO E DA VIA DEPENDENTE DE
GUANOSINA MONOFOSFATO CÍCLICO NAS
PROPRIEDADES ADESIVAS DE LEUCÓCITOS DE
PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**



UNICAMP

CAMPINAS

2008

ANDRÉIA AVERCI CANALLI

**AÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO E DA VIA DEPENDENTE DE
GUANOSINA MONOFOSFATO CÍCLICO NAS
PROPRIEDADES ADESIVAS DE LEUCÓCITOS DE
PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para a Obtenção do Título de Doutor em Clínica
Médica área de concentração em Ciências Básicas.*

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Nicola Conran Zorzetto

CAMPINAS

2008

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

C16a Canalli, Andréia Averci
Ação do óxido nítrico e da via dependente de guanosina monofosfato cíclico nas propriedades adesivas de leucócitos de pacientes com anemia falciforme / Andréia Averci Canalli. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

Orientadores : Fernando Ferreira Costa, Nicola Conran Zorzetto
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Adesão. 2. Leucócitos. 3. Óxido Nítrico. 4. Anemia Falciforme. I. Costa, Fernando Ferreira. II. Zorzetto, Nicola Conran. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês : Role of nitric oxide and the cyclic guanosine monophosphate dependent pathway on the adhesive properties leucocytes of sickle cell disease patients

Keywords: • Adhesion
• Leucocytes
• Nitric oxide
• Sickle Cell

Titulação: Doutor em Clínica Médica
Área de concentração: Ciências Básicas

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa
Prof. Dr. Aderson da Silva Araújo
Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
Profa. Dra. Helena Zerlotti Wolf Grotto
Profa. Dra. Maria Stella Figueiredo

Data da defesa: 29 - 02 - 2008

Banca Examinadora da TESE DE DOUTORADO

Orientador(a): PROF.(a) DR. (a) FERNANDO FERREIRA COSTA

Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Anderson da Silva Araújo _____
2. Prof(a). Dr(a). Maria Stella Figueiredo _____
3. Prof.(a). Dr(a). Helena Zerlotti Wolf Grotto _____
4. Prof(a). Dr(a). Carmen Silvia Bertuzzo _____
5. Prof(a). Dr(a). Fernando Ferreira Costa _____

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Clínica Médica da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 29/02/2008

Dedicatória

*Aos meus pais Diva e José, que com
compreensão, incentivo, paciência e acima de
tudo com grande amor, proporcionaram a
concretização de mais esse sonho...*

*Ao meu marido Sérgio, pelo companherismo,
apoio e pelo incentivo para poder prosseguir em
todos os momentos...*

AGRADECIMENTOS

*Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa, pela receptividade, orientação, confiança e estímulo nas atividades desenvolvidas neste período;

*À Profa. Dra. Nicola Conran, pela orientação, amizade e companherismo em todo o tempo;

*Ao meu querido Sérgio, pela dedicação, apoio, amor e carinho, que tornaram estes anos mais fáceis;

*Aos meus queridos pais, Diva e José, as maiores dádivas que Deus me deu;

*À Marina e Gustavo, pelos momentos de alegria, carinho e entendimento em todos estes anos

*Aos meus irmãos Carmen, Márcia, Paulo e Humberto, pela compreensão e carinho em todo momento

*A toda minha família, D. Lourdes, Paula, Hérica, Ana, Márcio, Cláudio Leila e Luciano pelo apoio e carinho

*Às crianças queridas da minha vida Thais, Cinthia, Flávia, Clara, Mariana e Marcelo pela alegria ;

*Aos meus amigos do Hemocentro que participaram deste importante momento, somando o saber e o crescimento;

*A Nic, Fabíola ,Carla , Flávia , Patys, Dú, Carol, Renata, Anderson por todo o apoio em todo o tempo e a qualquer hora;

*Aos pacientes e ao pessoal da coleta de sangue e todos aqueles que de alguma forma contribuíram com este trabalho;

*Ao CNPq pelo apoio financeiro.

*“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original”*

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1 –INTRODUÇÃO.....	17
1.1 História da anemia falciforme	17
1.2 Anemia falciforme.....	18
1.3 Fisiopatologia da anemia falciforme	18
1.4 Vaso-oclusão	19
1.5 Mecanismos de adesão de leucócitos	20
1.6 Moléculas de adesão.....	21
1.7 Óxido nítrico.....	22
1.8 Hidroxiurea e o NO	25
1.9 Nucleotídeos cíclicos e a AF	26
1.10 Drogas mediadoras na via NO/nucleotídeos cíclicos.	26
2-OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo geral	29
3.1 3- Material e Métodos	31
Casuística.....	31
Pacientes e controles.....	31
3.1 Material.....	31
3.2 Delineamento da Investigação.....	32
3.3 Contagem dos neutrófilos no sangue periférico	32
3.4 Isolamento de neutrófilos do sangue periférico.....	32
3.5 Preparação de lâminas em citocentrífuga	33
3.6 Dosagem do nitrito e nitrato nos neutrófilos	33
3.7 Dosagem do GMPc e AMPc nos neutrófilos em suspensão	33
3.8 Tratamento de neutrófilos com doadores de NO/ análogos de GMPc/ análogos de AMPc.....	34
3.9 Ensaio de adesão de neutrófilos	34
3.10 Citometria de Fluxo.....	35
3.11 Análise estatística	36
4-RESULTADOS	38
4.1 Características clínicas dos pacientes.....	38

4.2 Ensaio de adesão celular dos neutrófilos.....	38
4.2.1 Padronização do método do ensaio de adesão à FN.....	38
4.2.2 Adesão estática <i>in vitro</i> de neutrófilos de pacientes com AF (SS e SSHU) e controles	40
4.3 Dosagem intracelular do GMPc nos neutrófilos isolados de controles AA e de pacientes com AF (SS e SSHU).	42
4.4 Níveis intracelulares dos metabólitos de NO (NOx).....	42
4.5 Efeito <i>in vitro</i> do doador exógeno de óxido nítrico, o nitroprussiato de sódio (SNP), na adesão dos neutrófilos à FN e ao ICAM-1.	43
4.6 Efeito <i>in vitro</i> do doador exógeno de óxido nítrico, o “Diethylamine NONOate” (DEANO), na adesão dos neutrófilos à FN e ao ICAM-1.....	44
4.7 Efeito <i>in vitro</i> do ativador da guanilato ciclase, o BAY 41-2272 na adesão dos neutrófilos à FN e ao ICAM-1.....	45
4.8 Efeito <i>in vitro</i> do inibidor da guanilato ciclase, o 1H- [1,2,4] Oxidiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ) na adesão dos neutrófilos à FN na presença dos doadores de NO	46
4.9 Efeito do doador de NO, o SNP, na expressão das integrinas de neutrófilos controles e neutrófilos de pacientes com AF (SS e SSHU)	46
4.10 Dosagem do AMPc intracitoplasmático nos neutrófilos controles AA e pacientes com AF (SS e SSHU).....	47
4.11 Efeito <i>in vitro</i> do inibidor da PKA, o KT5720 e o inibidor da PKG, o KT 5823 na adesão dos neutrófilos à FN.	48
4.12 Efeito <i>in vitro</i> dos inibidores de PKG e PKA na adesão dos neutrófilos à FN estimulados com IL-8	49
4.13 Efeito da quimiocina IL-8 e dos inibidores de PKA e PKG na adesão dos neutrófilos de pacientes com AF em uso de HU (SSHU -30mg/kg/dia).....	50
5.1 Discussão	53
6.1 Conclusões.....	59
7.1 Referências Bibliográficas.....	61
8. ANEXOS	72

LISTA DE ABREVIATURAS

AA- Indivíduos controles sadios

AF- Anemia falciforme

AMPc- Adenosina monofosfato cíclico

BSA- Soro albumina bovina

CR- Receptor complementar

DEANO- Diethylamine NONOate

FAK- Quinase de adesão focal

f.MLP- Formil metilonil leucil fenilalanina

FN- Fibronectina

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

GMPC- Guanosina monofosfato cíclico

GTP- Guanosina trifosfato

HbS- Hemoglobina S

HbF- Hemoglobina fetal

HU- Hidroxiurea

ICAM-1- Molécula de adesão intercelular

IL-8- Interleucina 8

LFA- Antígeno de linfócito funcional

MFI- Intensidade média de fluorescência

MPO- Enzima mieloperoxidase

NO- Óxido nítrico

ODQ- [1H-(1,2,4)oxadiazolo(4,3-a)quinoxalin-1-one]

PAF- Fator ativador de plaquetas

PBS- Salina tamponada fosfatada

PDE- Fosfodiesterase

PKA- Proteína quinase A

PKG- Proteína quinase G

SNP- Nitroprussiato de sódio

SS- Paciente com anemia falciforme

SSHU- Paciente com anemia falciforme que tomaram hidroxiurea

TNF- Fator de necrose tumoral

VCAM-1- Molécula de adesão vascular

VLA-4 Antígeno muito tardio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A e B. Curvas padrões típicas de células de pacientes com AF (A)/controle (B). ...	39
Figura 2. (A) e (B). Adesão basal dos neutrófilos isolados de controles AA e de pacientes com AF (SS e SSHU) à FN (A) e ao ICAM-1 (B).	41
Figura 3. A dosagem de GMPc (A) foi realizada após a extração e realização do Kit de GMPc nos neutrófilos isolados dos controles e pacientes com AF (SS e SSHU) 42	
Figura 4. Adesão dos neutrófilos isolados de controles AA e de pacientes com AF à FN (A) e ao ICAM-1 (B).....	43
Figura 5. Adesão dos neutrófilos isolados de controles AA e de pacientes com AF (SS) à FN (A) e ao ICAM-1 (B).	44
Figura 6. Adesão dos neutrófilos isolados de controles AA e pacientes com AF (SS) à FN (A) e ao ICAM-1 (B).	45
Figura 7. Adesão basal dos neutrófilos isolados de pacientes com AF (SS) à FN e a co-incubação dos neutrófilos isolados de pacientes com AF (SS) com 1µM DEANO ou 10µM SNP na presença ou ausência do inibidor da guanilato ciclase (10µM ODQ).....	46
Figura 8. Dosagem do AMPc intracelular nos neutrófilos controles e pacientes com AF SS e SSHU.....	48
Figura 9. O aumento da adesão dos neutrófilos à FN é revertido pelo inibidor de PKA... 49	
Figura 10. Os neutrófilos isolados de controles e pacientes com AF (SS) foram estimulados com IL-8 e o efeito da co-incubação dos neutrófilos com inibidor da PKA e da PKG foi observado.....	50
Figura 11. Os neutrófilos de pacientes com AF (SSHU) foram estimulados com IL-8 e o efeito da co-incubação com KT 5720 sobre esse estímulo foi observado na adesão.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela I.	Detalhes clínicos dos pacientes com AF que participaram do estudo	38
Tabela II.	Níveis de metabólitos de NO (nitrito e nitrato) dosados em neutrófilos isolados de controles e pacientes com AF (SS e SSHU).	42
Tabela III.	A expressão de CD11a, CD11b e CD49d na superfície dos neutrófilos controles e de pacientes com AF (SS e SSHU), foi determinada por citometria de fluxo.	47

RESUMO

A hemoglobina S (HbS) é decorrente de uma mutação de ponto que ocasiona a troca do ácido glutâmico pela valina na cadeia polipeptídica da globina beta. A polimerização da HbS desoxigenada (pouco solúvel), torna as hemácias menos flexíveis e favorece a impactação das mesmas na microcirculação com subsequente obstrução da luz do endotélio e vaso-oclusão, seguida de lesões a órgãos alvos, responsáveis pela morbi-mortalidade associada a essa doença. Numerosas evidências sugerem que outros fatores participem da fisiopatologia da vaso-oclusão e do processo inflamatório crônico característico da anemia falciforme (AF). A redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) pode ser um fator que favoreça a vaso-oclusão, uma vez que ele é um gás vasodilatador e pode inibir a adesão leucocitária. Nesse contexto, os objetivos do presente trabalho foram avaliar as propriedades adesivas dos neutrófilos de pacientes com AF e investigar o papel da via de sinalização do NO e dos nucleotídeos cíclicos (AMPc e GMPc) nos processos de vaso-oclusão na AF. Os neutrófilos de pacientes com AF apresentaram maior adesão *in vitro* para ambos ligantes, fibronectina (FN) e molécula de adesão intercelular (ICAM-1), quando comparados à adesão de neutrófilos de controles. A co-incubação dos neutrófilos de pacientes com AF com agentes doadores de NO, nitroprussiato de sódio (SNP), dietilamina NANOato (DEANO) e com estimulador da guanilato ciclase solúvel (GCs), BAY 412272, diminuíram significativamente o aumento da adesão dos neutrófilos à FN e ao ICAM-1. O oxidiazolo [4,3-a]quinoxalin-1-one, um inibidor da GCs, reverteu a inibição da adesão provocada pelo SNP e DEANO à FN, indicando que a sinalização dependente de GMPc participa desse mecanismo. Os níveis intracelulares de GMPc foram significativamente maiores nos neutrófilos de pacientes que fizeram uso de terapias com hidroxiurea (HU). Em concordância com esses resultados, a adesão dos neutrófilos à FN e ao ICAM-1 foi significativamente menor em pacientes com AF em uso de HU se comparada com os neutrófilos de pacientes com AF sem terapia com HU. Adicionalmente, a co-incubação dos neutrófilos de pacientes com AF com KT5720 (um inibidor de PKA) reduziu a adesão basal enquanto que a co-incubação das células com KT5823 (inibidor de PKG) não alterou a adesão dos neutrófilos à FN. O estímulo dos neutrófilos de pacientes com AF com interleucina 8 (IL-8) aumentou significativamente a adesão à FN e esse aumento na adesão

foi reduzido pela KT5720. Esses dados indicam que a regulação da sinalização da via dependente de AMPc tem um importante papel na alteração das propriedades adesivas nos pacientes com AF. Tal alteração pode ter implicação na fisiopatologia da AF e tanto a via PKA dependente de AMPc pode representar um alvo terapêutico para reduzir a alteração na função leucocitária, como agentes que estimulam a via de NO dependente de GMPc podem ter efeitos benéficos na função leucocitária desses pacientes.

ABSTRACT

Increased leukocyte adhesion to vascular endothelium contributes to vaso-occlusion in sickle cell disease (SCD). Since nitric oxide (NO) bioavailability is decreased in SCD and NO may inhibit leukocyte adhesion, we determined whether stimulation of NO-signalling pathways can decrease the adhesive properties of neutrophils from SCD individuals (SCDneu). SCDneu presented greater adhesion, *in vitro*, to both fibronectin (FN) and ICAM-1 than control neutrophils; co-incubation of SCDneu with the NO-donor agents, sodium nitroprusside (SNP) and diethyleamine NONOate (DEANO), and the guanylate cyclase stimulator, BAY41-2272, all significantly diminished increased adhesion to FN/ICAM-1. Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one, a guanylate cyclase inhibitor, reversed SNP/DEANO-diminished adhesion to FN, implicating cGMP-dependent signalling in this mechanism. Interestingly, intracellular cGMP was significantly higher in neutrophils from SCD individuals on hydroxyurea (SCDHUneu) and, accordingly, SCDHUneu adhesion to FN/ICAM-1 was significantly lower than that of SCDneu. In addition, co-incubation of SCDneu with KT5720 (an inhibitor of PKA), but not KT5823 (inhibitor of PKG), abrogated increased basal SCDneu adhesion. Stimulation of SCDneu with IL-8 also significantly augmented SCDneu adhesion to FN and this increase in adhesion was abolished by KT5720. Data indicate that up-regulated cAMP signalling plays a significant role in altered adhesive properties in SCDneu. Such alterations may have significant implications for the pathophysiology of the disease and the cAMP-PKA pathway may represent a therapeutic target for the abrogation of altered leukocyte function. Agents that stimulate the NO/cGMP-dependent pathway may have beneficial effects on leukocyte function if used in these individuals.

Keywords: Adhesion; Leukocyte; Nitric oxide; Sickle cell disease; Vaso-occlusion.

INTRODUÇÃO

1 –INTRODUÇÃO

1.1 História da anemia falciforme

Eritrócitos em forma de foice foram vistos pela primeira vez por Herrick em 1910, no sangue de um indivíduo anêmico de raça negra, embora as manifestações clínicas da doença já fossem conhecidas séculos antes na África Ocidental (HERRICK, 1910). No Brasil, a primeira referência a um paciente com anemia falciforme se deve a (CASTRO, 1933). PAULING et al ., (1949) demonstraram que indivíduos com o diagnóstico de anemia falciforme possuíam alteração na migração eletroforética da hemoglobina que diferia da normal pela ausência de duas cargas negativas e inauguraram, assim, um novo capítulo na medicina: o das moléstias moleculares (PAULING et al., 1949). INGRAN, (1956) demonstrou que a mobilidade eletroforética alterada na HbS era devido a uma herança hereditária que ocasionava alteração na sequência da proteína, com troca do aminoácido ácido glutâmico por uma valina (INGRAN, 1956).

A anemia falciforme originou-se na África, foi trazida às Américas pela imigração forçada dos escravos, e é atualmente encontrada em toda a Europa e em grandes regiões da Ásia. No Brasil, a distribuição da AF é heterogênea, sendo mais frequente onde a proporção de antepassados negros na população é maior (nordeste) (CARDOSO e GUERREIRO, 2006).

Uma das características dessa doença é a sua variabilidade clínica, dependente principalmente de fatores hereditários, e fatores adquiridos. Três características geneticamente determinadas têm importância na gravidade da evolução clínica: os níveis de hemoglobina fetal (HbF), a concomitância de alfa-talassemia e os haplótipos associados ao gene da HbS. Os níveis de HbF são inversamente proporcionais à gravidade da doença (STEINBERG e ADEWOYE, 2006). Há cinco diferentes haplótipos associados ao gene da HbS (Senegal, Benin, Bantu, Camarões e Árabe- Indiano). A AF associada aos haplótipos Senegal e Árabe-Indiano é muito mais benigna do que aquelas associadas aos demais haplótipos. No Brasil predomina o haplótipo Bantu seguido pelo Benin, com prevalência de formas mais graves da doença (ZAGO et al., 1992).

1.2 Anemia falciforme

A AF é a doença hereditária monogênica mais comum no Brasil. A causa da doença é uma mutação de ponto (GAG→GTG) no gene da globina beta, que origina uma hemoglobina anormal, denominada HbS, ao invés da hemoglobina normal, denominada hemoglobina A (HbA). Essa mutação leva à substituição de um ácido glutâmico por uma valina na sexta posição da cadeia beta, com conseqüente modificação físico-química na molécula da hemoglobina. Essas moléculas podem sofrer polimerização, com falcização das hemácias, ocasionando encurtamento da vida média dos glóbulos vermelhos, fenômenos de vaso-oclusão, episódios de dor e lesão de órgãos alvos (STEINBERG, 1999).

Em geral, os pais de um paciente com AF são portadores assintomáticos de um único gene afetado (heterozigotos), produzindo HbA e HbS (AS), transmitindo cada um deles o gene alterado para a criança, que assim recebe o gene anormal em homozigose. O nome de AF é reservado apenas para indivíduos que têm o gene homozigoto SS.

Essa doença tem como característica anemia hemolítica crônica e fenômenos vaso-oclusivos com conseqüentes complicações que podem afetar órgãos e sistemas e reduzir a expectativa de vida: episódios de dores osteoarticulares, infecções recorrentes, enfartes pulmonares, acidente vascular cerebral (AVC) e retardo do crescimento e maturação sexual (STEINBERG e ADEWOYE, 2006).

1.3 Fisiopatologia da anemia falciforme

A alteração na seqüência de aminoácidos da HbS ocasiona a polimerização de suas moléculas quando reduzidas (desoxigenadas). Alguns dados experimentais indicam que, como consequência da substituição, poderia ocorrer uma perda da estrutura helicoidal desta região. A HbS na conformação oxigenada é isomorfa à hemoglobina normal, sugerindo que a estrutura das duas moléculas (exceto pela substituição do aminoácido) é similar.

A HbS, quando desoxigenada *in vitro* sob condições próximas às fisiológicas, torna-se menos solúvel e agrega-se em longos polímeros. Esses polímeros resultam do alinhamento de moléculas de HbS unidas por ligações não covalentes, que são denominadas polimerização, agregação ou gelificação. A polimerização da desoxi-hemoglobina S depende de numerosas

variáveis, como concentração de oxigênio, pH, concentração de HbS, temperatura, pressão, força iônica e presença de hemoglobinas normais e anormais (STEINBERG, 1999).

A polimerização da HbS é o evento fundamental na fisiopatologia da AF, resultando na alteração da forma do eritrócito e na acentuada redução de sua deformabilidade. As células rígidas, que assumem a forma de foice, participam da oclusão vascular e lesão de tecidos que representam os fenômenos principais dessa doença (COSTA, 2004).

1.4 Vaso-oclusão

Os mecanismos conducentes à vaso-oclusão na anemia falciforme são complexos e ainda não completamente conhecidos. A vaso-oclusão pode ocorrer quando há lentidão no fluxo dos eritrócitos através dos leitos capilares, com maior desoxigenação da HbS, e conseqüente polimerização. Como a aderência dos eritrócitos ao endotélio vascular pode impedir o fluxo de sangue e aumentar o tempo de trânsito nos capilares, sugere-se que o aumento da aderência celular possa iniciar e propagar o fenômeno de vaso-oclusão. A rigidez destas hemácias deformadas (hemácias em forma de foice) contribui para oclusão vascular que caracteriza a crise aguda da doença e é a maior causa de morbidade (DAVIS e BROZOVIC, 1989; PLATT et al., 1994). Os mecanismos fisiopatológicos da vaso-oclusão permanecem controversos, embora alguns pesquisadores concordem que o aumento da ligação entre os eritrócitos falcizados ao endotélio vascular seja um importante fator neste fenômeno complexo. (HEBBEL, 1997). É provável que outros fatores tais como proteínas do plasma, citocinas, plaquetas, eritrócitos (DUSTI et al., 1998; KASSCHAU et al., 1996) e anormalidades endoteliais (SOLOVEY et al., 1997) estejam envolvidos na vaso-oclusão. Outras evidências também sugerem que os leucócitos polimorfonucleares (PMNs) tenham papel importante nos fenômenos vaso-oclusivos e na fisiopatologia da AF por se aderirem ao endotélio e aos eritrócitos, contribuindo assim para o bloqueio do fluxo sanguíneo. Além disso, crises de falcização na AF são frequentemente associadas à infecção e leucocitose. A leucocitose tem sido correlacionada com o aumento do índice de morte prematura em crianças com AF, síndrome torácica aguda e acidente vascular cerebral (AVC). (PLATT et al., 1994; MILLER et al., 2000).

As interações moleculares, responsáveis pela adesão das hemácias falcizadas e pelos leucócitos ao endotélio, são mediadas por moléculas de adesão na superfície das células, como

particularmente as integrinas e por VCAM-1, presentes nas células endoteliais. Nos leucócitos as principais moléculas de adesão são as integrinas, capazes de se ligarem aos componentes da matriz extracelular e às camadas endoteliais (SOLOVEY et al., 2001).

1.5 Mecanismos de adesão de leucócitos

A adesão de leucócitos aos sítios de inflamação no endotélio envolve um processo de múltiplos passos que é desencadeado pela adesão mediada pela selectina. Essa primeira etapa é instável. A expressão de selectina no endotélio é induzida pela inflamação, e é seguida pela ativação da integrina β_2 nos leucócitos induzidos por mediadores inflamatórios produzidos pelo endotélio ou pela camada de tecido inflamado, culminando numa forte adesão da integrina β_2 aos seus receptores na parede vascular (BUTCHER, 1991; HYNES e LANDER, 1992).

O mecanismo pelo qual ocorre o aumento da adesão de neutrófilos de pacientes com AF não está claro, embora tenham sido mostradas alterações envolvendo o aumento da expressão de integrinas Mac-1 nessas células (ASSIS et al., 2004; OPKALA, 2002).

Adicionalmente, estudos clínicos mostraram que contagens elevadas de leucócitos são comuns nesses pacientes (DIGGS, 1932; BOGGS et al., 1973). As contagens de glóbulos brancos acima de 15000 células/ μ l estão associadas ao aumento do risco de morte prematura de indivíduos portadores dessa síndrome (PLATT et al., 1994).

Evidências de interações dos eritrócitos falcizados com as plaquetas e com os leucócitos, a formação de citocinas inflamatórias e outros fatores adicionais levam a um defeito endotelial. Todos esses fatores foram sugeridos como moduladores do fenômeno obstrutivo vascular que caracteriza a AF (KASSCHAU et al., 1996; SOLOVEY et al., 1997).

Em 1996, Kasschau e colaboradores mostraram que os neutrófilos e eritrócitos de pacientes com AF são mais aderentes à fibronectina (FN), além disso, os neutrófilos de pacientes em crise de falcização são mais aderentes à camada endotelial (KASSCHAU et al., 1996). Em 2004, Assis e colaboradores mostraram que a co-incubação dos neutrófilos de pacientes falciformes com IL-8 aumentou a expressão da integrina Mac-1 (ASSIS et al., 2004). Técnicas de microscopia intravital empregando camundongos transgênicos para AF revelaram que os leucócitos podem iniciar o processo vaso-oclusivo. Após um estímulo inflamatório, os leucócitos

são recrutados para o endotélio ativado da vênula pós-capilar e subseqüentemente formam interações adesivas com os eritrócitos circulantes. A partir daí, os eritrócitos falcizados aderem, levando à redução do fluxo sanguíneo e finalmente a vaso-oclusão (TURHAN et al.; FRENETTE, 2002). Outro estudo revelou que camundongos transgênicos para AF com deleção P-E selectinas apresentaram redução significativa do recrutamento de leucócitos e diminuição da vaso-oclusão (TURHAN et al., 2002), enfatizando o papel crucial do recrutamento e adesão dos leucócitos nesse processo. Em camundongos transgênicos para AF, os neutrófilos parecem ser os leucócitos que mais participam no processo vaso-oclusivo (CHIANG et al., 2007). Em humanos, os eosinófilos foram encontrados em número elevado nos pacientes com AF e, em ensaios estáticos de adesão, mostraram aumento de suas propriedades adesivas, sugerindo um estado ativado e participação no fenômeno vaso-oclusivo (CANALLI et al., 2004). Embora existam diferentes evidências da participação dos leucócitos no mecanismo de vaso-oclusão, o papel dos neutrófilos na fisiopatologia da AF precisa ainda ser melhor elucidado, juntamente com suas interações moleculares mediadas pelas moléculas de adesão.

1.6 Moléculas de adesão

As moléculas de adesão são divididas em 4 grandes grupos classificados a seguir: a) família das imunoglobulinas (Ig SF), que inclui moléculas de adesão vascular (VCAM-1), intercelular (ICAM-1), moléculas de adesão às mucosas (MadCAM) e endotelial-plaquetária (PECAM); b) família das Proteoglicanas, que podem ligar-se aos componentes da matriz extracelular; c) família das selectinas, que inclui E-selectinas presentes no endotélio, L-selectinas (nos leucócitos) e P-selectinas (nas plaquetas); d) família das integrinas presentes nos leucócitos e eritrócitos (SHIMIZU e SHAM., 1991).

As imunoglobulinas estão envolvidas na adesão célula-célula. A ICAM-1 apresenta pequena expressão constitutiva nos monócitos e nas células endoteliais, mas sua maior expressão é durante os processos inflamatórios; as integrinas Mac-1 e LFA-1 são seus ligantes (CRONSTEIN e WEISSMANN 1993; MULLER e RANDOLPH, 1999). Três outras ICAMs foram identificadas posteriormente: ICAM-2, ICAM-3 e ICAM-4. A VCAM-1 está envolvida nas interações leucócitos-endotélio e o ligante para essa molécula é a integrina VLA-4 (MULLER e RANDOLPH, 1999).

As integrinas são proteínas de superfície celular heterodímeras, constituídas por 2 cadeias polipeptídicas α e β , que atuam como mediadoras no processo inflamatório, exercendo importantes papéis nas etapas de adesão leucocitária, quimiotaxia, fagocitose, adesão endotelial e, por fim, agregação. Existem inúmeras subfamílias de integrinas e todos os membros de cada família possuem em comum uma cadeia β e uma cadeia α singular. São conhecidas até hoje 16 subunidades α , 8 subunidades β , e várias combinações entre estas subunidades. Como resultados dessas combinações foram descritos 20 diferentes tipos de integrinas, subclassificados dentro de 8 famílias estruturalmente distintas (YUSUF-MAKAGIANSAR et al., 2002).

A integrina β_1 (subfamília VLA) exerce importante função de adesão, sinalização de moléculas e migração de células durante a embriogênese. A subfamília VLA é composta por 6 membros VLA-1 (CD49a/CD29), VLA-2 (CD49b/CD29), VLA-3 (CD49c/CD29), VLA-4 (CD49d/CD29), VLA-5 (CD49e/CD29) e VLA-6 (CD49f/CD29). As moléculas da subfamília VLA são distribuídas em diferentes tecidos e interagem predominantemente com as proteínas da matriz extracelular, tais como a laminina, colágeno e fibronectina. O VLA-4 é expresso em monócitos, linfócitos T e B, basófilos e eosinófilos, mas não em neutrófilos. Após ativação, os neutrófilos podem expressar a integrina VLA-4 cuja função é ancorar a célula ao endotélio por se ligar ao VCAM-1 (YUSUF-MAKAGIANSAR et al., 2002; FRENCH et al., 1997).

Os leucócitos também expressam a subfamília integrina β_2 , a qual é composta de 3 distintas moléculas LFA-1 (CD11a/CD18; $\alpha_L\beta_2$), Mac-1 (CD11b/CD18; $\alpha_M\beta_2$) e p150/95 (CD11c/CD18; CR3). Os receptores para a integrina β_2 são membros da superfamília de imunoglobulina (Ig SF), incluindo ICAMs, VCAM-1, PECAM e MadCam.

1.7 Óxido nítrico

Recentemente tem sido de muito interesse o entendimento do papel fisiopatológico e farmacológico do óxido nítrico (NO), um importante vasodilatador fisiológico. Além disto, devido à disfunção endotelial nos pacientes falciformes, os níveis de endotelina (vasoconstritor) são maiores que os níveis de NO (vasodilatador) contribuindo para a vasoconstrição. Os dados da literatura sugerem que o NO pode ter um papel importante na fisiopatologia da anemia

falciforme, particularmente durante o *stress* oxidativo (MACK e KATO, 2006; WALTER et al., 2006; WOOD e GRANGER, 2007).

O óxido nítrico, um gás e um radical livre muito reativo, é um dos maiores reguladores do tônus vascular, especificamente arteriolar (GLADWIN E SCHECHTER, 2001). Existem três formas da enzima que produz o NO, as óxido nítrico sintase (NOS), que são: a eNOS produzida no endotélio, a bNOS produzida no cérebro e a iNOS que é a enzima induzida. O NO formado pelo endotélio (eNOS) é responsável por manter o baixo tônus vascular, inibir a adesão dos leucócitos e a agregação plaquetária (IGNARRO, 2002). O NO formado constitutivamente pelo neurônio (bNOS) atua como um neuro-modulador ou neuro-mediador em alguns neurônios centrais e periféricos. O NO formado pela iNOS, presente em macrófago e em outras células, tem papel múltiplo na resposta inflamatória (MICHEL e FERON, 1997). A elevação de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) por ativação da enzima guanilato ciclase (principal receptor de NO) é responsável pela vasodilatação e por outras funções fisiológicas regulatórias de NO (IGNARRO, 2002). A ativação da guanilato ciclase leva ao aumento intracelular de GMPc, o qual torna ativada a quinase dependente de GMPc que media a ação de NO, incluindo o vaso-relaxamento, aumento da permeabilidade vascular, bem como os efeitos antiproliferativos, anti-plaquetários e antioxidantes do óxido nítrico (LUGNIER ET AL, 1999).

Os pacientes com AF podem apresentar diminuição da produção de NO pelo endotélio. Existem 3 grandes mecanismos de redução da biodisponibilidade do NO na AF (MACK e KATO, 2006): pela diminuição da L-arginina, pelo consumo de NO através das espécies reativas de NO (ROS) e, talvez o mais importante, pelo consumo de NO através da hemoglobina livre no plasma. O substrato L-arginina para a produção de NO através da enzima NOS pode também ser degradado para ornitina na presença da enzima arginase. A arginase é encontrada em alta concentração em eritrócitos jovens e sob hemólise intravascular. Assim, a L-arginina plasmática é transformada em ornitina, diminuindo assim, a disponibilidade de L-arginina para a produção de NO (KATO et al., 2007; MORRIS, 2006). O NO pode também ser consumido pelo excesso de ROS no plasma e no endotélio dos pacientes com AF. Finalmente, outro fator que também contribui para a redução da biodisponibilidade de NO nos pacientes com AF, é o consumo de NO através da hemoglobina livre no plasma, liberada durante a hemólise. A hemoglobina livre no plasma reage com o NO produzindo metahemoglobina e nitrato. A diminuição do NO facilita

a vasoconstrição, aumenta a ativação plaquetária, e a adesão endotelial e leucocitária levando ao processo vaso-oclusivo (KATO et al., 2007).

Muitas investigações mostraram que o NOx plasmático (níveis de nitrato e nitrito) e L-arginina (o substrato para a enzima NOS) estão diminuídos em pacientes com AF, particularmente durante a crise vaso oclusiva, e esses níveis variam inversamente com os sintomas de dor (ENWONWU et al., 1990; LOPEZ et al., 2000; LOPEZ et al., 1996; MORRIS et al., 2000). Redução dos níveis de NOx são consistentes com a redução dos metabólitos de nitratos e nitritos da reação de NO com a hemoglobina e oxigênio.

A hemoglobina oxigenada de pacientes com AF sequestra o NO da corrente sanguínea convertendo-o em nitrato e a hemoglobina desoxigenada liga-se ao NO formando o complexo heme-nitrosil-hemoglobina. A proporção de consumo de NO pela célula livre e pela hemoglobina (Hb) intra-eritrocitária sugere que somente quando a Hb está fisicamente compartimentalizada nos eritrócitos, o NO produzido pelas células endoteliais poderá estar presente na musculatura lisa em concentração suficiente para ativar a guanilil ciclase e causar a vaso-dilatação (REITER et al., 2002; LIU et al., 1998; LANCASTER, 1997; VAUGHN et al., 1998).

Além disso, níveis aumentados de VCAM-1 solúvel, uma molécula de adesão endotelial, foram descritos no plasma de pacientes com crise vaso-oclusiva e síndrome torácica aguda e esses níveis foram inversamente proporcionais aos níveis de NOx plasmático (FRENCH et al., 1997).

Esses resultados sugerem que o aumento da expressão das moléculas de adesão, induzido pela hipóxia, citocinas e embolização de gordura, em um grupo de pacientes com produção reduzida de NO observado durante a crise vaso-oclusiva e durante a síndrome torácica, contribui para o sequestro dos eritrócitos pulmonar e sistêmico. Portanto, o NO exerce efeitos vasculares incluindo: a inibição da função plaquetária e a oxidação de lipídeos (RANDOMSKI et al., 1987), a diminuição da expressão das moléculas de adesão celular e endotelial (ZEIHER et al., 1995; TSAO et al., 1995) e a redução da proliferação e da migração na musculatura lisa (SARKAR et al., 1996; GARG e HASSID, 1989; HOGG et al., 1993).

Poucas pesquisas têm sido realizadas quanto ao papel do NO nos neutrófilos humanos e suas interações com as moléculas de adesão. Os doadores de NO inibem a adesão dos neutrófilos

humanos induzidos por TNF-alfa às células endoteliais (KOSONEN et al., 1999), a expressão de E-selectina nos neutrófilos e consequente adesão aos lipopolissacarídeos estimulados pelas células endoteliais vasculares (KOSONEN et al., 2000). O inibidor da NOS, L-NAME, aumentou a expressão de CD11/CD18 nos neutrófilos de gato (KUBES et al., 1991) e a adesão de neutrófilos humanos à FN (CONRAN et al., 2003). Além disso, a administração de NO ou espécies de doadores de NO, inibiu a adesão dos neutrófilos em modelos animais de isquemia/reperfusão, prejudicando o pulmão e causando peritonite (WAGNER e ROTH, 2000). O tratamento crônico de rato com o L-NAME inibiu a migração dos eosinófilos estimulados tanto *in vivo* como *ex-vivo* (FERREIRA et al., 1996; ZANARDO et al., 1997) e esse efeito foi ligado à transdução da via de GMPc em eosinófilos de rato (FERREIRA et al., 1998) e de humanos (CONRAN et al., 2001).

O óxido nítrico tem um papel importante na expressão de VCAM-1/ICAM-1 nas células endoteliais (DeCATERINA et al., 1995; NIU et al., 1994; KHAN et al., 1996), mas o mecanismo pelo qual o NO induz mudanças na atividade e expressão das integrinas e outras moléculas de adesão ainda é desconhecido. O doador exógeno de NO, SNP, inibe a adesão dos eosinófilos à FN e ao soro, e essa inibição é acompanhada pelo aumento intracelular dos níveis de GMPc. Esse resultado implica que a via de GMPc dependente de quinase está envolvida nos mecanismos pelos quais o NO afeta também a adesão dos eosinófilos.

1.8 Hidroxiurea e o NO

A hidroxiurea (HU) é uma droga específica do ciclo celular utilizada no tratamento de doenças mieloproliferativas e da AF. Na AF, a HU parece agir aumentando a Hb fetal, reduzindo a polimerização da HbS, a neutrofilia e algumas complicações associadas ao fenômeno vaso-oclusivo. Alguns estudos mostram que a HU é um doador de NO (GLADWIN et al., 2002). Ela pode ser oxidada pela hemoglobina e formar a nitrosilhemoglobina (HbNO) e o NO, além disso pode se decompor quimica ou enzimaticamente em NO através das enzimas peroxidase, urease e catalase. Outros relatos mostram que a HU estimula a fosforilação e ativação da eNOS que resulta na produção de NO (COKIC et al., 2006). Esse efeito é modulado pelo aumento intracelular de Ca^{++} e AMPc, o qual estimula a fosforilação da Serina 1177 pela PKA (KATO et al., 2006).

1.9 Nucleotídeos cíclicos e a AF

O nucleotídeo cíclico guanosina monofosfato cíclico (GMPc) é o segundo mensageiro mais importante para o NO. O GMPc é formado à partir do GTP através da enzima guanilil ciclase (GCs), que ativa a via de proteína quinase G (PKG) dependente de GMPc liberando o K⁺ e inibindo o influxo de Ca⁺⁺ intracitoplasmático, levando à diminuição de Ca⁺⁺ e ao desligamento da miosina/actina e promovendo o relaxamento da musculatura lisa. O GMPc pode apresentar efeitos antiinflamatórios e atua diminuindo as propriedades adesivas das células (IGNARRO, 2002).

A adenina monofostato cíclico (AMPc), outro nucleotídeo cíclico, pode intermediar respostas hormonais, neurotransmissoras e apoptóticas. O AMPc é formado à partir do ATP através da enzima adenilil ciclase, estimula a proteína quinase A (PKA) dependente de AMPc, e também pode liberar o K⁺ participando do relaxamento muscular. A molécula de adesão basal B-CAM/Lu, presente nos eritrócitos de pacientes com AF, adere à laminina, presente na matriz extracelular, via interação dependente de AMPc (MURPHY et al., 2005). O grupo sanguíneo Landsteiner-Weiner (ICAM-4), expresso nos eritrócitos falcizados, pode interagir diretamente com a vitronectina utilizando a via PKA dependente de AMPc (ZENNADI et al., 2004). Outros estudos sugerem que a atividade da PKA pode ser necessária para sustentar a adesão mediada pelo conjunto das integrinas (LORENOWICZ et al., 2007; JONES, 2002) e ainda evidenciam o papel da sinalização de PKA na migração de leucócitos em associação com o aumento da expressão e da adesão da integrina Mac-1 (DEL POZO et al., 1995; ELFERINK e KOSTER 1998, 2000).

Tanto a via do GMPc como a do AMPc podem exercer importantes funções na fisiopatologia da AF, interferindo de alguma forma, no processo de adesão que é exacerbado quando as células estão ativadas ou durante a inflamação (ZHENYU et al, 2003).

1.10 Drogas mediadoras na via NO/nucleotídeos cíclicos.

Alguns fármacos ou drogas atuam diretamente ou indiretamente na via do NO/GMPc colaborando com o vaso-relaxamento endotelial. O nitroprussiato de sódio (SNP) e DEANO são

doadores exógenos de NO e atuam aumentando a concentração de GMPc intracitoplasmático. Os estimuladores independentes de NO e os ativadores da GCs representam grande inovação na investigação de novas drogas para essas vias. O primeiro grupo desses componentes compreendem os estimuladores da GCs , entre eles o BAY41-2272. Esse ativador da GCs produz um potente relaxamento de artérias e veias coronárias e sistêmicas e também reduz a pressão da reperfusão coronária em coração de ratos. Esse componente também tem propriedades antiproliferativas na musculatura lisa e efeitos anti-agregatórios nas plaquetas (EVGENOV et al., 2006). Além disso, o BAY 412272 inibiu a expressão de P-selectina em plaquetas e nas células endoteliais *in vitro* e reduziu o rolamento e a adesão dos leucócitos *in vivo*, indicando um prévio papel dessa droga na modulação da resposta inflamatória (AHLUWALIA et al., 2004). O [1H-(1,2,4)oxadiazolo(4,3-a)quinoxalin-1-one] (ODQ) é uma droga que inibe a enzima GCs interferindo na via de GMPc. O KT 5720 inibe a PKA dependente de AMPc e a KT 5823 a PKG dependente de GMPc.

Justificativa

Evidências sugerem que o NO produzido pelo endotélio é sequestrado pela hemoglobina livre no plasma, como ocorre em alguns tipos de hemólise, levando à diminuição de NO no plasma sanguíneo dos pacientes com AF. Além disso, a redução de NO estaria envolvida na expressão e função das moléculas de adesão, na síntese de citocinas e quimiocinas, e na adesão e transmigração dos leucócitos contribuindo para a vaso-constricção, agregação, adesão de plaquetas, liberação de fatores pró-coagulantes, adesão de células inflamatórias e liberação de fatores de crescimento (KATO et al., 2007).

Desse modo, o questionamento do papel da diminuição de NO na circulação sanguínea e nas alterações das propriedades adesivas de neutrófilos em pacientes com AF é relevante e pertinente. Portanto, foi nosso objetivo investigar a atuação do NO e nucleotídeos cíclicos nos processos de vaso-oclusão na AF.

OBJETIVOS

2-OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Procurar evidências de que a alteração na biodisponibilidade de NO e nucleotídeos cíclicos na circulação de pacientes com AF teria um papel central no aumento das propriedades adesivas dos neutrófilos desses pacientes e portanto no fenômeno de vaso-oclusão. Além disso, verificar a capacidade de drogas doadoras de NO, ou que atuam na sinalização dependente de nucleotídeos cíclicos, diminuir as propriedades adesivas dos neutrófilos de pacientes com AF.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 3 Material e Métodos

Casuística

Pacientes e controles

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP e aprovado sob o nº 705/2004, homologado em 18 de janeiro de 2005.

Foram selecionados pacientes com AF diagnosticados, pelo Hemocentro da UNICAMP utilizando os métodos de eletroforese de hemoglobina, cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (Variant II- Bio-Rad) e análise molecular quando pertinente.

Após a entrevista e a aceitação em participar do protocolo de pesquisa, os pacientes e controles sadios assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Foram coletados dos pacientes e controles 10 ml de sangue em heparina através de punção venosa pelas enfermeiras do Hemocentro. Dos 52 pacientes selecionados, 19 faziam uso de terapia com HU. Todos os pacientes estavam em fase estável da doença e não tinham sido realizadas transfusões nos últimos 3 meses precedentes ao estudo. O grupo de voluntários sadios foi selecionado de alunos e funcionários do hemocentro. Foram retirados 10 ml de sangue desses indivíduos para a realização dos experimentos de adesão *in vitro*. Tanto o grupo de voluntários sadios como de pacientes tiveram faixa etária entre 18-60 anos e os indivíduos não receberam nenhuma compensação financeira. O exame hematológico e a eletroforese de hemoglobina dos voluntários não apresentaram anormalidades.

3.1 Material

Os anticorpos IgG controle negativo (W3/25), o anti CD49d (HP2/1), o anti CD11b (ICRF44) conjugado com FITC (isotiocianato de fluoresceína) e o RPE (R-ficoeritrina) foram adquiridos da Serotec, Oxford. UK. O anti CD11a (MHM24 e o anti CD29 (K20)) foram obtidos da DAKO.

A IL-8 recombinante humana (CXCL8), o TNF-alfa foram adquiridos da R&D Systems (Minneapolis, USA). A fibronectina foi comprada da Invitrogen (Califórnia, USA). Todos os

outros produtos foram obtidos da Sigma Co. (St. Louis, USA). O estudo foi realizado no Hemocentro de Campinas-UNICAMP.

3.2 Delineamento da Investigação

- a) dosar o nitrato e nitrito para identificar a disponibilidade de NO dos neutrófilos de controles e de pacientes com AF em uso ou não a HU;
- b) dosar o GMPc/AMPc nessas células para identificar as vias de sinalização por nucleotídeos cíclicos;
- c) verificar a adesão dos neutrófilos de controles e pacientes com AF ao ICAM-1 e FN que faziam ou não uso de HU;
- d) investigar se os doadores de NO (SNP/ DEANO) propiciam mudanças na adesão celular dos neutrófilos;
- e) utilizar o ativador da GCs, Bay 41-2272, para verificar se a via depende de GMPc está envolvida em processos que alterem a adesão dos neutrófilos;
- f) mensurar, por citometria de fluxo, a expressão celular das integrinas LFA-1, Mac-1 e VLA-4 na superfície celular dos neutrófilos de pacientes em uso ou não de HU e de células tratadas com SNP;
- g) utilizar inibidores da PKA e PKG para verificar se essas vias estão envolvidas em processos que alterem a adesão dos neutrófilos.

3.3 Contagem dos neutrófilos no sangue periférico

A contagem dos neutrófilos dos pacientes com AF e controles foi realizada utilizando o sistema de contagem diferencial de células Advia Hematology System (Bayer Corp. Irlanda).

3.4 Isolamento de neutrófilos do sangue periférico

Sangue total (6 ml) foi colhido em heparina e colocado sobre 2 camadas de Ficoll-paque de densidades de 1.119 g/L e 1.077 g/L, respectivamente. Após centrifugação de 700 g por 28 minutos, os neutrófilos foram retirados com uma pipeta *Pasteur*, lavados uma vez em meio

RMPI 1640 (pH 7,2) ou em solução de salina tamponada (PBS, pH= 7,2). Uma solução de amônia (155mM NH_4Cl , 10mM KHCO_3) foi utilizada para lisar os eritrócitos contaminantes. Os neutrófilos foram lavados mais uma vez e ressuspensos em meio RMPI 1640 (pH 7,2) numa concentração de 2×10^6 células/ml. As células foram mantidas à 4°C até o prosseguimento do experimento.

3.5 Preparação de lâminas em citocentrífuga

Após a separação, foi realizada a contagem automática das células para aferir a concentração de neutrófilos. Adicionalmente, 100 μl da suspensão de células de cada amostra ($10^6/\text{ml}$), controle e paciente, foi colocada no recipiente da citocentrífuga (Shandon Cytospin 3) e submetida à centrifugação a 400 rpm durante 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram secas em temperatura ambiente e coradas com solução de Leishman (Sigma Chemical Company, ST Louis, Mo) por 15 minutos e a pureza da suspensão de neutrófilos confirmada. As lâminas foram visualizadas em microscopia óptica comum, em imersão (aumento de 1000x).

3.6 Dosagem do nitrito e nitrato nos neutrófilos

Os neutrófilos (5×10^6 células/ml) isolados foram ressuspensos em água ultrapura e homogeneizados para lise celular. As amostras foram estocadas em freezer até o uso. Os extratos celulares foram ultrafiltrados com filtro de 10kDa (Millipore Corp., Bedford, MA, USA) com o auxílio de uma centrífuga, de acordo com as instruções do fabricante. Para a dosagem dos metabólitos de NO (nitrito e nitrato) foi utilizado o kit Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit, Cayman chemical, seguindo as recomendações do fabricante. O Kit permite a redução do nitrato para o nitrito através da enzima nitrato redutase, a seguir, foi adicionado o reagente de Griess que converte o nitrito em um componente de coloração violeta. A absorbância desse componente foi medida em leitor de ELISA e a concentração do NO_x foi determinada.

3.7 Dosagem do GMPc e AMPc nos neutrófilos em suspensão

Os neutrófilos foram isolados e ressuspensos em PBS na concentração de 1×10^7 células/ml e incubados com o inibidor da fosfodiesterase 3-isobutil-metilxantina (2mM, IBMX)

durante 30 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, foi adicionado às amostras (5×10^6 neutrófilos/ml em PBS) ácido perclórico numa concentração final de 0,5M. As amostras foram centrifugadas a 6000 g por 20 minutos, e o sobrenadante foi retirado, o pH neutralizado utilizando o KOH 8M. As amostras foram utilizadas em Kit de ELISA (Cayman Laboratories, Ann Arbor, MI, USA) seguindo as instruções do fabricante.

3.8 Tratamento de neutrófilos com doadores de NO/ análogos de GMPc/ análogos de AMPc

Soluções estoques dos doadores de NO, nitroprussiato de sódio (SNP) e DEANO, dos ativadores e inibidores da GCs, BAY 41-2272 e ODQ, e dos inibidores de PKA e PKG, foram preparadas em meio de cultura RPMI, pH 7.2, imediatamente antes do ensaio. As células (4×10^6 neutrófilos/ml) foram tratadas durante 5 minutos à 37°C com as seguintes concentrações: SNP-10µM, DEANO-1µM, BAY41-2272-150nM, ODQ-10µM, KT5720-2,5µM e KT5823-1µM e IL-8-500ng/ml.

3.9 Ensaio de adesão de neutrófilos

Placas com 96 poços foram recobertas com 60 µl do ligante desejado (10 µg/ml ICAM-1 em PBS) ou (20 µg/ml de FN em PBS) por 16-20 horas à 4 °C. Os poços da placa foram lavados duas vezes com PBS antes de bloquear os sítios inespecíficos com PBS/BSA 0,5% por 90 minutos à 37°C. Depois de lavar as placas mais duas vezes com PBS e secá-las, os neutrófilos foram adicionados num volume de 50 µl em RPMI 1640 (2×10^6 células/ml) e incubados durante 30 minutos (37°C, 5 CO₂) para permitir a adesão (tempo ideal para adesão celular à FN/ICAM-1). Após incubação, as células não aderidas foram removidas com 2 lavagens de PBS. Por fim, foi colocado um volume de 50µl de meio de cultura RPMI nos poços onde foi realizado o ensaio de adesão. Esse mesmo procedimento foi realizado tanto com os neutrófilos de pacientes com AF como para os neutrófilos controles.

Para mensurar os neutrófilos que aderiram à FN e ao ICAM-1, foi realizada uma curva padrão. Para construir a curva, foram adicionadas concentrações que variavam de 0-100% da suspensão original de células (2×10^6 células/ml) em 50µl de RPMI.

As placas foram congeladas por ao menos 12 horas antes de medir o conteúdo de mieloperoxidase (MPO) encontrado tanto nas células da curva padrão como nas células aderidas do ensaio (Bradley, 1982). Em resumo, as placas foram descongeladas em gelo e a MPO foi extraída, das células aderidas e das células da curva padrão, com hexadeciltrimetil amônio bromida (HTAB), 0,5 % em tampão fosfato de potássio, 50 mM, pH 6,0. Vinte microlitros da HTAB de cada poço foi misturado com 200 µl de solução o-dianisidina (*o-dianisidine dihydrochloride* 0,167 mg/ml, peroxidase de hidrogênio 0,0005% em tampão fosfato de potássio, 50 mM, pH 6.0) e a absorbância foi medida, depois de 5 minutos, a 490nm usando um leitor de ELISA (Multiscan MS, Labsystems, EUA). A aderência foi calculada por comparação das absorbâncias das amostras desconhecidas com às da curva padrão.

3.10 Citometria de Fluxo

A expressão das moléculas de adesão (LFA-1, Mac-1 e VLA-4) na superfície dos neutrófilos foi detectada através da citometria de fluxo. Os experimentos de citometria de fluxo foram efetuados com neutrófilos isolados de pacientes com AF que estavam ou não em o uso de HU e neutrófilos controles. Esses neutrófilos isolados foram co-incubados com SNP durante 30 minutos em estufa de CO₂ a 37°C. Após a incubação, a expressão das moléculas de adesão na superfície dos neutrófilos foi detectada através da citometria de fluxo. Os neutrófilos isolados (1x10⁶ células/ml) foram incubados em concentração saturada de anticorpo monoclonal da molécula de adesão ou controle adequado (anticorpo de isotipo semelhante) conjugado com fluoresceína isotiocianato (FITC) ou R-ficoeritrina (RPE) por 20 minutos à temperatura ambiente na ausência de luz.

Os anticorpos monoclonais foram utilizados nas seguintes diluições: anti CD11a conjugado com FITC 1:20; anti CD49d conjugado com FITC 1:10 e anti CD11b conjugado com R-PE 1:20 e anticorpo IgG controle nas mesmas diluições.

Após centrifugação (300xg/10min) e remoção do sobrenadante, as células foram lavadas com 1 ml de PBS (pH=7,2), centrifugadas novamente e o sobrenadante desprezado e então as células foram fixadas com 500µl de paraformaldeído a 1%. Os eventos foram adquiridos no citômetro FACScalibur (Becton-Dickinson San Jose CA). As análises foram realizadas na região de neutrófilos, definida baseada nas características de complexidade citoplasmática (SSC) e

tamanho celular (FSC). Em seguida, a média de intensidade de fluorescência (MFI) para cada antígeno foi aferida e utilizada para comparação da expressão do antígeno em relação às células incubadas com um anticorpo controle negativo (isotipo controle). A intensidade da fluorescência de cada célula foi então comparada com as células incubadas com um controle de isotipo (IgG1).

3.11 Análise estatística

As condições de normalidade das distribuições foram testadas para todas as amostras, e transformações matemáticas prévias foram exigidas se as variáveis em todos os grupos não apresentassem distribuição normal. Os resultados foram expressos como média +/- erro médio padrão (SEM) e os dados de cada grupo foram comparados utilizando o teste de Mann-Whitney com uma significância estabelecida de ($p < 0.05$). O “Student test” (teste- t) foi utilizado para comparar grupos específicos. Todos os cálculos foram efetuados utilizando-se o programa GraphPad Instat.

RESULTADOS

4-RESULTADOS

4.1 Características clínicas dos pacientes

Tabela I. Detalhes clínicos dos pacientes com AF que participaram do estudo. SS, pacientes com AF em estado estável; SSHU, pacientes falciformes em estado estável sob terapia de HU (20-30 mg/dia); Dados apresentados na tabela são média (mediana, min, max) exceto os valores masculino e feminino.

Parâmetros	SS	SSHU
Masculino/Feminino	13/20	8/11
Idade (anos)	35,2 (36,5; 16; 51)	34,7 (31,5; 25; 64)
Hemácias n°. (x 10 ⁶ /ul)	2,42 (2,25; 1,38; 4,03)	2,56 (2,54; 1,74; 3,24)
Hematócrito (%)	23,0 (22,2; 14,6; 33,1)	26,0 (25,4; 18,8; 31,6)
Hemoglobina (g/dl)	7,74 (7,6; 5,0; 11,2)	8,77 (8,6; 6,5; 10,8)
Volume corpuscular médio (fl)	96,6 (96,8; 70,4; 109,3)	102,9 (102,2; 71,7; 132,4)
Hemoglobina corpuscular média (pg)	32,8 (33,5; 21,0; 40,4)	34,7 (34,6; 24,0; 44,3)
Glóbulo Branco (GB) (10 ⁹ /L)	10,44 (10,0; 4,83; 15,25)	8,26 (7,72; 4,51; 14,17)
HbF (%)	6,66 (5,5; 1,0; 16,5)	13,64 (13,9; 3,7; 22,1)

4.2 Ensaio de adesão celular dos neutrófilos

4.2.1 Padronização do método do ensaio de adesão à FN

A curva padrão foi efetuada adicionando variadas concentrações da suspensão original dos neutrófilos (2x10⁶ cel/ml) isolados dos controles e pacientes aos poços da placa, correspondendo a uma curva de 0-100% , onde 0% corresponde somente à presença de meio de cultura e 100% corresponde a 2x10⁶ células/ml (concentração máxima de célula) em meio de cultura. A adesão dos neutrófilos foi calculada pela densidade óptica dos resíduos da

mieloperoxidase contida nos grânulos dos neutrófilos. A porcentagem de células aderentes foi calculada por comparar os valores desconhecidos com a tal curva padrão. Abaixo está o exemplo de como foi realizada a curva padrão. Figura 1 A e B.

[] 2×10^6 célula/ml	vol (μ l)	RPMI (μ l)
0%	0	180
5%	10	190
10%	20	180
20%	40	160
50%	100	100
100%	160	0

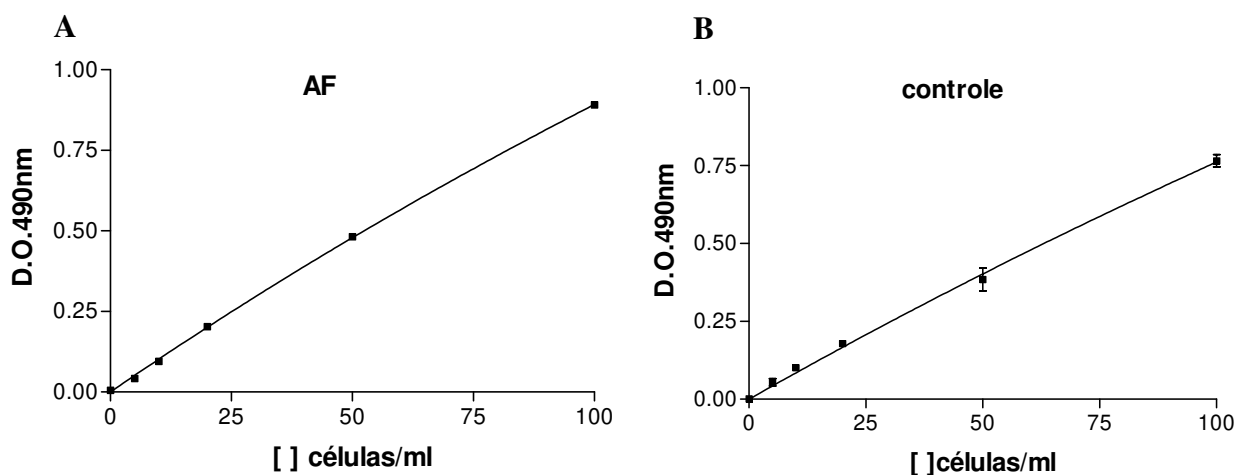


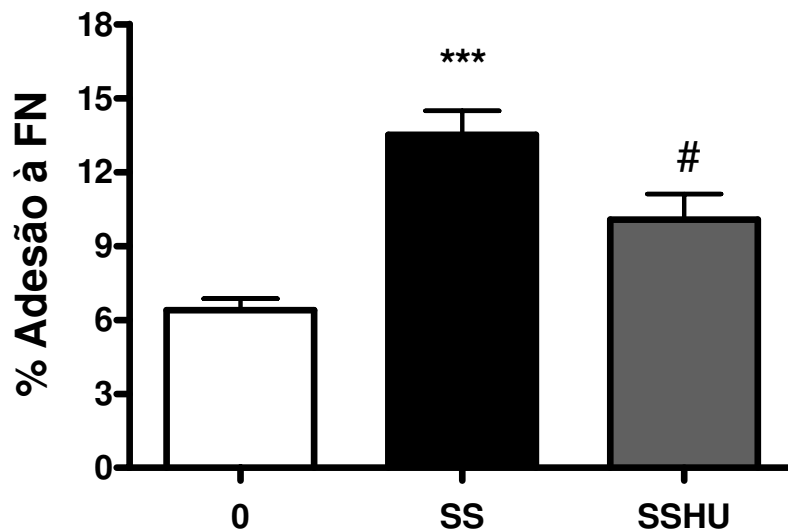
Figura 1 A e B. Curvas padrões típicas de células de pacientes com AF (A)/controle (B). A curva padrão foi realizada com diferentes concentrações de células em 50 μ l de RPMI. Após efetuar a curva foi realizada a leitura da placa em leitor de ELISA na absorvância de 490nm. Esta curva é a referência de porcentagem de adesão dos neutrófilos aderidos à placa.

4.2.2 Adesão estática *in vitro* de neutrófilos de pacientes com AF (SS e SSHU) e controles

Inicialmente, foi verificada a adesão espontânea dos neutrófilos em placas recobertas com FN ou ICAM-1. Em ensaio estático de adesão, os neutrófilos de pacientes com AF mostraram significativamente maior adesão à FN (20 ug/ml) e ao ICAM-1(10µg/ml), quando comparados com a população de neutrófilos controles e com a população de neutrófilos de pacientes em uso de HU. A adesão dos neutrófilos de pacientes falciformes (SS) à FN foi de $13,51 \pm 0,96\%$ (n=34) enquanto que a adesão do controle foi $6,39 \pm 0,46\%$ (n=24) e dos pacientes falciformes em uso de HU (SSHU) foi $10,06 \pm 1,03\%$ (n=16), com valor de $p=0,0001$ e $p=0,02$ respectivamente.

A adesão dos neutrófilos de pacientes falciformes (SS) ao ICAM-1 foi de $17,08 \pm 2,99\%$; (n=10) enquanto que a adesão dos controles foi $8,88 \pm 1,09\%$ (n= 9) e de pacientes falciformes em uso de HU (SSHU) foi $8,11 \pm 2,78\%$ (n=6), com valor de $p=0,03$ e $p=0,02$ respectivamente. Observar a figura 2 A e B.

A



B

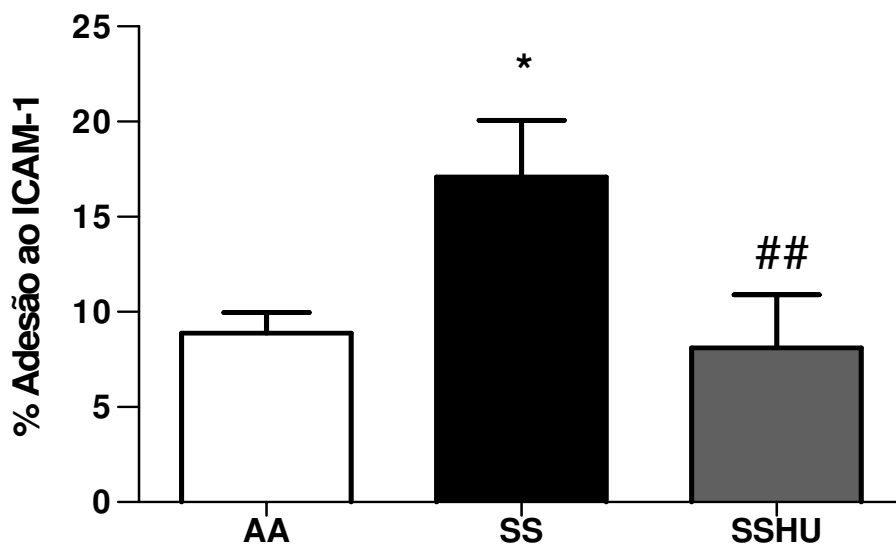


Figura 2 (A) e (B). Adesão basal dos neutrófilos isolados de controles AA e de pacientes com AF (SS e SSHU) à FN (A) e ao ICAM-1 (B). A porcentagem de adesão celular foi calculada por comparação da D.O. da atividade da enzima mieloperoxidase das células aderentes com a D.O. dos diferentes pontos da curva padrão. Os resultados foram expressos como a média da porcentagem de células aderidas $\pm$ SEM, com $n \geq 16$ e $n \geq 6$, respectivamente para FN (A) e para ICAM-1 (B). Os experimentos foram realizados em triplicata. # $P < 0,05$ comparado com a adesão do SS e * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ comparado à adesão do controle.

4.3 Dosagem intracelular do GMPc nos neutrófilos isolados de controles AA e de pacientes com AF (SS e SSHU).

Nos pacientes com AF em uso de HU, a dosagem do GMPc intracitoplasmático foi significativamente maior quando comparada com a dosagem de GMPc, nos neutrófilos controles e com a dos pacientes com AF sem HU. A concentração de GMPc nos neutrófilos de pacientes com AF em uso de HU (SSHU) foi $0,241 \pm 0,034$ (n=9) com valor de $p=0,007$, comparado com controle (AA) $0,114 \pm 0,021$ (n=11) e com neutrófilos de pacientes com AF (SS) $0,104 \pm 0,023$ (n=19). ** $p<0,001$ comparado com ambos (controle e SS), t-test não pareado. Fig. A

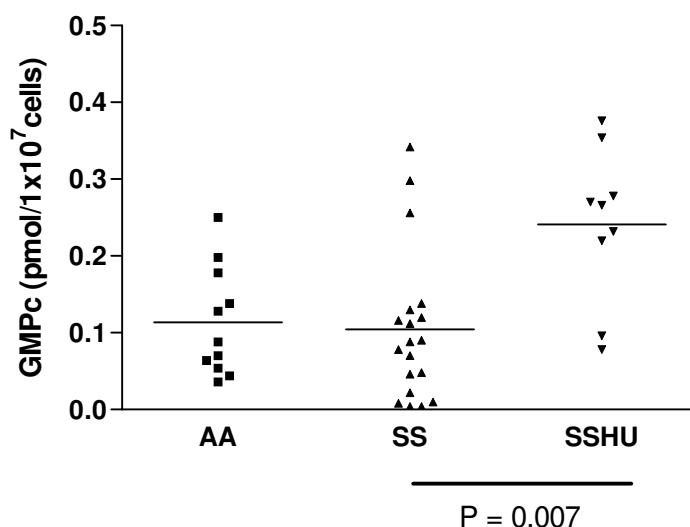


Figura 3. A dosagem de GMPc (A) foi realizada após a extração e realização do Kit de GMPc nos neutrófilos isolados dos controles e pacientes com AF (SS e SSHU)

4.4 Níveis intracelulares dos metabólitos de NO (NOx)

	AA	SS	SSHU
NOx intracelular	$7,04 \pm 1,38$	$3,68 \pm 0,35^*$	$4,22 \pm 0,92$
uM/1x10⁷ neutrófilos	n=9	n=7	n=11

Tabela II. Níveis de metabólitos de NO (nitrito e nitrato) dosados em neutrófilos isolados de controles e pacientes com AF (SS e SSHU). Os pacientes com AF (SS) apresentaram níveis menores de NOx intracelular quando comparados aos controles e aos pacientes com AF em uso de HU (SSHU). $p<0,05$ comparado com o controle, teste-t não pareado, Welch- corrigido.

4.5 Efeito *in vitro* do doador exógeno de óxido nítrico, o nitroprussiato de sódio (SNP), na adesão dos neutrófilos à FN e ao ICAM-1.

A co-incubação dos neutrófilos isolados do sangue periférico de pacientes com AF com SNP (10 μ M) reduziu o aumento da sua adesão ao ICAM-1 e à FN. Em contraste, o SNP não modificou a adesão dos neutrófilos controles AA ao ICAM-1 e à FN. Figura 4.

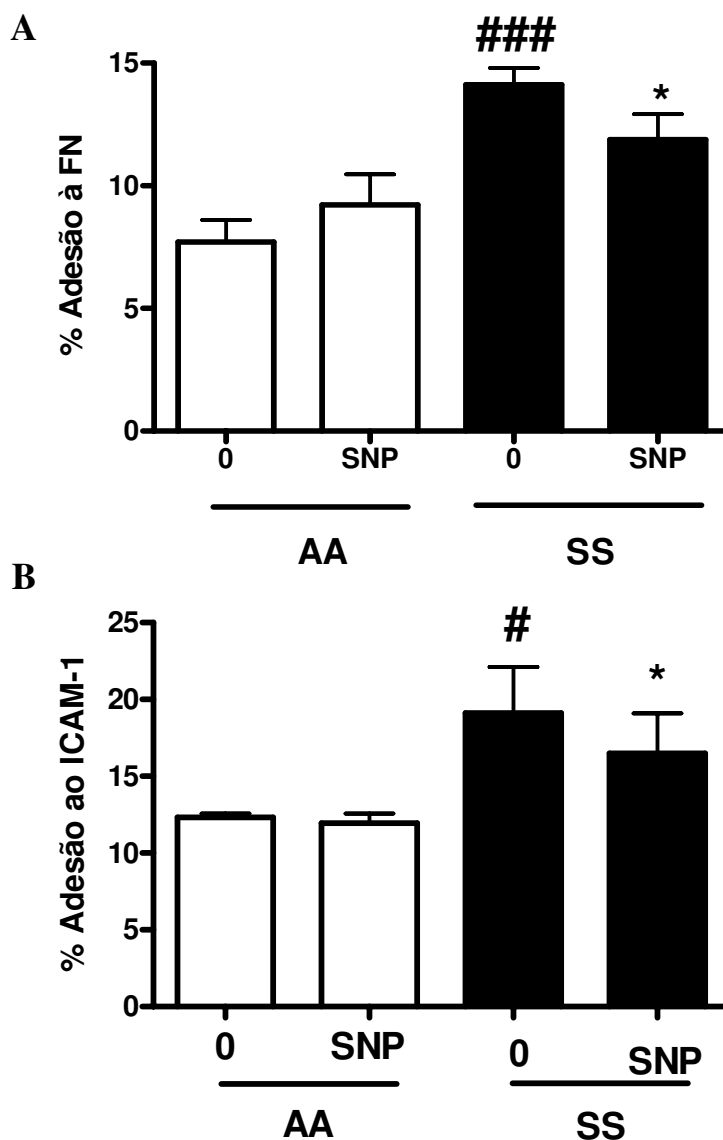


Figura 4. Adesão dos neutrófilos isolados de controles AA e de pacientes com AF à FN (A) e ao ICAM-1 (B). Os neutrófilos foram co-incubados com 10 μ M SNP. Os resultados foram expressos como porcentagem das células aderentes $\pm$ SEM $n \geq 5$ e $n \geq 3$ para A e B respectivamente. # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ comparado à adesão basal do controle; * $p < 0,05$ comparado com a adesão basal dos pacientes com AF (SS).

4.6 Efeito *in vitro* do doador exógeno de óxido nítrico, o “Diethylamine NONOate” (DEANO), na adesão dos neutrófilos à FN e ao ICAM-1.

A co-incubação dos neutrófilos controles e de pacientes com AF com DEANO (1 μ M) reduziu o aumento da sua adesão à FN e ao ICAM-1. Em contraste, o DEANO não modificou a adesão dos neutrófilos de controles AA à FN e ao ICAM-1. Figura 5.

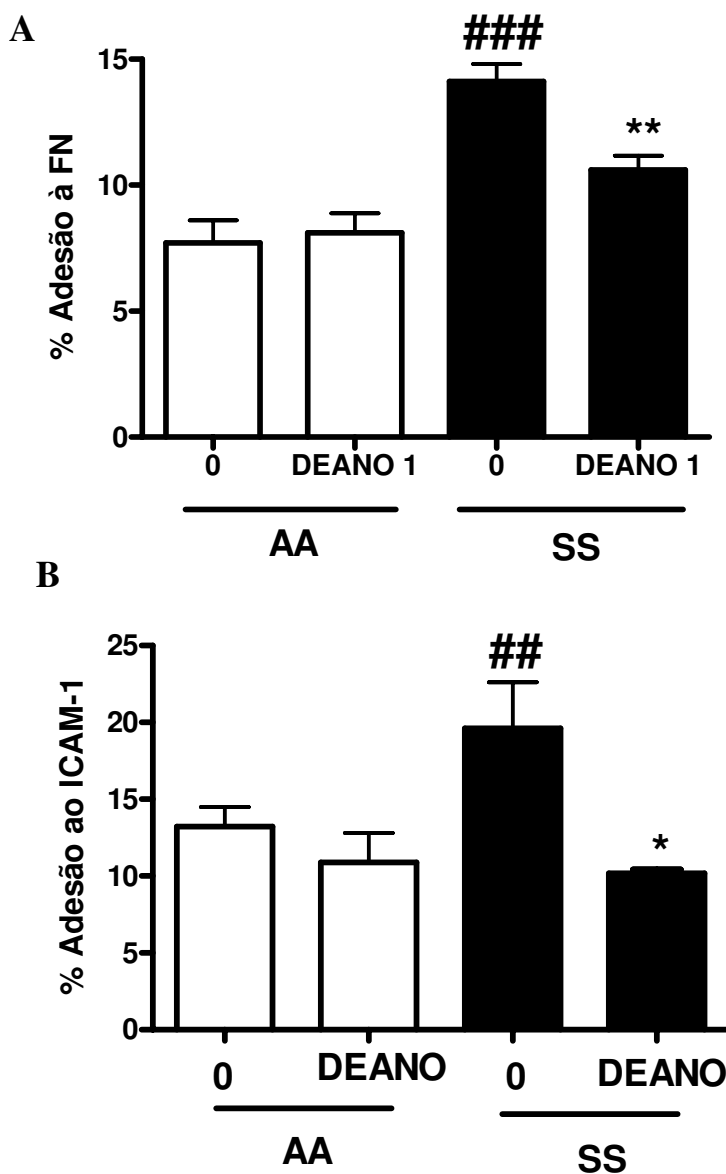


Figura 5. Adesão dos neutrófilos isolados de controles AA e de pacientes com AF (SS) à FN (A) e ao ICAM-1 (B). Os resultados foram expressos como porcentagem das células aderentes $\pm$ SEM $n \geq 5$ e $n \geq 3$ para A e B respectivamente. ### $p < 0,001$ e ## $p < 0,01$ comparado com adesão basal do controle; ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ comparado com a adesão basal dos pacientes SS.

4.7 Efeito *in vitro* do ativador da guanilato ciclase, o BAY 41-2272 na adesão dos neutrófilos à FN e ao ICAM-1

A co-incubação dos neutrófilos controles AA e de pacientes com AF (SS) com Bay 41-2272 também reduziu significativamente a adesão dos neutrófilos dos pacientes com AF aos dois ligantes estudados (FN e ICAM-1), mas não alteraram a adesão dos neutrófilos controles à FN e ao ICAM-1. Figura 6.

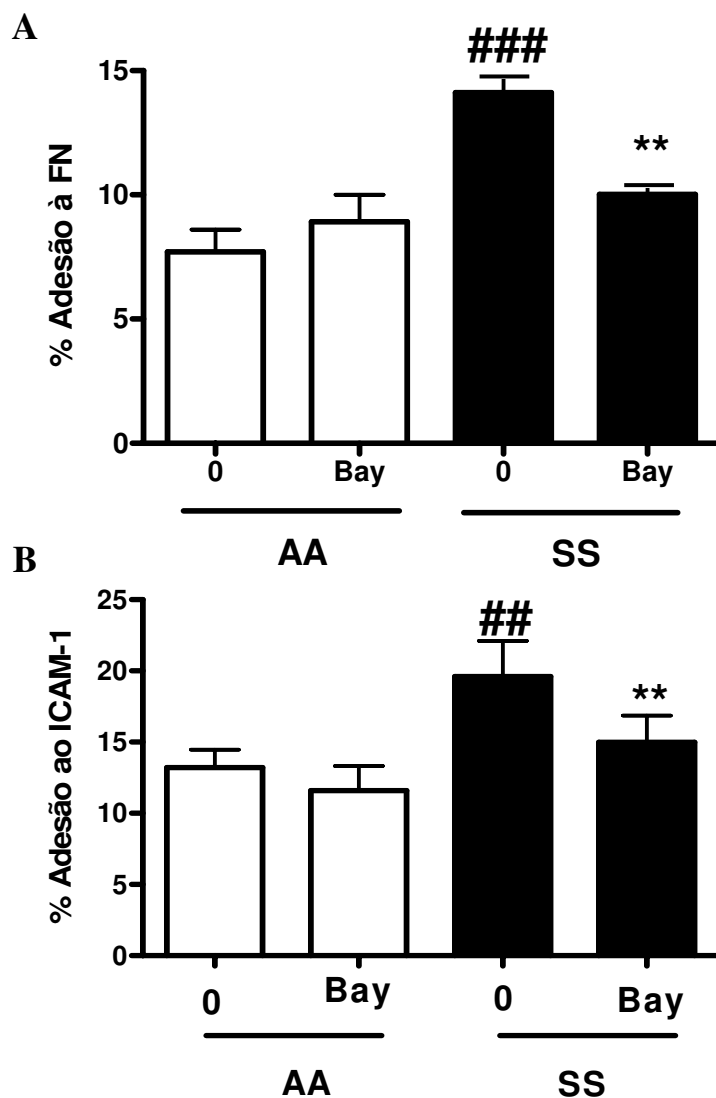


Figura 6. Adesão dos neutrófilos isolados de controles AA e pacientes com AF (SS) à FN (A) e ao ICAM-1 (B). Os neutrófilos foram co-incubados com 150nM de BAY41-2272. Resultados foram expressos como porcentagem das células aderentes $\pm$ SEM. $n \geq 5$ e $n \geq 3$ para A e B respectivamente. ###p<0,001 e ##p<0,01 comparado com adesão basal do controle; **p<0,01 comparado com a adesão basal dos pacientes SS.

4.8 Efeito *in vitro* do inibidor da guanilato ciclase, o 1H- [1,2,4] Oxidiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ) na adesão dos neutrófilos à FN na presença dos doadores de NO

O inibidor da GCs (ODQ 10 μ M) impediu que os doadores de NO induzissem a diminuição da adesão dos neutrófilos de pacientes com AF (SS) à FN. Estes dados sugerem que os doadores de NO poderiam diminuir as propriedades adesivas dos neutrófilos pela via dependente de GMPc. Figura 7.

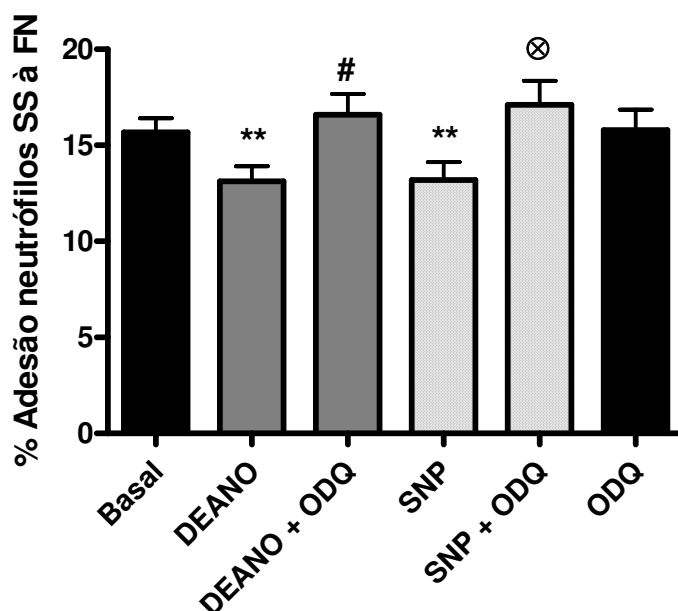


Figura 7. Adesão basal dos neutrófilos isolados de pacientes com AF (SS) à FN e a co-incubação dos neutrófilos isolados de pacientes com AF (SS) com 1 μ M DEANO ou 10 μ M SNP na presença ou ausência do inibidor da guanilato ciclase (10 μ M ODQ). Os resultados foram expressos como porcentagem das células aderentes $\pm$ SEM $n \geq 8$. ** $p < 0,01$ comparado com a adesão basal dos pacientes com AF (SS); # $p < 0,05$ comparado com a incubação somente com o DEANO; ⊗ $p < 0,05$, comparado com a incubação somente com o SNP.

4.9 Efeito do doador de NO, o SNP, na expressão das integrinas de neutrófilos controles e neutrófilos de pacientes com AF (SS e SSHU)

A expressão das integrinas VLA-4, Mac-1, LFA-1 (α -subunidade) na superfície de neutrófilos controles e de pacientes com AF (SS e SSHU) foi determinada por citometria de

fluxo. Os anticorpos específicos para CD49d (VLA-4 subunidade α) e CD11a (LFA-1 subunidade α) foram adquiridos conjugados com FITC, enquanto o anticorpo específico para CD11b (Mac-1 subunidade α) foi conjugado com R-PE. O controle negativo utilizado foi um anticorpo monoclonal de coelho anticamundongo conjugado com FITC e R-PE. Os resultados foram expressos como intensidade média de fluorescência (MFI) que demonstra a quantidade, em unidades de fluorescência de cada subunidade de integrina expressa na superfície de cada célula, relativa às células incubadas com o anticorpo controle negativo.

Não foi observada nenhuma diferença significativa na expressão das subunidades de integrinas entre as células estudadas dos pacientes com AF (SS ou SSHU) e o controle AA. Quando os neutrófilos das três populações (AA, SS e SSHU) foram co-incubados com 10 μ M de SNP a expressão da subunidade CD11a foi reduzida significativamente nas células dos pacientes (SS e SSHU).

Sub unidade alfa da Integrina		AA		SS		SSHU	
		MFI (N=7)	P	MFI (N=8)	P	MFI (N=8)	P
CD11a	Basal	13,82 $\pm$ 1,66	>0.05	16,03 $\pm$ 1,27	0.0002	17,05 $\pm$ 1,47	0.035
	SNP	11,55 $\pm$ 1,27		11,66 $\pm$ 0,77	***	14,70 $\pm$ 1,50	*
CD11b	Basal	162,9 $\pm$ 47,8	>0.05	151,23 $\pm$ 32,4	>0.05	154,0 $\pm$ 46,9	>0.05
	SNP	191,37 $\pm$ 41,8		184,73 $\pm$ 21,58		207,96 $\pm$ 33,04	
CD49d	Basal	7,73 $\pm$ 0,72	>0.05	9,81 $\pm$ 0,80	>0.05	10,53 $\pm$ 1,22	>0.05
	SNP	7,28 $\pm$ 0,59		10,03 $\pm$ 1,06		10,43 $\pm$ 1,34	

Tabela III. A expressão de CD11a, CD11b e CD49d na superfície dos neutrófilos controles e de pacientes com AF (SS e SSHU), foi determinada por citometria de fluxo. Os valores são expressos como MFI $\pm$ SEM. Nenhuma significância estatística foi encontrada entre os controles e pacientes com AF para estas moléculas de adesão quantificadas. Após as células serem tratadas com o SNP houve redução significativa da expressão nas populações de pacientes (SS e SSHU) para a subunidade CD11a.

4.10 Dosagem do AMPc intracitoplasmático nos neutrófilos controles AA e pacientes com AF (SS e SSHU)

Nos pacientes com AF sem uso de HU, a dosagem do AMPc intracitoplasmático foi significativamente maior quando comparada com a dosagem de AMPc dos neutrófilos controles

e com a dos pacientes com AF em uso de HU (SSHU). A concentração de AMPc nos pacientes com AF (SS) foi $4,53 \pm 0,38$ ($n= 25$) comparado com AA $2,15 \pm 0,39$ ($n= 14$) e SSHU $3,26 \pm 0,46$ ($n=14$). Figura 8

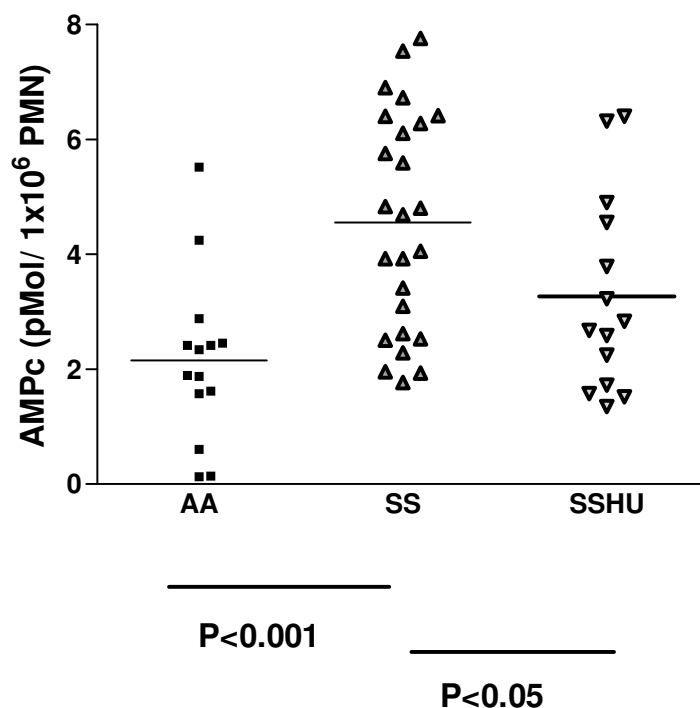


Figura 8. Dosagem do AMPc intracelular nos neutrófilos controles e pacientes com AF SS e SSHU. ** $p<0,001$ comparado com o controle AA, * $p<0,05$ comparado com a população de neutrófilos de pacientes SS; teste Mann-Whitney.

4.11 Efeito in vitro do inibidor da PKA, o KT5720 e o inibidor da PKG, o KT 5823 na adesão dos neutrófilos à FN.

Os dados mostraram que a adesão basal dos neutrófilos de pacientes com AF (SS) à FN foi significativamente maior comparada com a adesão basal dos neutrófilos controles AA. Isso facilita especular que o aumento nos níveis de AMPc pode levar ao aumento da adesão dos neutrófilos na AF. Sendo assim, os neutrófilos de pacientes com AF e controles foram co-incubados com o inibidor de PKA (KT 5720; 2,5 μ M) durante o ensaio de adesão estático. Após a incubação, o aumento da adesão dos neutrófilos de pacientes com AF (SS) foi significativamente reduzido, retornando a níveis similares ao controle. A co-incubação dos neutrófilos de pacientes com AF com o inibidor de PKG (KT 5823; 1 μ M) e DMSO, o veículo de diluição das drogas (0,003% v/v), não alterou a adesão desses neutrófilos de pacientes com AF (SS) à FN. Figura 9.

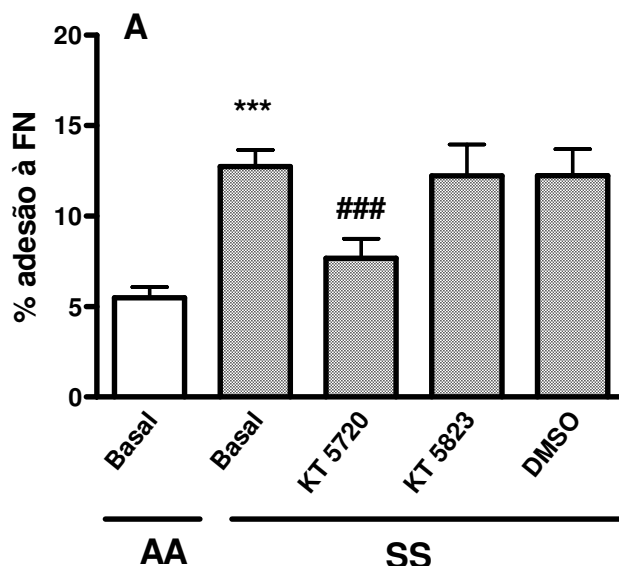


Figura 9. O aumento da adesão dos neutrófilos à FN é revertido pelo inibidor de PKA. A adesão dos neutrófilos de controles e pacientes com AF (SS) em estado estável à FN foi comparada e o efeito da co-incubação dos neutrófilos com o inibidor de PKA, com o inibidor de PKG, e DMSO na adesão dos neutrófilos com AF (SS) à FN foi determinada. *** $p < 0,001$ comparado com adesão basal das células controles, teste Mann Whitney; ### $p < 0,001$ comparado com a adesão basal de pacientes SS.

4.12 Efeito *in vitro* dos inibidores de PKG e PKA na adesão dos neutrófilos à FN estimulados com IL-8 .

A co-incubação dos neutrófilos de pacientes com AF (SS) na presença de IL-8 (500 ng/ml) associada com incubação KT 5720 (2,5 μ M) também reduziu significativamente o aumento da adesão à FN, mas não alteraram a adesão dos neutrófilos controles AA. O KT 5823 não alterou a adesão à FN em ambas as populações de neutrófilos controles e de pacientes com AF (AA e SS). Figura 10.

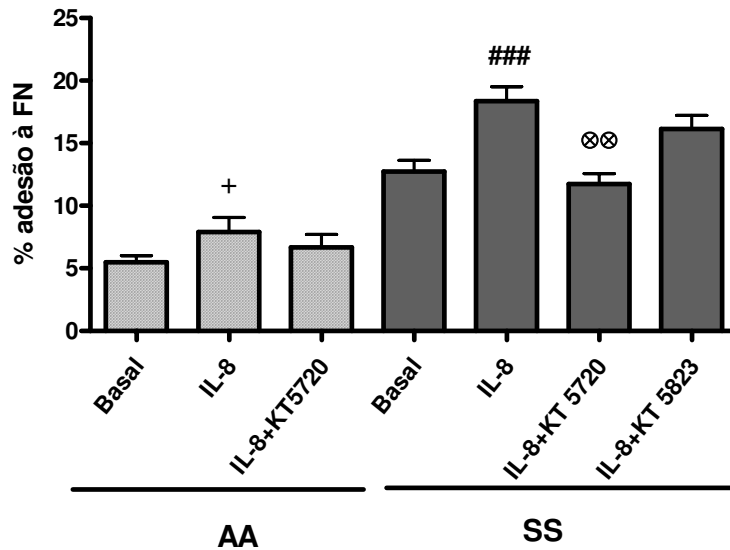


Figura 10. Os neutrófilos isolados de controles e pacientes com AF (SS) foram estimulados com IL-8 e o efeito da co-incubação dos neutrófilos com inibidor da PKA e da PKG foi observado. + $p < 0,05$ comparado com a adesão basal dos neutrófilos controles AA; ### $p < 0,001$ comparado com a adesão basal dos pacientes SS; ⊗⊗ $p < 0,01$ comparado com células estimuladas com IL-8 ($n \geq 4$).

4.13 Efeito da quimiocina IL-8 e dos inibidores de PKA e PKG na adesão dos neutrófilos de pacientes com AF em uso de HU (SSHU -30mg/kg/dia)

Os neutrófilos de pacientes em estado estável que fizeram uso de HU foram co-incubados com IL-8 (500ng/ml) e associados com os inibidores de PKA e de PKG. Resultados anteriores realizados neste estudo mostraram que a adesão de neutrófilos de pacientes com AF em uso de HU (SSHU) apresentou níveis de adesão similares aos neutrófilos controles (AA) e diferiu significativamente dos neutrófilos de pacientes com AF sem HU. Adicionalmente, foram encontrados níveis menores de AMPc nos neutrófilos de pacientes com AF em uso HU (figura 8). Os resultados presentes mostraram que a co-incubação dos neutrófilos de pacientes com AF (SSHU) com KT 5720 não alterou a sua adesão à FN. A estimulação dos neutrófilos de pacientes em uso de HU (SSHU) com IL-8, induziu o aumento não significativo da sua adesão à FN, e esse aumento também não foi significativamente revertido pela presença de KT 5720. Figura 11.

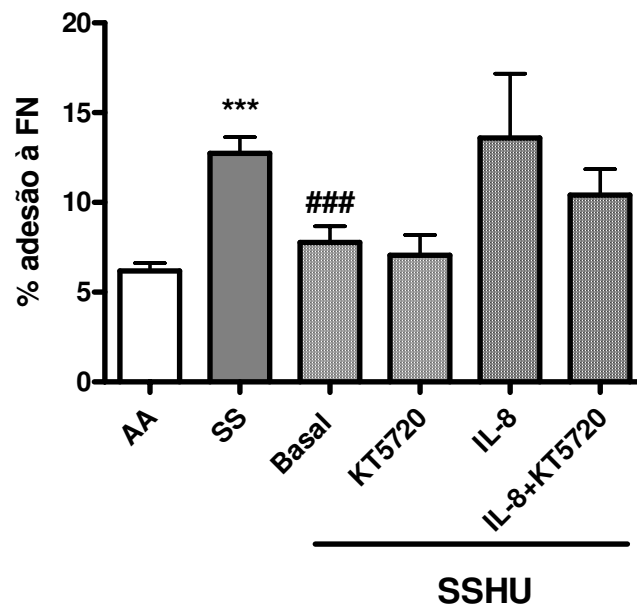


Figura 11. Os neutrófilos de pacientes com AF (SSHU) foram estimulados com IL-8 e o efeito da co-incubação com KT 5720 sobre esse estímulo foi observado na adesão. *** $p < 0,001$ comparado com as células do controle; ### $p < 0,001$ comparado com a adesão dos neutrófilos de pacientes com AF (SS), teste Mann-Whitney ($n \geq 6$).

DISCUSSÃO

5.1 Discussão

A adesão leucocitária ao endotélio vascular na microcirculação parece ser de extrema importância para o processo vaso-oclusivo em pacientes com anemia falciforme (TURHAN et al., 2002) e dessa forma, tentativas terapêuticas que visem inibir esse fenômeno podem ser importante para a prevenção da vaso-oclusão. Nossos estudos confirmam o aumento da habilidade dos neutrófilos de pacientes com AF em aderir à fibronectina, uma proteína da matriz extracelular, e adicionalmente demonstra a habilidade dessas células em aderir ao ICAM-1 recombinante, molécula de adesão celular expressa em células endoteliais.

Além disso, a diminuição da biodisponibilidade do NO pode contribuir para a fisiopatologia da anemia falciforme (MACK e KATO, 2006). O NO é importante para a regulação da homeostase vascular dentre outras funções in vivo (MACK e KATO, 2006), mas também tem papel importante na supressão, expressão e função das moléculas de adesão na superfície das células endoteliais e leucocitárias (DeCATERINA ET AL., 1995; CONRAN et al., 2001; CONRAN et al., 2003). Foi observado nesse trabalho que níveis intracelulares de metabólitos de NO foram significativamente menores em neutrófilos de pacientes com AF comparados com níveis existentes em neutrófilos de indivíduos controles, indicando que existe uma redução na biodisponibilidade de NO nos pacientes com AF, o que pode resultar na diminuição da sinalização de NO nessas células .

A estimulação farmacológica da via de GMPc dependente de NO com os doadores de NO, DEANO e SNP , e o ativador da guanilato ciclase independente de NO, BAY 41-2272, diminuiu significativamente o aumento da adesão dos neutrófilos à FN e ICAM-1 nos pacientes falciformes. Os neutrófilos controles permaneceram com a mesma adesão à FN e ao ICAM-1 após o uso desses fármacos. Essa diminuição da adesão dos neutrófilos dos pacientes com AF provocada pelos doadores de NO foi mediada pela via dependente de GMPc.

No presente estudo, não foi encontrado nenhuma evidência sugestiva de que as subunidades das integrinas LFA-1 (CD11a) e Mac-1 (CD11b) são expressas em níveis significativamente diferentes nas superfícies dos neutrófilos de pacientes com AF comparados aos controles. Alguns trabalhos têm relatado aumento na expressão de CD11b/CD18 de neutrófilos não estimulados em pacientes com AF (LUM et al., 2004), ao passo que outros têm detectado significante aumento de Mac-1 somente depois da estimulação celular (ASSIS et al.,

2004). As integrinas são conhecidas por mediar alterações nas propriedades adesivas. Essas alterações são causadas pela mobilização dessas moléculas de adesão na superfície celular, (SIMS, 2002) pela mudança na afinidade (SHIMAOKA et al., 2002) e avidéz da integrina (HOGG et al., 2001; LEE e BANKSTON, 1995; HEIT et al., 2005). Desse modo, é possível que o aumento das propriedades adesivas, observado nos neutrófilos de pacientes falciformes possa ser mediado pela alteração na afinidade das integrinas, e não por alterações da expressão na superfície celular. Neste trabalho, a expressão da subunidade alfa da integrina VLA-4 (CD49d) foi também determinada na superfície dos neutrófilos de pacientes. O envolvimento da integrina $\beta 1$ tem sido implicado no recrutamento dos neutrófilos durante a inflamação crônica (BURNS et al., 2001; ISSEKUTZ e NAKAZATO, 2003) e há evidência de que a sinalização de NO possa ter um papel no controle da expressão da integrina VLA-4 (CD49d/CD29) na superfície dos neutrófilos (CONRAN et al., 2003). Nenhuma alteração significativa na expressão de CD49d foi encontrada na superfície dos neutrófilos de pacientes falciformes comparados aos controles.

A incubação dos neutrófilos com um doador de NO, o nitroprussiato de sódio (SNP), além de reduzir a adesão dos neutrófilos à FN e ao ICAM-1 nos pacientes falciformes, reduziu significativamente a expressão de CD11a nos neutrófilos de pacientes para níveis de expressão similares ao grupo de neutrófilos controles. Contudo, a incubação não diminuiu a expressão na superfície celular da principal integrina nos neutrófilos, a Mac-1, como demonstrada pela inalteração da expressão de CD11b após incubação com SNP. Esses dados sugerem que a redução na adesão dos neutrófilos após o uso de SNP poderia estar relacionada não apenas à diminuição da expressão da LFA-1 na superfície das células, mas sim, à alteração na função da molécula de adesão, como alteração na afinidade ou na avidéz das moléculas de adesão já expressa na superfície das células. Similarmente, a sinalização dependente de NO tem mostrado alteração na função da integrina plaquetária GPIIb/IIIa, assim como alteração na afinidade ou avidéz da integrina VLA-4 nos eosinófilos e alteração na afinidade ou avidéz da integrina Mac-1 nos neutrófilos (CONRAN et al., 2001; CONRAN et al., 2003; GRIES e BODE, 1998).

De maneira interessante, os neutrófilos de pacientes com AF que estavam em uso de HU mostraram diminuição significativa na adesão à FN e ao ICAM-1 se comparados aos pacientes com AF sem HU, apresentando níveis de adesão semelhantes à adesão dos neutrófilos controles. Os metabólitos de NO nos neutrófilos de pacientes com AF em uso de HU foram encontrados em níveis elevados em relação aos níveis de NOx de neutrófilos de pacientes com AF sem uso

de HU. No entanto, os níveis de GMPc intracelulares foram encontrados duas vezes maiores nos neutrófilos de pacientes com AF em uso de HU comparados aos neutrófilos de controles e de pacientes com AF sem HU. A expressão das subunidades de integrinas CD11a, CD11b e CD49d nas superfícies dos neutrófilos não foi encontrada significativamente alterada nos pacientes em uso ou não de HU e nos controles, indicando que a HU pode diminuir a adesão de neutrófilos provavelmente pela alteração na função como observado nos neutrófilos que foram tratados com os doadores de NO.

É possível que o aumento intracelular nos níveis de GMPc observado nos neutrófilos de pacientes com AF em uso de HU possa contribuir para a diminuição observada na adesão. Esses resultados fornecem forte evidência para suportar a hipótese de que a HU possa exercer efeitos na regulação da sinalização de NO-GMPc. Adicionalmente, a HU parece induzir a sinalização de NO-GMPc em células endoteliais (COKIC et al., 2006) e níveis aumentados de GMPc foram encontrados no plasma e em células vermelhas de pacientes em uso de HU (NAHAVANDI. et al., 2000; 2002; CONRAN et al., 2004). Desse modo, a HU poderia mediar a redução da adesão dos leucócitos pela elevação dos níveis intracelulares de GMPc.

Embora a diminuição da biodisponibilidade de NO não deva ser o principal fator para o aumento das propriedades adesivas dos leucócitos de pacientes com AF, as estimulações farmacológicas da via dependente de GMPc poderiam representar um alvo potencial na redução da adesão dos neutrófilos ao endotélio vascular. Os resultados com agentes doadores de NO mostraram que esses agentes possuem potencial para utilização in vivo como uma forma de tratamento. Inibidores da guanilato ciclase, tais como o BAY 41-2272, são utilizados com sucesso para o tratamento de doenças cardiovasculares, hipertensão pulmonar e inflamação, em modelos animais (BOERRIGTER e BURNETT, 2007; FREITAS et al., 2006; EVGENOV et al., 2006). Como alternativa, drogas que têm efeito célula-específico, tais como os inibidores das fosfodiesterases (PDE), podem ser mais efetivas para reduzir a alteração específica na função dos neutrófilos de pacientes com AF. O sildenafil, um inibidor potente específico da PDE5, expresso também em leucócitos, teve efeitos benéficos em testes clínicos realizados nos pacientes com AF com hipertensão pulmonar (MACHADO et al., 2005) e foi eficaz no reparo da alteração da adesão dos neutrófilos de pacientes com AF. (ALMEIDA et al., 2007).

Adicionalmente além da redução na adesão e do aumento do GMPc observado nos pacientes com AF em uso de HU, esses pacientes apresentaram também níveis reduzidos de AMPc se comparados aos pacientes com AF sem uso de HU (CONRAN et. al., 2007). Possivelmente ocorreu um “cross talk” entre as vias GMPc e AMPc, que resultou alterações no balanço dos nucleotídeos cíclicos com uma consequente diminuição da função adesiva nos neutrófilos dos pacientes.

Para investigar a via de sinalização envolvida na função alterada dos neutrófilos de pacientes com AF, foi utilizado um inibidor de PKA, o KT5720, que reverteu o aumento da adesão dos neutrófilos, indicando que a regulação da via de sinalização do AMPc poderia ser responsável pelas alterações funcionais nos neutrófilos de pacientes com AF. O inibidor de PKA também reverteu o aumento da adesão dos neutrófilos estimulados por IL-8 indicando que a via dependente de AMPc poderia mediar alterações no estado inflamatório crônico da doença. A quimiocina IL-8, é encontrada elevada na circulação dos pacientes com AF (GONÇALVES et al., 2001; LANARO et al., 2006) e aumenta a adesão dos neutrófilos à FN com concomitante aumento nos níveis de AMPc. Outros fatores inflamatórios são encontrados elevados no plasma de pacientes com AF, incluindo GM-CSF, TNF-alfa, IL-6 e prostaglandinas E1 e E2 (FADLON et al., 1998; LANARO et al., 2006; CONRAN et al., 2007; CROIZAT, 1994), e são capazes de aumentar os níveis intracelulares de AMPc (CONRAN et al., 2007), sugerindo que a sinalização da via de AMPc poderia regular algumas funções dos neutrófilos e que as consequentes alterações seriam induzidas pelo estado inflamatório característico dessa doença.

Em relação à adesão de neutrófilos de controles, observou-se também um aumento na adesão após estímulo com IL-8, concomitante a um aumento nos níveis de AMPc. Esse incremento, no entanto, foi bastante inferior aos níveis de adesão dos neutrófilos de pacientes com AF, sugerindo que poderia ter ocorrido um aumento não específico na adesão dos controles, mas esse aumento não foi reduzido significativamente quando inibido pela KT 5720, como observada na adesão dos pacientes com AF. Similarmente, os pacientes com AF em uso de HU também não apresentaram redução significativa na adesão pelo inibidor da PKA, indicando que a redução do AMPc intracelular poderia contribuir para a diminuição das propriedades adesivas dos neutrófilos em pacientes com AF em uso de HU.

O mecanismo pelo qual a HU reduz o AMPc em neutrófilos ainda não está claro, mas especula-se que possa ocorrer como consequência da redução na intensidade do estado inflamatório destes indivíduos. Níveis reduzidos de GM-CSF e TNF-alfa foram relatados em pacientes com AF tratados com HU (LANARO et al., 2006; CONRAN et al., 2007). Por outro lado, as propriedades doadoras de NO da HU (BURKITT e RAAFAT, 2006) poderiam alterar o balanço intracelular dos nucleotídeos cíclicos nos neutrófilos de pacientes com AF com o “cross talk” com a via de sinalização dependente de GMPc. Esses dados mostraram que um dos benefícios associados à terapia de HU seria a redução nas propriedades adesivas dos leucócitos, que têm um papel crucial no processo vaso-oclusivo. Várias evidências sugerem que a sinalização dependente de AMPc exerce papel pró e antiinflamatório nos leucócitos (LORENOWICZ et al., 2007). A elevação nos níveis de AMPc parece regular negativamente a adesão dos leucócitos por indução da L-selectina e por inibição da expressão e ativação da integrina $\beta 2$ durante a indução da adesão (BERENDS et al., 1997; DERIAN et al., 1995). No entanto, outros estudos mostraram que a atividade da PKA pode ser necessária para sustentar a adesão mediada pelo agrupamento da integrina (LORENOWICA et al., 2007; JONES, 2002). Nesse estudo foi confirmado que os neutrófilos de pacientes com AF possuem alterações nas suas propriedades adesivas, com aumento na adesão à FN e ao ICAM-1. Tais alterações podem ter importantes implicações na fisiopatologia da AF. A elucidação das funções alteradas dos leucócitos e das vias de sinalização que controlam essas alterações é essencial para a compreensão da fisiopatologia da doença e para a identificação de alvos moleculares candidatos para o tratamento de numerosas manifestações da doença.

CONCLUSÕES

6.1 Conclusões

Os resultados desse trabalho mostraram que a adesão dos neutrófilos de pacientes com AF à FN e ao ICAM-1 está elevada. Este incremento na adesão poderia ser justificado, em parte, pela diminuição na biodisponibilidade de NO encontrada nos neutrófilos dos pacientes falciformes. Além disso, os doadores farmacológicos de NO inibiram significativamente essa adesão. Esse efeito, parece ser mediado por via dependente de GMPc.

Adicionalmente, foi possível mostrar que nos neutrófilos de pacientes com AF há aumento nos níveis intracelulares de AMPc, o qual poderia contribuir significativamente para o aumento de suas propriedades adesivas.

Os neutrófilos de pacientes falciformes que fizeram uso de terapia de HU apresentaram redução na adesão dessas células para níveis similares aos controles. Essa inibição esteve associada ao aumento de GMPc intracitoplasmático e à diminuição nos níveis intracelulares de AMPc.

Portanto, intervenções farmacológicas, com doadores de NO e agentes que possam aumentar a sinalização por vias dependentes de GMPc ou agentes inibidores de vias dependentes de AMPc, poderiam representar uma terapêutica para reduzir a vaso-oclusão em pacientes com AF.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7.1 Referências Bibliográficas

- AHLUWALIA, A.; FOSTER, P.; SCOTLAND, R.S.; MCLEAN, P.G.; MATHUR, A.; PERRETTI, S.M. et al. Antiinflammatory activity of soluble guanylate cyclase: cGMP-dependent down-regulation of P-selectin expression and leukocytes recruitment. **PNAS**, 105: 1386-1391, 2004.
- ASSIS, A.; CONRAN, N.; CANALLI, A.A.; LORAND-METZE, I.; SAAD, S.T.O.; COSTA, F.F. Effect o cytokines on sickle neutrophil adhesion to fibronectin. **Acta Haematol.** 481, 2004.
- ALMEIDA, C.B; SAAD, S.T.O.; COSTA, F.F; CONRAN, N. Increase expression of the cGMP-specific phosphodiesterase, PDE9A, in SCD reticulocytes and neutrophils and induction of erythroid gamma globin expression and reduction of SCD neutrophil adhesion following PDE9-inhibition. **American Society of Hematology, Blood**, 110: 995-996, 2007.
- BERENDS, C.; DIJKHUIZEN, B.; DE MONCHY, J.G; DUBOIS, A.E.; GERRITSEN,J; KAUFFMAN, H.F. Inhibition of PAF-induced expression of CD11b and shedding of L-selectin on human neutrophils and eosinophils by the type IV setective PDE inhibitor, rolipram. **Eur Respir J**, 10: 1000-7.
- BOERRIGTER, G.; BURNETT, J.C.J.R. Nitric oxide-independent stimulation of soluble guanylate cyclase with BAY 41-2272 in cardiovascular disease. **Cardiovasc Drug Rev**, 25:30-45, 2007.
- BOGGS, D.R; HYDE, F; SRODES, C. An unusual pattern of neutrophil kinetics in sickle cell anemia. **Blood**, 41: 59, 1973.
- BRADLEY, P.P.; PRIEBAT, D.A.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J. Invest. Dermatol**, 78: 206-209, 1982.
- BUTCHER E.C. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. **Cell**, 67(6):1033-6, 1991.
- BURKITT., M.J; RAAFAT, A. Nitric oxide generation from hydroxyurea: significance and implications for leukemogenesis in the management of myeloproliferative disorders. **Blood**, 107: 2219-22, 2006.

- BURNS, JA; ISSEKUTZ, TB; YAGITA, H; ISSEKUTZ, AC. The alpha 4 beta 1 (very late antigen (VLA)-4, Cd49d/CD29 and alpha 5 beta 1 (VLA-5, CD49e/CD29) integrins mediate beta 2 (CD11/CD18) integrin-independent neutrophil recruitment to endotoxin-induced lung inflammation. **J. Immunol**, 166: 4644-9, 2001.
- CANALLI, A.A; CONRAN, N.; FATTORI, A.; SAAD, S.T.O.; COSTA, F.F. Increased adhesive properties of eosinophils in sickle cell disease. **Experimental Hematology**, 32; 728-734, 2004.
- CARDOSO G.L.; GUERREIRO J.F. African gene flow to north Brazil as revealed by HBB*S gene haplotype analysis. **Am J Hum Biol**, 18(1):93-8, 2006.
- CHIANG, E.Y.; HIDALGO, A.; CHANG, J.; FRENETTE, P.S. Imaging receptor microdomains on leukocyte subsets in live mice. **Nat Methods**, 4: 219-22, 2007.
- COKIC, V.P.; BELESLIN-COKIC, B.B.; TOMIC, M; STOJILKOVIC., S.S; NOGUCHI, C.T.; SCHECHTER, A.N. Hydroxyurea induces the eNOS-cGMP pathway in endothelial cells. **Blood**, 108:184-91, 2006.
- CONRAN, N.; FERREIRA, H.H.A; LORAND-METZE, I.; THOMAZZI, S.M.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Nitric oxide regulates human eosinophil adhesion mechanisms in vitro by changing integrin expression and activity on the eosinophil cell surface. **Br. J. Pharmacol.** 134: 632-638, 2001.
- CONRAN, N.; GAMBERO, A.; FERREIRA, H.H.A.; ANTUNES, E.; NUCCI, G. Nitric oxide has a role in regulating VLA-4-integrin expression on the human neutrophil cell surface. **Biochemical Pharmacology**, 66: 43-50, 2003.
- CONRAN, N.; FERREIRA, H.H.A.; ANTUNES, E.; DENUCCI, G. Inhibition of fMLP-stimulate eosinophil in vitro chemotaxis by N-nitro-L-arginine methyl ester. **Br J Pharmacol**, 125: 30P, 1998.
- CONRAN, N.; ORESKO-SANTOS, C.; ACOSTA, H.C.; FATTORI, A.; SAAD, S.T.; COSTA, F.F. Increased soluble guanylate cyclase activity in the red blood cells of sickle cell patients. **Br J Haematol**, 124:547-54, 2004.

CONRAN, N.; SAAD, S.T.O.; COSTA, F.F; IKUTA, T. Leukocyte numbers correlate with plasma levels of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in sickle cell disease. **Ann Hematol**, 86: 255-61, 2007.

COSTA F.F. Anemia falciforme. In: Marco Antonio Zago, Roberto Passeto Falcão, Ricardo Pasquini (editores). **Hematologia: Fundamentos e Prática**, Editora Atheneu, p.239, 2004.

CRONSTEIN, BN.; WEISSMANN, G (1993). The adhesion molecules of inflammation. **Arthritis Rheum**, 36(2): 147-57, 1993.

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

DAVIES, S. C; BROZOVIC, M. The presentation, management and prophylaxis of sickle cell disease. **Blood Rev**, 3(1): 29-44, 1989.

DECATERINA, R.; LIBBY, P.; PENG, H.B.; THANNICKAL, V.J.; RAJAVASHISTH, T.B.; GIMBRONE, M.A. et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. **J Clin Invest**, 96: 60-68, 1995.

DEL POZO, M.A.; SANCHEZ-MATEOS, P.; NIETO, M.; SANCHEZ-MADRID, F. Chemokines regulate cellular polarization and adhesion receptor redistribution during lymphocyte interaction with endothelium and extracellular matrix. Involvement of cAMP signaling pathway. **J Cell Biol**, 131: 495-508, 1995.

DERIAN, C.K.; SANTULLI, R.J.; RAO, P.E.; SOLOMON, H.F.; BARRETT, J.A. Inhibition of chemotactic peptide-induced neutrophil adhesion to vascular endothelium by cAMP modulators. **J Immunol**, 154: 308-17.

DIGGS, L.W. The blood picture in sickle cell anemia. **South Med J**, 25: 615, 1932.

DUIJS, A.J.; PIETERS, R.C.; SALEH, A.W.; van ROSMALEN, E.; KATERBERG, H.; BEREND, K. et al. Enhanced levels of soluble VCAM-1 in sickle cell patients and their specific increment during vasoocclusive crisis. **Clin Immunol Immunopathol**, 81:86-98.1996.

- ELFERINK, J.G.; DE KOSTER, B.M. The effect of thimerosal on neutrophil migration: a comparison with the effect on calcium mobilization and CD11b expression. **Biochem Pharmacol**, 55(3):305-12, 1998.
- ELFERINK, J.G.; DE KOSTE, BM. Inhibition of interleukin-8- activated human neutrophil chemotaxis by thapsigargin in a calcium- and cyclic AMP-dependent way. **Biochem Pharmacol**, 59: 396-75, 2000.
- ENWONWU, C.O; XU., X.X; TURNER, E. Nitrogen metabolism in sickle cell anemia: Free amino acids in plasma and urine. **Am J Med Sci**, 300: 366-371, 1990.
- EVGENOV, O.V.; PACHER, P.; SCHMIDT, P.M.; HASKO, G.; SCHMIDT, H.H.; STASCH, J.P. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. **Nat Rev Drug Discov**, 5:755-68, 2006.
- FADLON, E.; VORDERMEIER, S.; PEARSON, T.C.; MIRE-SLUIS, A.R.; DUMONDE, D.C.; PHILLIPS, J. et al. Blood polymorphonuclear leukocytes from the majority of sickle cell patients in the crisis phase of the disease show enhanced adhesion to vascular endothelium and increased expression of CD64. **Blood**, 91: 266-274, 1998.
- FERREIRA, H.H.A.; MEDEIROS, M.V.; LIMA, C.S.P.; LORES, C.A.; SANNMIYA, P.; ANTUNES & DENUCCI. G. Inhibiton of esonophil chemotaxis by chronic blockade of nitric oxide biosynthesis. **Eur. J. Pharmacol**, 310: 201-207, 1996.
- FERREIRA, H.H.; BEVILACQUA, E.; GAGIOTI, S.M.; DE LUCA, I.M.; ZANARDO, R.C.; TEIXEIRA, C.E. et al. Nitric oxide modulates eosinophil infiltration in antigen-induced airway inflammation in rats. **Eur J Pharmacol**, 9;358(3):253-9, 1998.
- FREITAS, C.F.; MORGANTI, R.P.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Effect of BAY 41-2272 in the pulmonary hypertension induced by heparin-protamine complex in anaesthetized dogs. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 34:10-4, 2007.
- FRENCH, J.A.; KENNY, D.; SCOTT, J.P.; HOFFMANN, R.G.; WOOD, J.D.; HUDETZ, A.G. et al. Mechanism of stroke in sickle cell disease: Sickle erythrocytes decrease cerebral blood flow in rats after nitric oxide synthase inhibition. **Blood**, 89:4591-4599, 1997.
- FRENETTE, P.S. Sickle cell vaso-occlusion: multistep and multicellular paradigm. **Current Opinion in Hematol**, 9: 101-6, 2002.

- GARG, U.C.; HASSID, A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. **J Clin Invest**, 83:1774-7, 1989.
- GLADWIN, M.T.; SHELHAMER, J.H.; OGNIBENE, F.P.; PEASE-FYE, M.E.; NICHOLS, J.S.; LINK, B. et al. Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease. **Br. J. Haematol**, 116: 436-444, 2002.
- GLADWIN, M.T.; SCHECHTER, A.N. Nitric oxide therapy in sickle cell disease. **Semin. Hematol**, 38: 333-342, 2001.
- GONÇALVES, M.S.; QUEIROZ, I.L.; CARDOSO, S.A.; ZANETTI, ^a; STRAPAZONI, A.C.; ADORNO, E. et al. Interleukin 8 as a vaso-occlusive marker in Brazilian patients with sickle cell disease. **Braz J Med Biol Res**, 34(10):1309-13, 2001.
- GRIES, A.; BODE, C.; PETER, K.; HERR, A.; BOHRER, H.; MOTSCH, J.; MARTIN, E. Inhaled nitric oxide inhibits human platelet aggregation, P-selectin expression, and fibrinogen binding in vitro and in vivo. **Circulation**, 97(15): 1481-7, 1998.
- HEBBEL, R. P. Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. **J Clin Invest** 100(11 Suppl): S83-6, 1997.
- HEIT, B.; COLARUSSO, P.; KUBES. Fundamentally different roles for LFA-1, Mac-1 and alpha4-integrin in neutrophil chemotaxis. **J Cell Sci**, 118(Pt 22): 5205-20, 2005.
- HERRICK, J.B. Peculiar elongated and sickled-shaped red blood corpuscle in a case of severe anemia. **Arch. Intern. Med**, 6: 517-21, 1910.
- HOGG, N.; KALYANARAMAN, B.; JOSEPH, J.; STRUCK, A.; PARTHASARATHY, S. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis. **FEBS Lett**, 334:170-4, 1993.
- HOGG, N.; LEITINGER, B. Shape and shift changes related to the function of leukocyte integrins LFA-1 and Mac-1. **J Leukoc Biol**, 69(6): 893-8, 2001.
- HYNES, R.O.; LANDER, A.D. Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. **Cell**, 68(2):303-22, 1992.

- IGNARRO, L.J. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. **J Physiol Pharmacol**, 53:503-514, 2002.
- INGRAN, V.M. Gene mutation in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle haemoglobin. **Nature**, 180: 326-28, 1957.
- ISSEKUTZ, A C.; NAKAZATO, S. Differential roles of VLA-4(CD49d/CD29) and LFA-1(CD11a/CD18) integrins and E- and P-selectin during developing and established active or adoptively transferred adjuvant arthritis in the rat. **Immunol Cell Biol**, 81(5): 397-408, 2003.
- JONES, S.L. Protein kinase A regulates beta2 integrin avidity in neutrophils. **J Leukoc Bio**, 71: 1042-8, 2002.
- KASSCHAU, M.R.; BARABINO, G.A.; BRIDGES, K.R.; GOLAN, D.E. Adhesion of sickle neutrophils and erythrocytes to fibronectin. **Blood**, 87: 771-780, 1996.
- KATO, G J.; GLADWIN, M.T.; STEINBERG, M.H. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes." **Blood Rev**, 21(1): 37-47, 2007.
- KHAN, B.V.; HARRISON, D.G.; OLBRYCH, M.T.; ALEXANDER, R.W. Nitric oxide regulates VCAM-1 gene expression and resox-sensitive transcription events in human vascular endothelial cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, 93: 9114-9119, 1996.
- KOSONEN, O.; KANKAANRANTA, H.; UOTILA, J.; MOILABNEN, E. Inhibition bu nitric oxide-releasing compounds of E-selectin expression in and neutrophil adhesion to human endothelial cells. **Eur J Pharmacol**, 394:149-56, 2000.
- KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D.N. Nitric oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 88: 4651-4655, 1991.
- LANARO, C; FRANCO-PENTEADO, CF; CONRAN, N; SAAD, STO; COSTA, FF. Anti-inflammatory effect of hydroxyrea therapy in sickle cell disease. **Blood**, 108: 3806, 2006.
- LANCASTER. J.R. A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. **Nitric Oxide**, 1: 18-30, 1997.
- LEE, J O.; BANKSTON, L.A.; ARNAOUT, M.A.; LIDDINGTON, R.C Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation? **Structure**, 3(12): 1333-40, 1995.

- LIU, S. et al. Diffusion-limited reaction fo free nitric oxide with erythrocytes. **J. Biol. Chem**, 273: 18709-18713, 1998.
- LOPEZ, B.L.; DAVIS-MOON, L.; BALLAS, S.K.; CHRISTOPHER, T.A.; DAVIS-MOON, L.; MA, X. Sequential nitric oxide measurements during the emergency department treatment of acute vasoocclusive sickle cell crisis. **Am J Hematol**, 64:15-19, 2000.
- LOPES, B.L.; BARNELL, J.; BALLES, S.K.; CHRISTOPHER, T.A.; DAVIS-MOON, L.; M.A, X. Nitric oxide metabolite levels in acute vaso-occlusive crisis. **Acad. Emerg Med**, 3:1098-1103, 1996.
- LORENOWICZ, M.J.; FERNANDEZ-BORJAS, M.; HORDIJK, P.L. MMMcAMP signaling in leukocyte transendothelial migration. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 27: 1014-22, 2007.
- LUGNIER, C; KERAVIS, T; ECKLY-MICHEL A. Cross talk between NO and cyclic nucleotide phosphodiesterases in the modulation of signal transduction in blood vessel. **J Physiol Pharmacol**, 50:639-652, 1999.
- LUM, AF.; WUN, T.; STAUNTON, D.; SIMON, S.I. Inflammatory potential of neutrophils detected in sickle cell disease. **Am J Hematol**, 76:126-33, 2004.
- MACK, A. K.; KATO, G.J. Sickle cell disease and nitric oxide: a paradigm shift? **Int J Biochem Cell Biol**, 38(8): 1237-43, 2006.
- MACHADO, R.F.; MARTYR, S.; KATO, G.J.; BARST, R.J.; ANTHI, A.; ROBINSON, M.R et al. Sildenafil therapy in patients with sickle cell disease and pulmonary hypertension. **Br J Haematol** 130:445-53, 2005.
- MICHEL, T.; FERON, O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? **J Clin Invest**, 100: 2146-2152, 1997.
- MILLER, S.T.; SLEEPER, L.A.; PEGELOW, C.H.; ENOS, L.E; WANG, W.C.; WEINER, S.J.et al. Prediction of adverse outcomes in children with sickle cell disease. **N. Engl. J. Med**, 342:83-89, 2000.
- MOORE, K.L.; PATEL, K.D.; BREHL, R.E.; JOHNSON, D.A.; LICHENSTEIN, H.S; CUMMINGS, R.D. et al. P-selectin glycoprotein mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. **J Cell Biol**, 128: 661-71, 1995.

MORRIS, C.R.; KUYPERS, F.A.; LARKIN, S.; SWEETERS, N.; SIMON, J.; VICHISKY, E.P.; STYTES, L.A. Arginine therapy: a novel strategy to induce NO production in sickle cell disease. **Br. J. Haematol**, 111: 498-500, 2000.

MORRIS, C.R.; VICHINSKY, E.P.; VAN WARMERDAM, J; MACHADO, L; LARKIN, S.; KUYPERS, F.A. Hydroxyurea and arginine therapy: Impact on nitric oxide production in sickle cell disease. **Blood** suppl, 3262, 2001.

MORRIS, C.R. New Strategies for the Treatment of Pulmonary Hypertension in Sickle Cell Disease : The Rationale for Arginine Therapy. **Treat Respir Med**, 5(1):31-45, 2006.

MORRIS, C.R.; KUYPERS, F.Z.; LARKIN, S.; WEETERS, N.; SIMON, J.; VICHINSKY, E.P. Patters of arginine and nitric oxide in patients with sickle cell disease with vaso-occlusive crisis and chest syndrome. **J Pediatr Hematol Oncol**, 22:515-520, 2000.

MULLER, W.A.; RANDOLPH, G.J. Migration of leukocytes across endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes. **J Leukoc Biol**, 5:698-704, 1999.

MURPHY, M.M.; ZAYED, M.A.; EVANS, A.; PARKER, C.E.; ATAGA, K.L.; TELEN, M.J. et al. Role of RapI in promoting sickle red blood cell adhesion to laminin via BCAM/LU. **Blood**, 105: 3322-9, 2005.

NAHAVANDI, M.; WYCHE, M.Q.; PERLIN, E.; TAVAKKOLI, F.; CASTRO, O. Nitric oxide metabolism in sickle cell anemia patients after oral administration of hydroxyurea. **Hematology**, 5:335-339, 2000.

NAHAVANDI, M.; TAVAKKOLI, F.; WYCHE, M.Q.; PERLIN, E.; WINTER, W.P.; CASTRO, O. Nitric oxide and cyclic GMP levels in sickle cell patients receiving hydroxyurea. **Br J Haematol**, 119: 855-7, 2002 .

NIU, X.F.; SMITH, W.; KUBES P. Intracellular oxidative stress induced by nitric synthesis inhibition increases endothelial cell adhesion to neutrophils. **Circ Res**, 74: 1122-1140, 1994.

OKPALA, I.; DANIEL, Y.; HAYNES, R.; ODOEMENE, D.; GOLDMAN, J. Relationship between the clinical manifestations of sickle cell disease and the expression of adhesion molecules on white blood cell. **Eur J Haematol**, 69: 135-144, 2002.

- PAULING, L.; ITANO, H.A.; SINGER, S.J.; WELLS, I.C. Sick cell anemia: a molecular disease. **Science**, 110: 543-48, 1949.
- 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.**, 330:1639-1644, 1994.
- 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: 1482-9, 1987.
- REITER, C.D.; WANG, X.; TANUS-SANTOS, J.E.; HOGG, N.; CANNO, R.O.; SCHECHTER, A.N.; GLADWIN, M.T. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. **Nature Medicine**, 8: 1383-1389, 2002.
- SARKAR, R; MEINBERG, E.G.; STANLEY, J.C.; GORDON, D.; WEBB, R.C. Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells. **Circ Res**, 78: 225-30, 1996.
- SHIMAOKA, M.; TAKAGI, J.; SPRINGER, T.A. Conformational regulation of integrin structure and function. **Annu Rev Biophys Biomol Struct**, 31:485-516, 2002.
- SHIMIZU, Y; SHAW, S.. Lymphocyte interactions with extracellular matrix. **Faseb**, 5(9): 2292-9, 1991.
- SIMS, T N; DUSTIN, M.L.. The immunological synapse: integrins take the stage. **Immunol Ver**, 186: 100-17, 2002.
- SOLOVEY, A; LIN, Y; BROWNE, P; CHOONG, S; WAYNER, E; HEBBEL, RP. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. **N Engl J Med**, 337(22):1584-90, 1997.
- SOLOVEY A.A.; HARKNESS J.; HEBBEL R.P. Modulation of endothelial cell activation in sickle cell disease: a pilot study. **Blood**, 97(7) 1937-41, 2001.
- STEINBERG, M.H. Management of sickle cell disease. **N Engl J Med**, 340: 1021-30, 1999.
- STEINBERG, M.H.; ADEWOYE, A.H. Modifiers genes and sickle cell anemia. **Curr Opin Hematol**, 13:131-6, 2006.
- TSAO, P.S.; LEWIS, N.P.; ALPERT, S.; COOKE, J.P. Exposure to shear stress alters endothelial adhesiveness. Role of nitric oxide. **Circulation**, 92: 3513-9, 1995.

- TURHAN, A.; WEISS, L.A.; MOHANDAS, N.; COLLIER, B.S.; FRENETTE, P.S. Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: A new paradigm. **PNAS**, 99 (5): 3047-3051, 2002
- VAUGHN, M.W.; K.U.O, L & LIAO, J.C. Effective diffusion distance of nitric oxide in the microcirculation. **Am J Physiol**, 274: H1705-H1714, 1998.
- VESTWEBER, D.; BLANKS, J.E. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. **Physiol Rev**, 79(1): 181-213, 1999.
- WALTER P.B.; FUNG E.B.; KILLILEA D.W.; JIANG Q.; HUDES, M.; MADDEN J.; PORTER J.; EVANS P.; VICHINSKY, E.; HARMATZ P. Oxidative stress and inflammation in iron-overloaded patients with beta-thalassaemia or sickle cell disease. **Br J Haematol**, 135(2):254-63, 2006.
- WAGNER, J.G.; ROTH, R.A. Neutrophil migration mechanisms with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacol Rev**, 52: 349-74, 2000.
- WOOD K.C., GRANGER D.N. Sickle cell disease: role of reactive oxygen and nitrogen metabolites. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 34(9):926-32, 2007.
- YUSUF-MAKAGIANSAR, H.; MAKAGIANSAR, I.T.; HU, Y.; SIAHAAN, T.J. Synergistic inhibitory activity of alpha- and beta-LFA-1 peptides on LFA-1/ICAM-1 interaction. **Peptides**, 22(12):1955-62, 2001.
- ZANARDO, R.C.O.; COSTA, E.; FERREIRA, H.H.A.; ANTUNES, E.; MARINS, A.R.; MURAD, F & DE NUCCI, G. Pharmacological and immunological histochemical evidence for a functional and immunological histochemical evidence for a functional nitric oxide synthase system in rat peritoneal eosinophils. **Proc Natl Acad Sci. USA**, 94: 14114-14114, 1997.
- ZAGO, M.^a; FIGUEIREDO, M.S.; OGO, S.H. Bantu β^S cluster haplotypes predominates among Brazilians blacks. **American Journal Physiology and Anthropology**, 88:295, 1992.
- ZENNADI, R.; HINES, P.C.; DE CASTRO, L.M.; CARTRON, J.P.; PARISE, L.V.; TELEN, M.J. Epinephrine acts through erythroid signaling pathways to activate sickle cell adhesion to endothelium via LW-alpha β 3 interactions. **Blood**, 104: 3774-81, 2004.

ZEIHER, A.M.; FISSLTHALER, B.; SCHARAY-UTZ, B.; BUSSE, R. Nitric oxide modulates the expression of monocytes chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. **Circ Res**, 76:980-6, 1995.

ZHENYU, L.; JASNA, A.; MARTIN, E.; XIAOPING, D. A predominant role for cAMP-dependent protein kinase in the cGMP-induced phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein and platelet inhibition in humans. **Blood**, 101(11):4423-4429, 2003.

8. ANEXOS

Increased adhesive properties of neutrophils in sickle cell disease may be reversed by pharmacological nitric oxide donation

Andreia A. Canalli, Carla F. Franco-Penteado, Sara T. O. Saad, Nicola Conran and Fernando F. Costa

From the Haematology and Haemotherapy Centre, State University of Campinas, UNICAMP, Brazil

ABSTRACT

Increased leukocyte adhesion to vascular endothelium contributes to vaso-occlusion in sickle cell disease (SCD). Since nitric oxide (NO) bioavailability is decreased in SCD and NO may inhibit leukocyte adhesion, we investigated whether stimulation of NO-signaling pathways can reduce the adhesive properties of neutrophils from SCD individuals (SCDneu). SCDneu presented greater adhesion *in vitro* to both fibronectin (FN) and ICAM-1 than control neutrophils. Co-incubation of SCDneu with the NO-donor agents, sodium nitroprusside (SNP) and diethylamine NONOate (DEANO), and the guanylate cyclase stimulator, BAY41-2272, all significantly reduced the increased adhesion to FN/ICAM-1. Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one, a guanylate cyclase inhibitor, reversed SNP/DEANO-diminished adhesion to FN, implicating cGMP-dependent signaling in this mechanism. Interestingly, intracellular cGMP was significantly higher in neutrophils from SCD individuals on hydroxyurea (SCDHUneu). Accordingly, SCDHUneu adhesion to FN/ICAM-1 was significantly lower than that of SCDneu. Agents that stimulate the NO/cGMP-dependent pathway may have beneficial effects on leukocyte function if used in these subjects.

Key words: adhesion, leukocyte, nitric oxide, sickle cell disease, vaso-occlusion.

Citation: Canalli AA, Franco-Penteado CF, Saad STO, Conran N and Costa FF. Increased adhesive properties of neutrophils in sickle cell disease may be reversed by pharmacological nitric oxide donation. *Haematologica* 2008 Apr; 94 (3):xxx-xxx. DOI:10.3324/haematol.12119

©2008 Ferrata Storti Foundation. This is an open-access paper.

Introduction

Leukocytes play a central role in sickle cell disease (SCD) pathophysiology. Sickle cell crises are often associated with infection, neutrophil counts are higher in SCD individuals, and polymorphonuclear leukocytosis has been correlated with an increased rate of early death, acute chest syndrome and stroke.¹ There is growing evidence to suggest that leukocytes participate in the initiation and propagation of vaso-occlusive processes by which the recruitment of large, less deformable, adherent white cells to the vascular endothelium and their interaction with circulating erythrocytes may impair blood flow.²

Neutrophils of SCD individuals are more able to adhere to fibronectin (FN) and to endothelial monolayers than healthy individual neutrophils.³ Neutrophils express a variety of adhesion molecules on their surface that are required for transendothelial migration. The L- and P- selectins mediate

tethering and rolling on the endothelium, while firm adhesion is mediated by the $\beta 2$ integrins Mac-1 (CD11b/CD18) and LFA-1 (CD11a/CD18).⁴ Mac-1 expression has been shown to be increased on stimulated SCD neutrophils.^{5,6} Therefore, pharmacological approaches to inhibit increased leukocyte adhesive interactions may represent important strategies for the prevention of SCD vaso-occlusion.

Recent reports suggest that nitric oxide (NO) bioavailability may be decreased in SCD.⁷ Vascular cell-free hemoglobin, released during hemolysis, can consume the NO produced by endothelial cells thus facilitating vasoconstriction and platelet activation.⁷ NO is also known to affect adhesion mechanisms, inhibiting endothelial adhesion molecule expression⁸ and reducing the adhesive properties of leukocytes.⁹

At present, hydroxyurea (HU) is the only widely-used therapy for the treatment of SCD, reducing the frequency of vaso-occlusive crisis, acute chest syndrome and transfusion, and increasing fetal hemoglobin (HbF) production in erythroid cells.¹⁰ While it has been proposed that HU induces HbF pro-

Acknowledgments: we thank F. Pereira and Prof. I.L. Metze for flow cytometry analysis and Prof. E. Antunes for providing BAY 41-2272.

Funding: this study was supported by grants from CNPq and FAPESP, Brazil. Manuscript received August 13, 2007. Manuscript accepted October 30, 2007.

Correspondence: Fernando Ferreira Costa, M.D. PhD, Hemocentro, Rua Carlos Chagas, 480, Cidade Universitária, Barão Geraldo, Campinas 13083-970-SP, Brazil. E-mail: ferreira@unicamp.br

duction via tyrosyl radical activation on ribonucleotide reductase,¹¹ there is evidence to suggest that HU may induce γ -globin gene expression in erythroleukemic cells and primary human erythroblasts via a NO-guanylate cyclase dependent pathway.^{12,13} Furthermore, data suggest that HU may be oxidized by haem groups to produce NO *in vitro* and *in vivo*,¹⁴ suggesting that HU may act as a donor of NO *in vivo*.

The aim of this study was to compare the adhesive properties of neutrophils from SCD individuals with those on HU therapy. The study also aimed to determine whether the altered NO bioavailability that is characteristic of SCD may cause changes in the intracellular levels of NO metabolites and the principal NO second messenger, cyclic guanosine monophosphate (cGMP, produced by the activation of the guanylate cyclase enzyme). Finally, we determined whether the adhesive properties of SCD neutrophils may be abrogated by pharmacological donation of NO *in vitro*.

Design and Methods

A total of 52 homozygous HbS/S patients were studied 19 of whom were on HU therapy). Six patients were also heterozygous for α -thalassaemia (2 patients on HU and 4 patients not on HU). Patients were not in crisis and had not received blood transfusions in the previous three months. Patients on HU therapy had been taking 20-30 mg/Kg for at least three months. Twenty-four healthy individuals were used as controls (age, 20-50). Informed consent was obtained from all patients and controls, and the study was approved by the local ethics committee. For clinical characteristics of all patients and controls, see *Supplementary Table 1*.

Neutrophils were isolated from peripheral blood¹⁵ and static assays¹⁵ were performed to determine their adhesion (2×10^6 neutrophils/mL RPMI medium) to immobilised FN (20 μ g/mL) or recombinant ICAM-1 (10 μ g/mL) (30 mins., 37°C, 5% CO₂). The adhesion assay and materials used in this study are described in *Supplementary Information*. For NO-donor/drug co-incubation, cells were co-incubated during the adhesion assay.

Total NO metabolites (NOx; nitrite plus nitrate) were quantified in lysed neutrophil (5×10^6 cells/mL) ultrafiltrates using a nitrate/nitrite colorimetric assay kit (Cayman, Ann Arbor, MI, USA) (see *Supplementary Information*). For intracellular cGMP determination, isolated neutrophils (1×10^7 cells/mL PBS) were incubated with a phosphodiesterase inhibitor and cyclic nucleotides were extracted with perchloric acid (see *Supplementary Information*) before quantifying cGMP using commercially available ELISA kits (Cayman Laboratories, Ann Arbor, MI, USA).

For flow cytometry, isolated neutrophils (5×10^6 cells/mL) were incubated with anti-CD11a FITC, anti-

CD11b Alexa Fluor and/or anti-CD49d PE monoclonal antibody (20 mins., RT, in the dark) and processed as described in *Supplementary Information*. Results are expressed as geometric mean cell fluorescence intensity values compared to that of isotype controls.

Results are expressed as means $\pm$ S.E.M. Statistically significant differences between groups were determined using the Mann-Whitney non-parametric test. The Student's paired t-test was used to compare groups before and after treatment with specified drugs. Statistical significance was established as $p < 0.05$.

Results and Discussion

Leukocyte adhesion to the endothelium of the microcirculation plays a key role in SCD vaso-occlusion.² Therefore, therapeutic approaches to inhibit this adhesion may be important for the prevention of vaso-occlusion. Figure 1 confirms the increased ability of neutrophils from SCD individuals (SCDneu) to adhere to FN, an extracellular matrix component, and further demonstrates an increased ability of these cells to adhere to recombinant ICAM-1, an adhesion molecule expressed on activated endothelial cells. Heterozygosity for α -thalassaemia did not significantly alter SCDneu adhesive properties (*data not shown*).

Decreased NO bioavailability may contribute to the pathophysiology of SCD.⁷ Intracellular levels of NOx were significantly lower in SCDneu compared to levels in healthy control neutrophils (3.68 ± 0.35 vs. 7.04 ± 1.38 μ M/ 1×10^6 cells; $p < 0.05$; $n = 9$, respectively), indicating that reduced NO bioavailability may result in decreased NO signaling in SCD leukocytes. Intracellular levels of the NO second messenger, cGMP, however, were not significantly different in SCD and control neutrophils (0.104 ± 0.023 vs. 0.114 ± 0.021 pMol/ 1×10^7 cells; $p > 0.05$; $n = 19$; $n = 11$, respectively). Whether a reduction in intracellular NO-dependent signaling contributes to the increase in leukocyte adhesive properties in SCD must still be determined. There is, however, some evidence that the up-regulation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-dependent signaling may contribute to increase the adhesive properties of SCD neutrophils.^{15,16} This could be due to augmented serum inflammatory factors in SCD.

Pharmacological stimulation of the NO-dependent pathway with the NO donors Diethylamine NONOate (DEANO; 1 μ M) and sodium nitroprusside (SNP; 10 μ M) significantly abrogated the adhesion of SCD, but not control neutrophils (CONneu), to both FN and ICAM-1 (Figure 2). Furthermore, the NO-independent guanylate cyclase activator BAY 41-2272 (150 nM) also significantly decreased SCDneu, but not CONneu, adhesion to FN and ICAM-1 (Figure 2). Co-incubation of SCDneu with the NO donors DEANO (1 μ M) or SNP (10 μ M), and with the inhibitor of guanylate

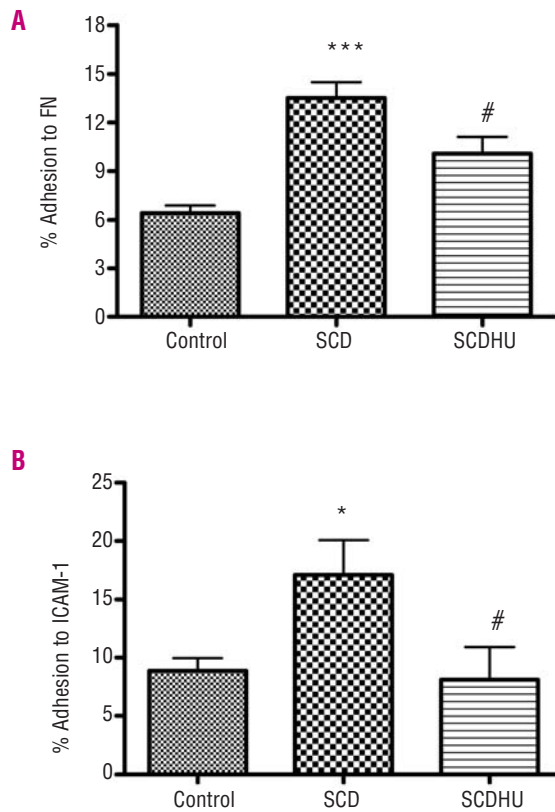


Figure 1. Adhesion of neutrophils isolated from control individuals, steady-state SCD individuals (SCD) and steady-state SCD individuals on hydroxyurea therapy (SCDHU; 20-30 mg/kg/day) to fibronectin (A) and recombinant ICAM-1 (B). Results are expressed as percentage of adherent cells $\pm$ S.E.M. $N \geq 16$ and $N \geq 6$, for (A) and (B) respectively. *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$, compared to control adhesion; #, $p < 0.05$, compared to SCD adhesion.

cyclase 1H-[1,2,4] Oxadiazolo [4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ; 10 μ M), prevented the reduction in SCDneu adhesion to FN that is induced by these NO donors (Figure 2c), suggesting that NO donors may reduce SCD neutrophil adhesion properties via a cGMP-dependent pathway.

The surface expressions of the integrin α -subunits, CD11a and CD11b, were determined on control and SCD neutrophils by flow cytometry (Table 1). Data suggest that the LFA-1 and Mac-1 integrin subunits, CD11a and CD11b, are not expressed at significantly different levels on the surface of SCDneu, compared to CONneu. Some studies have reported an increased CD11b/CD18 expression on unstimulated SCD neutrophils,⁵ while others have detected significantly increased CD11b expression only after cell stimulation.⁶ Integrins can mediate alterations in adhesive properties both following the mobilization of integrins to the cell surface and also as a consequence of changes in integrin affinity and avidity (mediated largely by integrin clustering).^{17,18} The affinity of Mac-1 for its ligands, for example, is dynamically regulated by *inside-out* signaling, producing a form of the integrin that

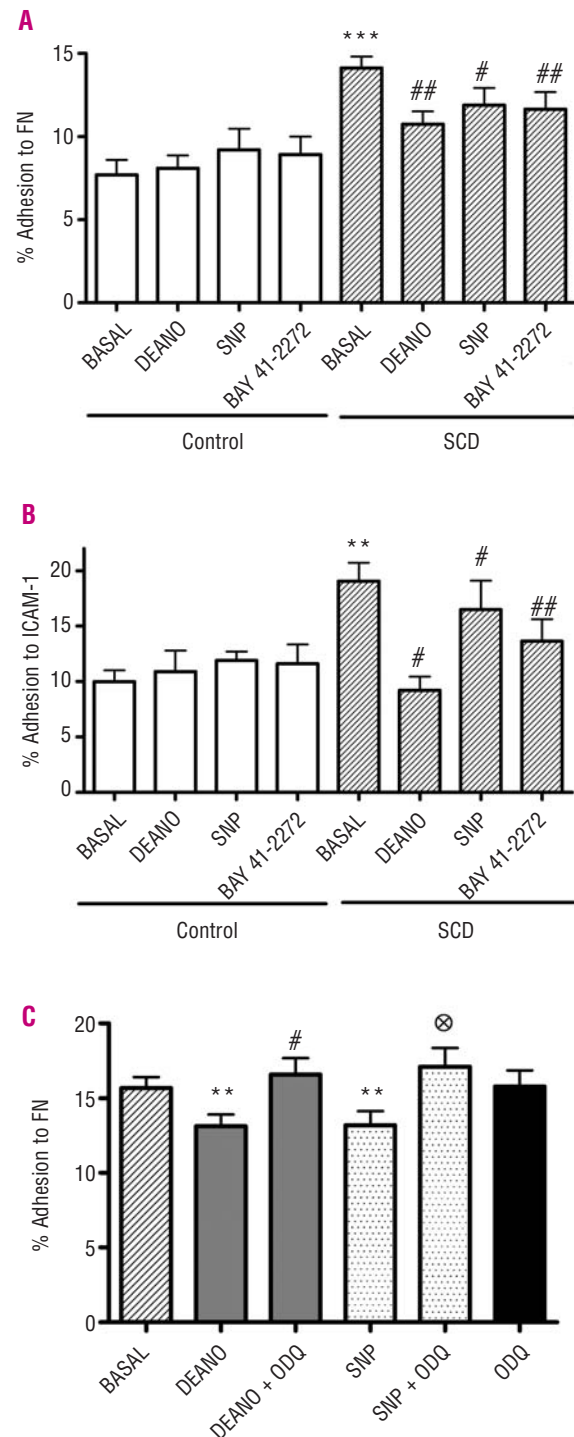


Figure 2. Adhesion of neutrophils isolated from control and SCD individuals to fibronectin (A) and ICAM-1 (B) after or without co-incubation with 1 μ M DEANO, 10 μ M SNP or 150 nM BAY 41-2272. (C) Basal adhesion of SCD neutrophils to fibronectin and adhesion following co-incubation with 1 μ M DEANO, 10 μ M SNP or 150 nM BAY 41-2272 in the presence or absence of the guanylate cyclase activator, ODQ (10 μ M). Results are expressed as percentage of adherent cells $\pm$ S.E.M. $N \geq 5$, $N \geq 3$ and $N \geq 8$ for (A), (B) and (C) respectively. (A) and (B): **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$, compared to basal control neutrophil adhesion; #, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$, compared to basal SCD neutrophil adhesion. (C): **, $p < 0.01$, compared to basal SCD neutrophil adhesion; #, $p < 0.05$, compared to incubation with DEANO alone; ⊗, $p < 0.05$, compared to incubation with SNP alone.

Table 1. Expressions of integrin α -subunits on the surface of neutrophils isolated from control individuals, steady-state SCD individuals (SCD) and steady-state SCD individuals on hydroxyurea therapy (SCDHU; 20-30 mg/kg/day).

Integrin α -subunit		Control		SCD		SCDHU	
		MFI (N=7)	p	MFI (N=8)	P	MFI (N=8)	p
CD11a	Basal	13.82±1.66		16.03±1.27		17.05±1.47	
	SNP	11.55±1.27	>0.05	11.66±0.77	0.0002	14.70±1.50	0.035
CD11b	Basal	162.9±47.8		151.23±32.4		154.0±46.9	
	SNP	191.37±41.8	>0.05	184.73±21.58	>0.05	207.96±33.04	>0.05
CD49d	Basal	7.73±0.72		9.81±0.80		10.53±1.22	
	SNP	7.28±0.59	>0.05	10.03±1.06	>0.05	10.43±1.34	>0.05

Neutrophil surface integrin expressions were determined under basal conditions (basal) and following incubation with 10 μ M SNP (SNP; 30 min; 37°C). Surface expression is reported as mean fluorescence intensity (MFI) on 10 000 cells and results are presented as the mean $\pm$ SEM of n individuals. P values compare SNP-incubated expression to basal expression (paired t-test). No significant differences were found between surface integrin expressions for the control, SCD and SCDHU groups (unpaired t-test).

binds to its substrate with a much greater affinity.¹⁷ It is, therefore, possible that the increased adhesive properties of SCD neutrophils observed may be mediated by alterations in integrin affinity rather than expression. The surface expression of the VLA-4 integrin subunit, CD49d, was also determined on SCDneu, since the involvement of β 1 integrins has been implicated in neutrophil recruitment during chronic inflammation¹⁹ and NO signaling may have a role in controlling VLA-4 integrin expression on the neutrophil cell surface.⁹ No significant alteration in CD49d expression was found, however, on the surface of SCDneu. Interestingly, following incubation with 10 μ M SNP (30 mins., 37°C), the surface expression of the CD11a subunit was significantly decreased on both SCD and SCDHU neutrophils to levels similar to those of CONneu (Table 1). However, incubation with a NO donor did not decrease the surface expression of the major neutrophil integrin Mac-1, as demonstrated by the unaltered CD11b expression following incubation with SNP.

Data indicate that a decrease reduction in adhesion molecule expression may not contribute significantly to the reduction in SCD neutrophil adhesion mediated by NO donors. Instead, these agents may abrogate SCD neutrophil adhesion via alterations in the function (via affinity or avidity alterations) of the adhesion molecules already expressed on the cell surface. Similarly, NO-dependent signaling has been shown to alter platelet GPIIb/IIIa integrin function, as well as neutrophil Mac-1 integrin affinity or avidity.^{9,20}

Interestingly, the adhesion of neutrophils from SCD individuals on HU therapy (SCDHUneu) demonstrated a significantly lower adhesion to FN and ICAM-1 that approached that of CONneu adhesion (Figure 1). NOx in these cells were not found to be significantly higher than in SCDneu (SCDHUneu; 4.22±0.92 μ M/1×10⁶ cells; p >0.05; n=11). However, intracellular cGMP levels were found to be approximately doubled in

SCDHUneu compared to control and SCD neutrophils (0.241±0.034 pMol/1×10⁷ cells; p <0.001; n=9).

The surface expressions of the CD11a, CD11b and CD49d integrin subunits were not found to be altered significantly on SCDHUneu, indicating that HU therapy may reduce neutrophil adhesion via alterations in integrin affinity / avidity, as also observed when SCD neutrophils were treated with NO donors. Alternatively, the possibility that SCD neutrophil adhesion may be mediated by receptors other than those studied, here, should not be ruled out. Since activation of cGMP-dependent signaling was found to reduce SCDneu adhesive properties, it is possible that the increased intracellular cGMP levels observed in SCDHUneu may contribute to the observed reduction in adhesion. These results provide further evidence to support the hypothesis that HU may exert some of its effects via up-regulation of NO-cGMP signaling. Indeed, HU has been reported to induce NO-cGMP signaling in endothelial cells¹⁴ and cGMP levels have been found to be increased in the plasma and red cells of SCD individuals on HU.^{21,22} Furthermore, HU may increase NO bioavailability by decreasing hemolysis and, in turn, decreasing NO scavenging by cell-free plasma hemoglobin and arginine scavenging by cell-free arginase.⁷ The correlation of SCD/SCDHU neutrophil adhesiveness to markers of the hemolytic rate, hemoglobin levels and reticulocyte counts did not, however, reveal any significant associations with hemolytic rate (*results not shown*). While HU may mediate a reduction in leukocyte adhesion by decreasing intracellular cGMP levels, other mechanisms may also participate in the HU-mediated effect. In accordance with evidence that intracellular cAMP may participate in increased SCD neutrophil adhesive properties,¹⁵ cAMP levels were found to be reduced in SCD patients on HU therapy¹⁶ and it is possible that cross talk between the cAMP and cGMP pathways may result in alterations in the cyclic nucleotide balance with a conse-

quent reduction in SCD neutrophil adhesive function.

Our data suggest that although decreased NO bioavailability may not play a major role in the increased adhesive properties of SCD leukocytes, pharmacological stimulation of the cGMP-dependent pathway may be a potential approach for reducing neutrophil adhesion to the vascular endothelium. A number of NO-donating agents and drugs that stimulate cGMP accumulation show potential for use *in vivo*. Guanylate cyclase inhibitors, such as BAY 41-2272, have been successfully used to treat animal models of cardiovascular disease, pulmonary hypertension and inflammation.²³⁻²⁵ Alternatively, drugs that have a more cell-specific effect, such as inhibitors of phosphodiesterases (PDE) may prove more effective in specifically reversing altered SCD neutrophil function. For example, sildenafil, a PDE5-specific inhibitor, is being tested clinically in SCD

patients with pulmonary hypertension²⁶ and should it be found that this or any other PDE is expressed in leukocytes, such PDE inhibitors may also have the potential for abrogating altered SCD neutrophil adhesion.

Autorship and Disclosures

AAC and NC conceived the project, designed and performed experiments, analyzed and interpreted data, and wrote the manuscript. CFP performed experiments. CFP and STOS assisted in data interpretation and approved the final manuscript. FFC contributed to project design, data interpretation and the final revision of the paper.

The authors report no potential conflicts of interest relevant to this paper.

References

- Okpala I. The intriguing contribution of white blood cells to sickle cell disease - a red cell disorder. *Blood Rev* 2004;18:65-73.
- Chiang EY, Frenette PS. Sickle cell vaso-occlusion. *Hematol- Oncol Clin North Am* 2005;19:771-84.
- Fadlon E, Vordermeier S, Pearson TC, Mire-Sluis AR, Dumonde DC, Phillips J, et al. Blood polymorphonuclear leukocytes from the majority of sickle cell patients in the crisis phase of the disease show enhanced adhesion to vascular endothelium and increased expression of CD64. *Blood* 1998;91:266-74.
- Petri B, Bixel MG. Molecular events during leukocyte diapedesis. *Febs J* 2006;273:4399-407.
- Lum AF, Wun T, Staunton D, Simon SI. Inflammatory potential of neutrophils detected in sickle cell disease. *Am J Hematol* 2004;76:126-33.
- Assis A, Conran N, Canalli AA, Lorand-Metze I, Saad ST, Costa FF. Effect of cytokines and chemokines on sickle neutrophil adhesion to fibronectin. *Acta Haematologica* 2005;113:130-6.
- Mack AK, Kato GJ. Sickle cell disease and nitric oxide: a paradigm shift? *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38:1237-43.
- De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA Jr, et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995;96:60-8.
- Conran N, Gambero A, Ferreira HH, Antunes E, de Nucci G. Nitric oxide has a role in regulating VLA-4-integrin expression on the human neutrophil cell surface. *Biochem Pharmacol* 2003;66:43-50.
- Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, Barton FB, Eckert SV, et al. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *N Engl J Med* 1995;332:1317-22.
- Yarbro JW. Mechanism of action of hydroxyurea. *Semin Oncol* 1992;19:1-10.
- Ikuta T, Ausenda S, Cappellini MD. Mechanism for fetal globin gene expression: role of the soluble guanylate cyclase-cGMP-dependent protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:1847-52.
- Cokic VP, Smith RD, Beleslin-Cokic BB, Njoroge JM, Miller JL, Gladwin MT, et al. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. *J Clin Invest* 2003;111:231-9.
- Cokic VP, Beleslin-Cokic BB, Tomic M, Stojilkovic SS, Noguchi CT, Schechter AN. Hydroxyurea induces the eNOS-cGMP pathway in endothelial cells. *Blood* 2006;108:184-91.
- Canalli AA, Franco-Penteado CF, Traina F, Saad ST, Costa FF, Conran N. Role for cAMP-protein kinase A signalling in augmented neutrophil adhesion and chemotaxis in sickle cell disease. *Eur J Haematol* 2007;79:330-7.
- Conran N, Almeida CB, Lanaro C, Ferreira RP, Traina F, Saad ST, et al. Inhibition of caspase-dependent spontaneous apoptosis via a cAMP-protein kinase A dependent pathway in neutrophils from sickle cell disease patients. *Br J Haematol* 2007;139:148-58.
- Shimaoka M, Takagi J, Springer TA. Conformational regulation of integrin structure and function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2002;31:485-516.
- Hogg N, Leitinger B. Shape and shift changes related to the function of leukocyte integrins LFA-1 and Mac-1. *J Leukoc Biol* 2001;69:893-8.
- Burns JA, Issekutz TB, Yagita H, Issekutz AC. The $\alpha 4 \beta 1$ (very late antigen (VLA)-4, CD49d/CD29) and $\alpha 5 \beta 1$ (VLA-5, CD49e/CD29) integrins mediate $\beta 2$ (CD11/CD18) integrin-independent neutrophil recruitment to endotoxin-induced lung inflammation. *J Immunol* 2001;166:4644-9.
- Gries A, Bode C, Peter K, Herr A, Bohrer H, Motsch J, et al. Inhaled nitric oxide inhibits human platelet aggregation, P-selectin expression, and fibrinogen binding in vitro and in vivo. *Circulation* 1998;97:1481-7.
- Nahavandi M, Tavakkoli F, Wyche MQ, Perlin E, Winter WP, Castro O. Nitric oxide and cyclic GMP levels in sickle cell patients receiving hydroxyurea. *Br J Haematol* 2002;119:855-7.
- Conran N, Oresco-Santos C, Acosta HC, Fattori A, Saad ST, Costa FF. Increased soluble guanylate cyclase activity in the red blood cells of sickle cell patients. *Br J Haematol* 2004;124:547-54.
- Boerrigter G, Burnett JC, Jr. Nitric oxide-independent stimulation of soluble guanylate cyclase with BAY 41-2272 in cardiovascular disease. *Cardiovasc Drug Rev* 2007;25:30-45.
- Freitas CF, Morganti RP, Annichino-Bizzacchi JM, De Nucci G, Antunes E. Effect of BAY 41-2272 in the pulmonary hypertension induced by heparin-protamine complex in anaesthetized dogs. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007;34:10-4.
- Evgenov OV, Pacher P, Schmidt PM, Hasko G, Schmidt HH, Stasch JP. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:755-68.
- Machado RF, Martyr S, Kato GJ, Barst RJ, Anthi A, Robinson MR, et al. Sildenafil therapy in patients with sickle cell disease and pulmonary hypertension. *Br J Haematol* 2005;130:445-53.

Increased adhesive properties of neutrophils in sickle cell disease may be reversed by pharmacological nitric oxide donation

Andreia A. Canalli, Carla F. Franco-Penteado, Sara T. O. Saad, Nicola Conran and Fernando F. Costa

From the Haematology and Haemotherapy Centre, State University of Campinas, UNICAMP, Brazil

Materials and Methods

Materials

Recombinant human ICAM-1 (10 µg/mL) was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). Fibronectin (FN) was from Invitrogen (California, USA). Diethylamine NONOate (DEANO) was from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA), sodium nitroprusside (SNP) and ODO were from Sigma Co. (St Louis, MO, USA) and BAY 41-2272 was kindly provided by Dr. Edson Antunes, University of Campinas, Brazil. Alexa Fluor anti-CD11b (Clone ICRF44), anti-CD11a FITC (Clone G43-25B), and anti-CD49d PE (Clone HUTS-21) were purchased from BD Biosciences Pharmingen (San Jose, CA, USA). All other products were bought from Sigma Co. (St Louis, MO, USA) unless otherwise stated.

Isolation of human neutrophils from peripheral blood

Neutrophils were isolated from peripheral blood. Briefly, whole blood was placed over two layers of Ficoll-Paque of densities of 1.077 and 1.119 g/L respectively. After separation of monocytes and granulocytes by centrifugation at 700g for 30 mins., the granulocyte layer was washed once in PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4) before lysing contaminating red cells (10 min, 4°C, lysis buffer; 155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃). Cells were washed once again in RPMI medium before resuspending in RPMI medium. Cells were counted using the Advia Hematology System (Bayer, Tarrytown, NY), cytospinned onto slides and a cell differentiation count performed. Neutrophil suspensions with purity greater than 92% were used immediately in assays; contaminating cells were mainly lymphocytes and eosinophils.

Neutrophil adhesion assays

Ninety-six-well plates were prepared by coating individual wells overnight at 4°C with 60 µl of fibronectin solution (20 µg/ml in PBS) or recombinant ICAM-1 (10 µg/mL in PBS). Wells were washed twice with PBS before blocking non-coated sites with 0.5% (w/v) BSA for 90 mins. at 37°C. Wells were washed twice again with PBS before allowing plates to dry. Neutrophils (50 µl of 2×10⁶ cells/mL) were seeded onto the plate and cells were allowed to adhere to FN or ICAM-1 for 30 mins. at 37°C, 5% CO₂. Following incubation, non-adhered cells were discarded and wells washed three times with PBS. RPMI (50µl) was added to each well and varying concentrations of the original cell suspension (0-100 %) were added to empty wells to form a standard curve. Percentage cell adhesion was calculated by measuring the myeloperoxidase content¹ of each well and comparing to the standard curve for each individual study subject. For NO-donor/drug co-incubation, cells were co-incubated during the adhesion assay.

Total nitric oxide metabolite (NOx) measurement

Neutrophils (5×10⁶/mL) were lysed in UltraPure water and stored until the time of assay (-20°C). For assay, cell extracts were ultrafiltered through 10 kDa molecular weight cut-off filters (Millipore Corp., Bedford, MA, USA). Following reduction of nitrate to nitrite with nitrate reductase, total NOx (nitrite plus nitrate) in samples were measured using a nitrate/nitrite colorimetric assay kit (Cayman, Ann Arbor, MI, USA).

Measurement of intracellular cGMP

For the measurement of intracellular cGMP, isolated neutrophils (1×10⁷ cells/ml PBS) were incubated with the phos-

Supplementary References

1. Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982;78:206-9.

phodiesterase inhibitor, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, 2mM; 30 mins., RT). Perchloric acid was then added to samples (4 % v/v final concentration) and, following centrifugation (6 000 g, 20 mins.), supernatants were retained and the pH neutralized by 8 M KOH addition. Samples were stored at -20°C and assayed for cGMP using commercially available ELISA kits (Cayman Laboratories, Ann Arbor, MI, USA) following the manufacturer's instructions.

Flow Cytometry

For flow cytometry, isolated neutrophils (5x10⁶ cells/mL) were incubated with anti-CD11a FITC, anti-CD11b Alexa Fluor and/or anti CD49d PE monoclonal antibody (20 mins., RT, in the dark). After washing in PBS, cells were fixed in 1% paraformaldehyde/ PBS and then analyzed (10 000) at 488nm on a Becton-Dickinson FACScalibur. SSC/FSC (side scatter/forward scatter) dot plots were used to gate the neutrophil population. Results are expressed as geometric mean fluorescence intensity values compared to that of an iso-type control.

Supplementary Table 1 Clinical details of healthy controls, steady-state SCD patients and steady-state SCD patients on hydroxyurea therapy.

Parameter	Healthy Controls	SCD	P	SCDHU	P
			compared to Controls		compared to SCD
n	24	33		19	
Males	12	13		8	
Age (yrs.)	36.8 ± 9.6	35.2 ± 8.8	N/S	34.7 ± 9.6	N/S
Red blood cell no. (10 ¹² /L)	N/D	2.42 ± 0.66		2.56 ± 0.38	N/S
Hematocrit (%)	42.5 ± 3.6	23.0 ± 4.8	<0.0001	26.0 ± 3.4	<0.01
Hemoglobin (g/dL)	N/D	7.8 ± 1.7		8.8 ± 1.2	<0.01
Mean corpuscular volume (fl)	N/D	96.6 ± 9.5		102.9 ± 15.9	N/S
Mean corpuscular hemoglobin (pg)	N/D	32.8 ± 4.2		34.7 ± 5.4	N/S
WBC (10 ⁹ /L)	N/D	10.4 ± 2.4		8.3 ± 2.7	<0.01
HbF (%)	N/D	6.7 ± 4.2		13.6 ± 6.9	<0.001

SCD, steady-state SCD patients; SCDHU, steady-state SCD patients on hydroxyurea therapy; WBC, white blood cells; HbF, foetal hemoglobin; N/D, not determined; N/S, not significant. Data presented are mean ± S.D. (except n and number of males). Statistical comparisons were made by the Mann-Whitney test.

ORIGINAL ARTICLE

Role for cAMP-protein kinase A signalling in augmented neutrophil adhesion and chemotaxis in sickle cell disease

Andreia A. Canalli*, Carla F. Franco-Penteado*, Fabiola Traina, Sara T.O. Saad, Fernando F. Costa, Nicola Conran

The Haematology and Haemotherapy Centre, State University of Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

Abstract

The significance of the leukocyte in sickle cell disease (SCD) pathophysiology is becoming increasingly recognised; we sought to examine whether the chemotactic properties of neutrophils of SCD individuals may be altered and, further, to better understand the signalling events that mediate altered SCD neutrophil function. Adhesion to immobilised fibronectin (FN) and chemotaxis of control and SCD neutrophils were assessed using *in vitro* static adhesion assays and 96-well chemotaxis chamber assays. Adhesion assays confirmed a significantly higher basal adhesion of SCD neutrophils to FN, compared with control neutrophils. Chemotaxis assays established, for the first time, that SCD neutrophils demonstrate greater spontaneous migration and, also, augmented migration in response to IL-8, when compared with control neutrophils. Co-incubation of SCD neutrophils with KT5720 (an inhibitor of PKA) abrogated increased basal SCD neutrophil adhesion, spontaneous chemotaxis and IL-8-stimulated chemotaxis. Stimulation of SCD neutrophils with IL-8 also significantly augmented SCD neutrophil adhesion to FN with a concomitant increase in cAMP levels and this increase in adhesion was abolished by KT5720. Interestingly, the adhesive properties of neutrophils from SCD individuals on hydroxyurea therapy were not significantly altered and results indicate that a reduction in intracellular cAMP may contribute to lower the adhesive properties of these cells. Data indicate that up-regulated cAMP signalling plays a significant role in the altered adhesive and migratory properties in SCD neutrophils. Such alterations may have important implications for the pathophysiology of the disease and the cAMP-PKA pathway may represent a therapeutic target for the abrogation of altered leukocyte function.

Key words adhesion; cAMP; chemotaxis; inflammation; leukocyte; hydroxyurea; sickle cell disease; signalling

*These authors contributed equally to this study.

Correspondence Nicola Conran, PhD, Hemocentro, Rua Carlos Chagas, 480, Cidade Universitária, Barão Geraldo, Campinas 13083-970, SP, Brazil. Tel: +55 19 3521 8734; Fax: +55 19 3289 1089; e-mail: conran@unicamp.br

Accepted for publication 24 June 2007

doi:10.1111/j.1600-0609.2007.00926.x

Sickle cell disease (SCD) is characterised by a chronic inflammatory state in which the leukocyte plays an important role. High basal leukocyte numbers are associated with increased morbidity and mortality in patients (1); however, the significance of the leukocyte in SCD pathophysiology is now becoming recognised. SCD neutrophils appear to exist in a primed or activated state in the circulation and demonstrate significant functional alterations; for example in apoptotic processes (Conran

et al., in press), in adhesion molecule expression (2, 3) and adhesivity to ECM proteins, endothelial cell layers and endothelial proteins (4–6).

The vaso-occlusive process is thought to constitute a multi-step process, where the recruitment of large, adherent leukocytes to the endothelial vessel wall may impair blood flow and promote erythrocyte sickling and vaso-occlusion by increasing sickle red blood cell transit time in the microcirculation (7). Intravital microscopy

techniques, employing mice expressing sickle haemoglobin, demonstrate that, following an inflammatory stimulus, the adhesion of leukocytes, particularly neutrophils, to the vascular endothelium and the subsequent adhesive interactions of these cells with sickle red cells play a central and, possibly, initiating role in the vaso-occlusive process (8). *In vitro*, neutrophils from SCD patients have been shown to demonstrate increased adhesion to both endothelial layers and to the extracellular matrix component, fibronectin (FN) (5, 6). The $\beta 2$ integrins, particularly the CD11b/CD18 (Mac-1) integrin, have been reported to be more highly expressed on the surface of neutrophils from SCD patients in steady-state (3) and this expression is further increased in the presence of IL-8 (2, 3), indicating that these integrins may be responsible for the increased adhesive properties of SCD neutrophils reported. The principal ligand for the $\beta 2$ integrins is the endothelial receptor, ICAM-1; however, these adhesion molecules are also able to bind to numerous extracellular matrix proteins, such as FN, iC3b and laminin (9–11). In this study, we utilise a static adhesion assay to further investigate SCD neutrophil adhesion, employing FN as a ligand.

Although alterations in the adhesive properties of SCD neutrophils are well documented, the migratory properties of these cells have not been fully explored in SCD. Leukocyte migration from the blood to sites of injury or inflammation is fundamental to the inflammatory response; however, this migration requires tight regulation, as cell infiltration into healthy areas may result in tissue destruction (12). The extravasation of leukocytes across the blood vessel wall involves a series of successive interactions with the endothelium. Leukocyte recruitment is initiated following the selectin-mediated rolling of these cells along the vascular wall. This stage is followed by the integrin-mediated firm adhesion of the leukocyte to the endothelium, followed by the migration of the cell through the endothelium (12). As such, the adhesion of leukocytes to the endothelium constitutes a crucial step in the migration process, as illustrated by the leukocyte

adhesion deficiency syndromes, where impairment of $\beta 2$ integrin expression/function or the absence of functional selectin ligands leads to diminished neutrophil emigration and, consequently, immunodeficiency in these individuals (13, 14).

As alterations in the migratory properties of leukocytes may contribute to inflammatory processes, which are characteristic of the disease, and diverse manifestations that may include pulmonary hypertension and ulceration, we sought to examine whether the chemotactic properties of neutrophils of SCD individuals are altered and, further, to better understand the signalling events, in particular the role of cAMP-dependent kinase (PKA), that mediate altered neutrophil functions.

Materials and methods

Patients

A total of 38 SCD patients diagnosed as homozygous for HbS (using haemoglobin electrophoresis methods and high pressure liquid chromatography) in steady state at the Haematology and Haemotherapy Centre, participated in the study. See Table 1 for patients' clinical characteristics. Patients were not in crisis and had not received blood transfusions in the preceding 3 months. Patients on hydroxyurea (HU) therapy had been taking 20–30 mg/kg/d HU for at least 3 months. Six of the patients were also heterozygous for α -thalassaemia. Healthy individuals were used as controls (aged 20–58 yr). Informed written consent was obtained from all patients and controls and the study was approved by the ethics committee of the University of Campinas.

Materials

The KT5720 and KT5823 inhibitors were purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA), FN was Gibco-Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) and IL-8 was bought from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). All other

Table 1 Clinical details of steady-state SCD patients and steady-state SCD patients on hydroxyurea therapy participating in the study

Parameter	SCD	SCDHU
Male/Female	10/20	4/4
Age (yr)	35.2 (36, 16, 56)	31.3 (31.5, 25, 42)
Red blood cell no. ($10^{12}/L$)	2.56 (2.52, 1.59, 4.68)	2.57 (2.51, 1.92, 3.06)
Haematocrit (%)	23.3 (23.4, 14.9, 33.6)	25.8 (25.9, 19.3, 34.9)
Haemoglobin (g/dL)	7.82 (7.7, 5.0, 10.7)	8.8 (8.8, 6.7, 12.1)
Mean corpuscular volume (fl)	92.5 (94.1, 70.4, 107.5)	107.6 (109.4, 84.8, 119.5)
Mean corpuscular haemoglobin (pg)	31.1 (32.1, 21.0, 36.0)	36.9 (33.0, 30.3, 41.0)
WBC ($10^9/L$)	9.92 (9.9, 4.8, 22.3)	8.81 (8.69, 6.02, 13.01)
HbF (%)	6.36 (5.6, 0.7, 19.7)	14.3 (11.9, 7.7, 26.2)

SCD, steady-state SCD patients; SCDHU, steady-state SCD patients on hydroxyurea therapy; WBC, white blood cells; HbF, foetal haemoglobin. Data presented (except M/F value) are mean (median, min, max).

reagents were from Sigma Chemical (Saint Louis, MO, USA), unless otherwise stated.

Isolation of neutrophils from peripheral blood

Neutrophils were separated from fresh peripheral blood collected in EDTA. Briefly, whole blood was laid over two layers of Ficoll–Hypaque of densities 1.077 g/mL and 1.119 g/mL respectively. After the separation of monocytes and granulocytes by centrifugation at 700 *g* for 30 min, the granulocyte layer was washed once in PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4) before lysing contaminating red cells (10 min, 4°C, lysis buffer; 155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃). Cells were washed once again in RPMI medium (cells counted using the Advia Hematology System, Bayer, Tarrytown, NY, USA) and cells were cytopinned onto slides and a cell differentiation count performed. Neutrophil suspensions were utilised immediately in assays and only when their purity was >92%; contaminating cells were mainly lymphocytes and eosinophils.

Measurement of intracellular cAMP in neutrophils

Perchloric acid was added to washed neutrophils (5×10^6 cells/mL in PBS, pH 7.4) to a final concentration of 4% (v/v) and the samples centrifuged at 6000 *g* for 20 min. Supernatants were removed and retained and the pH neutralised by the addition of 8 M KOH. For IL-8 stimulation, cells were incubated with IL-8 (500 ng/mL) for 30 min (37°C) before extraction of cyclic nucleotides with perchloric acid. Samples were stored at –20°C and assayed for cAMP using commercially available ELISA kits (Cayman Laboratories, Ann Arbor, MI, USA), following the manufacturer's instructions.

Neutrophil adhesion assays

Neutrophil static adhesion assays were performed as previously described (2). Briefly, neutrophils (2×10^6 cells/mL in RPMI medium) were seeded onto 96-well plates previously coated with 20 µg/mL FN; cells were allowed to adhere for 30 min at 37°C, 5% CO₂. Following incubation, non-adhered cells were discarded and wells washed thrice with PBS. RPMI (50 µL) was added to each well and varying concentrations of the original cell suspension were added to empty wells to form a standard curve. Percentage cell adhesion was calculated by measuring the myeloperoxidase (MPO) content (15) of each well and comparing with the standard curve. For inhibitor co-incubation, cells were co-incubated with the inhibitor KT 5720 (2.5 µM) or KT5823 (1 µM) during the adhesion assay. For IL-8 stimulation, cells were co-incubated with IL-8 (500 ng/mL) during the assay.

In vitro neutrophil chemotaxis

Cell migration assays were performed using a 96-well chemotaxis chamber (ChemoTx; Neuro Probe, Gaithersburg, MD, USA). Twenty-five microlitres of cell suspension (4×10^6 cells/mL in RPMI) were added to the upper compartment of the chamber and separated from the lower chamber, which contained 29 µL of RPMI or IL-8 (100 ng/mL), by a polycarbonate filter (5 µm pore). Chambers were incubated (37°C, 5% CO₂) for 120 min. The wells of the upper compartment were emptied by aspiration and then disassembled; cells attached to the upper side of the filter were removed by gentle scraping. To detach adherent neutrophils from the lower surface of the filter, the microtitre plate with attached filter was centrifuged at 1200 rpm for 5 min at room temperature. Plates were then stored frozen overnight before measuring the MPO content as described (15). Migrated neutrophils were calculated by comparing absorbance changes of unknown samples with those of the standard curve, which was formed by measuring the MPO values of different neutrophil numbers. For inhibitor incubation, purified neutrophils were pre-incubated with KT5720 (2.5 µM) or KT5823 (1 µM) for 20 min at 37°C.

Statistical analysis

Data are reported as mean ± SEM and were analyzed using unpaired *t*-tests or paired *t*-tests, as appropriate, unless otherwise specified. A *P*-value of <0.05 was considered statistically significant.

Results

Intracellular cAMP levels are increased in SCD neutrophils and are further increased in the presence of IL-8

Intracellular cAMP levels were compared with control and SCD neutrophils (Table 2). Data demonstrate that cAMP levels are significantly higher in SCD neutrophils

Table 2 Comparison of intracellular cAMP in neutrophils from control and SCD individuals before and after stimulation with IL-8

Neutrophil population	(cAMP) pMol/1 × 10 ⁶ cells			
	Basal	<i>n</i>	IL-8 (500 ng/ml)	<i>n</i>
Control	2.15 ± 0.39	14	3.94 ± 0.87***	8
SCD	4.53 ± 0.38*	25	5.54 ± 0.56***	5
SCDHU	3.26 ± 0.46**	14	N/D	

SCD, steady state sickle cell disease patients.

P* < 0.001, compared with control, Mann–Whitney test; *P* < 0.05, compared with SCD, Mann–Whitney test; ****P* < 0.05, compared with basal levels, paired *t*-test.

than in control neutrophils and neutrophils from SCD patients on HU therapy (SCDHU neutrophils), indicating the existence of an up-regulated cAMP-PKA dependent pathway in these cells. Incubation of cells with IL-8 (500 ng/mL, 30 min, 37°C) resulted in the up-regulation of cAMP levels in both control and SCD neutrophils, demonstrating that inflammatory stimuli may further up-regulate leukocyte cAMP production in SCD.

Augmented SCD neutrophil adhesive properties are reversed by an inhibitor of cAMP-dependent kinase (PKA)

As previously shown, basal adhesion of SCD neutrophils to immobilised FN was significantly higher than that of control neutrophils (Fig. 1A). As cAMP signalling is up-regulated in SCD neutrophils, we co-incubated neutrophils with the PKA inhibitor, KT5720 (2.5 μ M), during adhesion assays; for control neutrophils, we observed no change in adhesion, however SCD neutrophil adhesion was significantly abrogated (Fig. 1A), returning to near control levels. Importantly, the cGMP-dependent protein kinase (PKG) inhibitor, KT 5823 and DMSO vehicle did not alter SCD neutrophil adhesion to FN (Fig. 1A). Stimulation of both control and SCD neutrophils with IL-8 (500 ng/mL) significantly increased their adhesion to FN, see Fig. 1B. Co-incubation of IL-8 stimulated control neutrophils with KT5720 (2.5 μ M) reduced this increased adhesion, but this reduction was not significant. Co-incubation with KT 5720, but not KT 5823, reversed increased IL-8 stimulated SCD neutrophil adhesion (Fig. 1B).

Neutrophils from patients on hydroxyurea do not demonstrate increased adhesion to FN, *in vitro*

Figure 2 demonstrates that neutrophils from SCD patients on HU therapy, in contrast to SCD neutrophils, do not demonstrate a significantly increased adhesion to FN, *in vitro*. Significantly lower levels of cAMP in SCDHU neutrophils than in SCD neutrophils were observed (Table 2); accordingly, co-incubation of SCDHU neutrophils with KT5720 (2.5 μ M) did not alter their adhesion to FN. Stimulation of SCDHU neutrophils with IL-8 (500 ng/mL) induced a non-significant increase in their adhesion to FN, that was not significantly reversed ($P \geq 0.05$) in the presence of KT5720.

The migratory properties of SCD neutrophils are significantly increased

Sickle cell disease neutrophils demonstrated greater spontaneous migration than control neutrophils, in the absence of chemotactic stimulus, in chemotaxis assays.

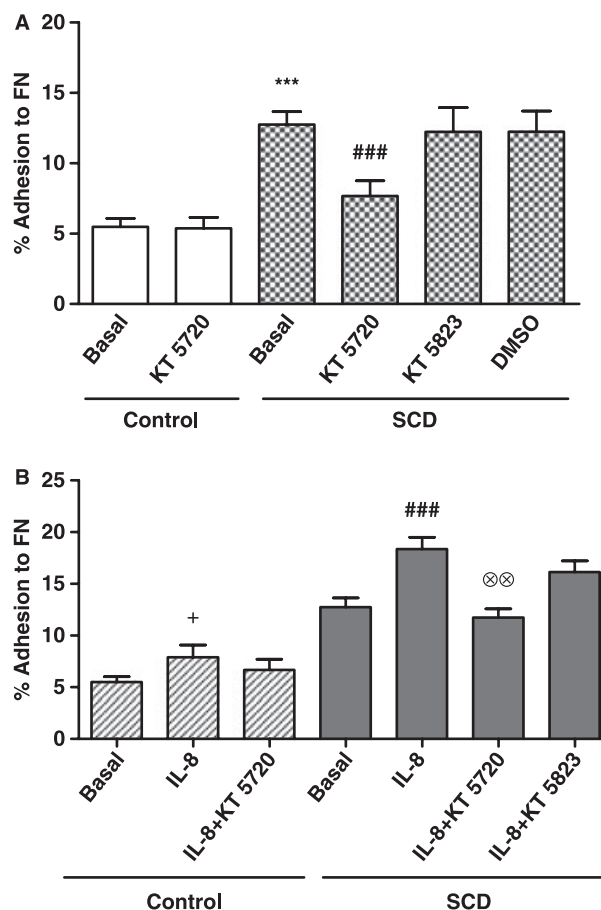


Figure 1 Increased sickle cell disease (SCD) neutrophil adhesion is abrogated by inhibition of PKA. (A) Adhesion of neutrophils from control individuals and steady-state SCD individuals to fibronectin (FN) was compared and the effect of co-incubation of SCD neutrophils with a PKA inhibitor, KT5720 (2.5 μ M), a PKG inhibitor, KT5823 (1 μ M), and DMSO (0.003% v/v) on adhesion of SCD neutrophils to FN was determined. (B) Control and SCD neutrophil adhesion was further stimulated with IL-8 (500 ng/mL) and the effect of co-incubation of SCD neutrophils with a PKA inhibitor, KT5720 (2.5 μ M) and a PKG inhibitor, KT5823 (1 μ M), was observed. *** $P < 0.001$ compared with control cells, Mann-Whitney test; ### $P < 0.001$, compared with basal SCD neutrophil adhesion. ⊗⊗ $P < 0.01$, compared with IL-8-stimulated cells. $n \geq 4$.

Furthermore, augmented migration of SCD neutrophils in response to a chemotactic stimulus, IL-8 (100 ng/mL), was also observed when compared with control neutrophils (Fig. 3).

Augmented SCD neutrophil migratory properties are reversed by an inhibitor of cAMP-dependent kinase (PKA)

The presence of the PKA inhibitor, KT5720, also reversed increased spontaneous migration of SCD

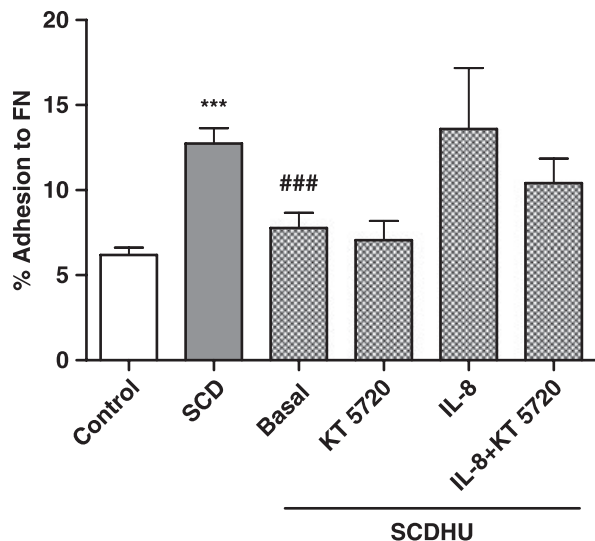


Figure 2 SCDHU neutrophil adhesion to fibronectin (FN) is not significantly augmented. Adhesion of neutrophils from control individuals and steady-state SCD (SCD) individuals and steady-state SCD individuals on HU therapy (SCDHU) to FN was compared and the effect of co-incubation of SCDHU neutrophils with KT5720 (2.5 μ M) on adhesion to FN was determined. SCDHU neutrophils were also stimulated with IL-8 (500 ng/mL) and the effect of co-incubation with KT5720 (2.5 μ M) upon IL-8-stimulated adhesion was observed. *** P < 0.001 compared with control cells; ### P < 0.001, compared with SCD neutrophil adhesion, Mann-Whitney test. $n \geq 6$.

neutrophils in chemotaxis assays, but did not affect control neutrophil spontaneous migration (Fig. 3A). IL-8-stimulated migration of both control and SCD neutrophils was significantly decreased by the PKA inhibitor, KT5720, but not by KT5823 (Fig. 3B), indicating that cAMP-dependent signalling plays a significant role in IL-8-stimulated migration mechanisms, both in normal and SCD neutrophils. DMSO vehicle had no significant effect upon neutrophil chemotaxis (data not shown).

Discussion

In vitro static adhesion assays confirmed that SCD neutrophils demonstrate altered adhesive properties; basal adhesion of SCD neutrophils to immobilised FN was significantly higher than that of control neutrophils. Interestingly, chemotaxis assays established, for the first time, that the migratory properties of SCD neutrophils are also considerably augmented. To investigate the signalling pathways involved in these altered neutrophil functions, intracellular cAMP levels were compared with control and SCD neutrophils; data indicate an up-regulation of the cAMP-dependent pathway in SCD neutrophils.

Based on these results, we utilised an inhibitor of PKA, KT5720, and found that the augmented adhesive and chemotactic abilities of SCD neutrophils are both

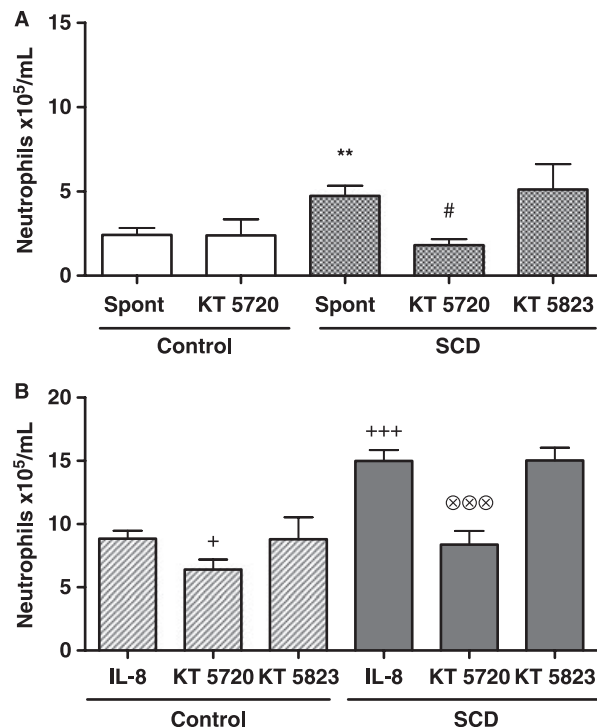


Figure 3 Spontaneous and IL-8-stimulated chemotaxis is increased in sickle cell disease (SCD) neutrophils and reversed by the PKA inhibitor, KT5720. (A) Spontaneous chemotaxis (Spont; without chemotactic stimulus in the bottom of the chamber) was compared for neutrophils from control individuals and steady-state SCD individuals in a ChemotX chamber. The effect of pre-incubation (20 min, 37°C, 5% CO₂) of SCD neutrophils with a PKA inhibitor, KT5720 (2.5 μ M) and a PKG inhibitor, KT5823 (1 μ M), on the spontaneous chemotaxis of SCD neutrophils was determined. (B) IL-8 (100 ng/mL)-stimulated neutrophil chemotaxis was evaluated for control and SCD neutrophils. The effect of pre-incubation of control and SCD neutrophils with a PKA inhibitor, KT5720 (2.5 μ M) and a PKG inhibitor, KT5823 (1 μ M), on the IL-8-stimulated chemotaxis of neutrophils was determined. ** P < 0.01, compared with control neutrophil spontaneous chemotaxis; # P < 0.05, compared with SCD neutrophil spontaneous chemotaxis; + P < 0.05; +++ P < 0.001, compared with control neutrophil IL-8 stimulated chemotaxis; ⊗⊗⊗ P < 0.001 compared with IL-8-stimulated SCD neutrophil chemotaxis. $n \geq 5$.

reversed in the presence of this inhibitor, indicating that up-regulated cAMP signalling may be responsible for these functional alterations in SCD neutrophils. IL-8, a chemokine found in augmented levels in the circulation of SCD individuals (16, 17), markedly increased both the adhesion to FN and chemotaxis of SCD neutrophils, with a concomitant increase in cAMP levels. The PKA inhibitor reversed these increases in IL-8-stimulated adhesive and chemotactic properties, demonstrating that the inflammatory milieu, resulting from the chronic inflammatory state, may further augment altered SCD neutrophil functions, and possibly via a cAMP-dependent pathway. Indeed data suggest that numerous

inflammatory factors found increased in the plasma of SCD individuals, including GM-CSF, TNF- α , IL-6 and prostaglandins E1 and E2 (5, 17–19), are capable of increasing levels of neutrophil intracellular cAMP (Conran *et al.*, in press), suggesting that up-regulated neutrophil cAMP signalling, and consequent alterations in function, are induced by the inflammatory state that is characteristic of the disease. Interestingly, stimulation of control neutrophils with IL-8 also increased their adhesion to FN with a concomitant increase in cAMP levels. Levels of adhesion, however, did not reach those of SCD neutrophils, suggesting that priming of neutrophils may be a requisite for cAMP-mediated neutrophil adhesion in SCD.

Interestingly, neutrophils from SCD patients on HU therapy did not demonstrate any significant alterations in their adhesion to FN, compared with control neutrophils. Similar to control neutrophils, IL-8 stimulation induced a non-significant increase in adhesion that was slightly, but not significantly, inhibited by KT5720. Significantly lower intracellular levels of cAMP were observed in SCDHU neutrophils than in SCD neutrophils, and data demonstrate that basal SCDHU adhesion was not significantly reduced by a PKA inhibitor, indicating that a reduction in intracellular cAMP may contribute to decrease the adhesive properties of neutrophils in individuals on HU therapy. The mechanism by which HU may reduce neutrophil cAMP has yet to be determined, but may occur as a consequence of a general improvement in the inflammatory state in these individuals; GM-CSF and TNF- α levels have both been reported to be lower in patients on HU therapy (17, 18). Alternatively, the nitric oxide donating properties of HU (20) may alter the intracellular cyclic nucleotide balance in SCD neutrophils, via cross-talk with the cGMP-dependent signalling pathway. As such, one of the benefits associated with HU therapy may include a reduction in the adhesive properties of leukocytes, the adhesion of which plays a crucial role in the vaso-occlusive process.

Paradoxical evidence exists to suggest that cAMP-dependent signalling exerts both pro-inflammatory and anti-inflammatory roles in leukocytes (21). cAMP elevation has been shown to negatively regulate leukocyte adhesion by inducing L-selectin shedding and inhibiting β 2 integrin expression and activation during the induction of adhesion (22, 23). However, other studies demonstrate that PKA activity may be necessary for sustained adhesion, mediated by integrin clustering (21, 24). Contrasting effects of cAMP elevation upon leukocyte transendothelial migration have been reported (25, 26); however, a number of authors have suggested a role for PKA signalling in the promotion of leukocyte migration in association with increased α M β 2 integrin surface

expression and adhesion (27, 28); data indicate that increased motility may be mediated by augmented PKA-induced cell polarity and cytoplasmic projection. It has been postulated that small increases in leukocyte cAMP may stimulate cell migration, whilst high concentrations of cAMP may inhibit chemotaxis and, we speculate, adhesion (21).

Thus, whilst the role for cAMP-dependent signalling in neutrophil adhesion and migratory mechanisms is unclear, our data indicate that under certain pathological conditions involving chronic inflammation, such as in SCD, where discrete elevations in neutrophil cAMP levels are observed, cAMP signalling may have a pro-inflammatory role. Compartmentalisation of cAMP signalling has been reported to control the specific activation of certain signalling complexes and different cellular responses (21, 29), and it is possible that modulation in such compartmentalisation or in the PKA-mediated stability of adhesive interactions may participate in the alterations in SCD neutrophil function observed. Up-regulated cAMP-PKA signalling has also been found to inhibit spontaneous apoptosis in SCD neutrophils (Conran *et al.*, in press) and, interestingly, cAMP-mediated activation of BCAM/Lu- and LW(ICAM-4)-dependent adhesion of sickle red blood cell has also been reported (30, 31).

We confirm and demonstrate, herein, that SCD neutrophils display alterations in both their adhesive and migratory properties, presenting increased adhesion to FN and increased spontaneous and chemokine-stimulated chemotaxis *in vitro*. Such alterations may have important implications for the pathophysiology of SCD. Neutrophil adhesion and recruitment to the endothelium make a well-documented contribution to the vaso-occlusive process (7), but these phenomena, in addition to an increased migratory capacity, may contribute to other manifestations of the disease. Recruitment of leukocytes to the pulmonary circulation may play an important role in the pulmonary hypertensive process and neutrophil emigration into the pulmonary interstitium and airspaces may have a significant impact on the function and structure of lung blood vessels, where activated neutrophils may release reactive oxygen species and proteolytic enzymes as well as inflammatory molecules that may perpetuate the inflammatory process (32, 33). Another manifestation, common in SCD, is leg ulceration (34). Venous hypertension is known to activate neutrophils and consequent recruitment to the endothelium of the skin microcirculation inflicts endothelial damage, leading to chronic inflammation of the skin, termed lipodermatosclerosis (35). Such inflammation potentiates the skin's ability to ulcerate in response to minor injury and altered neutrophil adhesive and migratory abilities may well contribute to this process in SCD.

The elucidation of alterations in leukocyte function in SCD, and the signalling pathways that mediate these alterations, is essential for the comprehension of the pathophysiology of the disease and the identification of candidate molecular targets for the treatment of the condition and its numerous manifestations; pharmacological abrogation of the cAMP-PKA pathway in leukocytes may represent such a therapeutic target.

Acknowledgements

This study was supported by FAPESP, Brazil.

References

- Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH, Klug PP. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med* 1994;**330**:1639–44.
- Assis A, Conran N, Canalli AA, Lorand-Metze I, Saad ST, Costa FF. Effect of cytokines and chemokines on sickle neutrophil adhesion to fibronectin. *Acta Haematol* 2005;**113**:130–6.
- Lum AF, Wun T, Staunton D, Simon SI. Inflammatory potential of neutrophils detected in sickle cell disease. *Am J Hematol* 2004;**76**:126–33.
- Canalli AA, Conran N, Saad ST, Costa FF. Inhibition of Increased Sickle Neutrophil Adhesion to Fibronectin and ICAM-1 by a Nitric Oxide Donor. *Blood* 2005;**106**:3776.
- Fadlon E, Vordermeier S, Pearson TC, Mire-Sluis AR, Dumonde DC, Phillips J, Fishlock K, Brown KA. Blood polymorphonuclear leukocytes from the majority of sickle cell patients in the crisis phase of the disease show enhanced adhesion to vascular endothelium and increased expression of CD64. *Blood* 1998;**91**:266–74.
- Kasschau MR, Barabino GA, Bridges KR, Golan DE. Adhesion of sickle neutrophils and erythrocytes to fibronectin. *Blood* 1996;**87**:771–80.
- Chiang EY, Frenette PS. Sickle cell vaso-occlusion. *Hematol Oncol Clin North Am* 2005;**19**:771–84.
- Turhan A, Weiss LA, Mohandas N, Collier BS, Frenette PS. Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;**99**:3047–51.
- Anceriz N, Vandal K, Tessier PA. S100A9 mediates neutrophil adhesion to fibronectin through activation of beta2 integrins. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;**354**:84–89.
- Decleva E, Dri P, Menegazzi R, Busetto S, Cramer R. Evidence that TNF-induced respiratory burst of adherent PMN is mediated by integrin alpha(L)beta(2). *J Leukoc Biol* 2002;**72**:718–26.
- Zhang L, Plow EF. Overlapping, but not identical, sites are involved in the recognition of C3bi, neutrophil inhibitory factor, and adhesive ligands by the alphaMbeta2 integrin. *J Biol Chem* 1996;**271**:18211–6.
- Petri B, Bixel MG. Molecular events during leukocyte diapedesis. *FEBS J* 2006;**273**:4399–407.
- Bunting M, Harris ES, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Leukocyte adhesion deficiency syndromes: adhesion and tethering defects involving beta 2 integrins and selectin ligands. *Curr Opin Hematol* 2002;**9**:30–5.
- Yakubenia S, Wild MK. Leukocyte adhesion deficiency II. Advances and open questions. *FEBS J* 2006;**273**:4390–8.
- Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982;**78**:206–9.
- Goncalves MS, Queiroz IL, Cardoso SA, et al. Interleukin 8 as a vaso-occlusive marker in Brazilian patients with sickle cell disease. *Braz J Med Biol Res* 2001;**34**:1309–13.
- Lanaro C, Franco-Penteado CF, Conran N, Saad ST, Costa FF. Anti-inflammatory effect of hydroxyurea therapy in sickle cell disease. *Blood* 2006;**108**:3806.
- Conran N, Saad ST, Costa FF, Ikuta T. Leukocyte numbers correlate with plasma levels of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in sickle cell disease. *Ann Hematol* 2007;**86**:255–61.
- Croizat H. Circulating cytokines in sickle cell patients during steady state. *Br J Haematol* 1994;**87**:592–7.
- Burkitt MJ, Raafat A. Nitric oxide generation from hydroxyurea: significance and implications for leukemogenesis in the management of myeloproliferative disorders. *Blood* 2006;**107**:2219–22.
- Lorenowicz MJ, Fernandez-Borja M, Hordijk PL. MMcAMP signaling in leukocyte transendothelial migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;**27**:1014–22.
- Berends C, Dijkhuizen B, de Monchy JG, Dubois AE, Gerritsen J, Kauffman HF. Inhibition of PAF-induced expression of CD11b and shedding of L-selectin on human neutrophils and eosinophils by the type IV selective PDE inhibitor, rolipram. *Eur Respir J* 1997;**10**:1000–7.
- Derian CK, Santulli RJ, Rao PE, Solomon HF, Barrett JA. Inhibition of chemotactic peptide-induced neutrophil adhesion to vascular endothelium by cAMP modulators. *J Immunol* 1995;**154**:308–17.
- Jones SL. Protein kinase A regulates beta2 integrin avidity in neutrophils. *J Leukoc Biol* 2002;**71**:1042–8.
- VanUffelen BE, de Koster BM, Elferink JG. Interaction of cyclic GMP and cyclic AMP during neutrophil migration: involvement of phosphodiesterase type III. *Biochem Pharmacol* 1998;**56**:1061–3.
- Elferink JG, de Koster BM. Inhibition of interleukin-8-activated human neutrophil chemotaxis by thapsigargin in a calcium- and cyclic AMP-dependent way. *Biochem Pharmacol* 2000;**59**:369–75.
- del Pozo MA, Sanchez-Mateos P, Nieto M, Sanchez-Madrid F. Chemokines regulate cellular polarization and adhesion receptor redistribution during lymphocyte

- interaction with endothelium and extracellular matrix. Involvement of cAMP signaling pathway. *J Cell Biol* 1995;**131**:495–508.
28. Elferink JG, de Koster BM. The role of cyclic AMP and protein kinase A in stimulation of neutrophil migration by endothelins. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1998;**358**:518–21.
29. Zaccolo M, Di Benedetto G, Lissandron V, Mancuso L, Terrin A, Zamparo I. Restricted diffusion of a freely diffusible second messenger: mechanisms underlying compartmentalized cAMP signalling. *Biochem Soc Trans* 2006;**34**:495–7.
30. Hines PC, Zen Q, Burney SN, Shea DA, Ataga KI, Orringer EP, Telen MJ, Parise LV. Novel epinephrine and cyclic AMP-mediated activation of BCAM/Lu-dependent sickle (SS) RBC adhesion. *Blood* 2003;**101**:3281–7.
31. Zennadi R, Hines PC, De Castro LM, Cartron JP, Parise LV, Telen MJ. Epinephrine acts through erythroid signaling pathways to activate sickle cell adhesion to endothelium via LW- α 5b β 3 interactions. *Blood* 2004;**104**:3774–81.
32. Stenmark KR, Davie NJ, Reeves JT, Frid MG. Hypoxia, leukocytes, and the pulmonary circulation. *J Appl Physiol* 2005;**98**:715–21.
33. Kuebler WM. Inflammatory pathways and microvascular responses in the lung. *Pharmacol Rep* 2005;**57**(Suppl): 196–205.
34. Serjeant GR, Serjeant BE, Mohan JS, Clare A. Leg ulceration in sickle cell disease: medieval medicine in a modern world. *Hematol Oncol Clin North Am* 2005;**19**:943–56.
35. Smith PC. The causes of skin damage and leg ulceration in chronic venous disease. *Int J Low Extrem Wounds* 2006;**5**:160–8.