

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA

NATÁLIA CASTRO DE CARVALHO SCHACHNIK

USO DA CITOMETRIA DE FLUXO PARA ANÁLISE DE ÓXIDO  
NÍTRICO INTRACELULAR EM MONÓCITOS E NEUTRÓFILOS DO  
SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM NEFROPATIA  
CRÔNICA DO ENXERTO

Belo Horizonte

2008

NATÁLIA CASTRO DE CARVALHO SCHACHNIK

USO DA CITOMETRIA DE FLUXO PARA ANÁLISE DE ÓXIDO  
NÍTRICO INTRACELULAR EM MONÓCITOS E NEUTRÓFILOS DO  
SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM NEFROPATIA  
CRÔNICA DO ENXERTO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obter o grau de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luci Maria Sant'Ana Dusse

Co-orientador: Dr. Olindo de Assis Martins-Filho

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Vanessa Peruhype-Magalhães

Belo Horizonte

2008

S291u Schachnik, Natália Castro de Carvalho.  
Uso da citometria de fluxo para análise de óxido nítrico intracelular em monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes com nefropatia crônica do enxerto /  
Natália Castro de Carvalho Schachnik. – 2008.  
129 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Luci Maria Sant'Ana Dusse.

Co-Orientador: Dr. Olindo Assis Martins-Filho.

Co-Orientadora: Dra. Vanessa Peruhype-Magalhães.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Citometria de fluxo – Teses. 2. Imunologia de transplantes – Teses. 3. Monócitos – Teses. 4. Neutrófilos – Teses. 5. Óxido nítrico – Teses. 6. Rins – Transplante – Teses. 7. Rejeição de enxertos – Teses. 8. Tolerância imunológica – Teses. I. Dusse, Luci Maria Sant'Ana. III. Martins Filho, Olindo Assis. IV. Magalhães, Vanessa Peruhype. V. Universidade Federal de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

CDD: 616.079

Mestranda:

Natália Castro de Carvalho Schachnik

Orientadora:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luci Maria Sant'Ana Dusse - Faculdade de Farmácia da UFMG

Co-orientadores:

Dr. Olindo Assis Martins-Filho - Centro de Pesquisas René Rachou / Fiocruz

Dr<sup>a</sup>. Vanessa Peruhype-Magalhães - Centro de Pesquisas René Rachou / Fiocruz

Colaboradores:

Dr. Geraldo Majella Medeiros de Paula - Hospital São Francisco de Assis / Belo Horizonte

Dr. Fernando Lucas Júnior – Hospital das Clínicas / UFMG

Linha de Pesquisa:

Desenvolvimento e Aplicações Analíticas em Química Biológica e Toxicologia

Áreas de conhecimento (CNPq/CAPES):

40101053- Hematologia

Instituições participantes:

Faculdade de Farmácia da UFMG

Centro de Pesquisas René Rachou / Fiocruz

Hospital São Francisco de Assis / Belo Horizonte

Hospital das Clínicas / UFMG

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vida e porque sem Ele nada seria possível.

À professora Luci Maria Sant'Ana Dusse pela amizade, confiança e incentivo desde a graduação e pela orientação e dedicação neste trabalho.

Ao Olindo de Assis Martins Filho, pelos ensinamentos sobre citometria de fluxo e pela enorme contribuição neste trabalho.

À Vanessa Peruhype Magalhães, pela amizade, ensinamentos e pelas longas horas de trabalho e dedicação em várias etapas deste estudo.

Aos professores do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, em especial professora Maria das Graças Carvalho e professor Lauro Mello Vieira, por estarem sempre dispostos a me ajudar, principalmente durante o pós-doutorado da professora Luci.

À farmacêutica Geralda de Fátima, pelo auxílio em diversas etapas deste trabalho. Ao Jarbas, pelas longas e divertidas conversas.

Aos funcionários do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia, pela realização dos hemogramas.

Aos alunos e ex-alunos da Faculdade de Farmácia, Ana Paula, Monalisa, Felipe, Januária, Josi, Carol, Sabrina e Caleb pela amizade e convívio.

Aos alunos e funcionários do Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração do Centro de Pesquisas René Rachou / Fiocruz pelo convívio e auxílio neste trabalho.

Aos médicos Geraldo Majella Medeiros de Paula e Fernando Lucas Júnior, pela seleção dos pacientes com nefropatia crônica do enxerto e colaboração.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz, que cedeu os materiais e equipamentos necessários para a realização deste trabalho.

Ao CNPq/CAPES, pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, Manuel e Ângela, pelo amor incondicional e pela confiança que sempre depositaram em mim. Ao meu irmão Dudu, pela amizade.

Ao meu namorado Fernando, por estar sempre ao meu lado, pelo incentivo, amor e confiança.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

O óxido nítrico (NO) constitui uma das mais importantes moléculas biossintetizadas e participa como mediador em diversos processos biológicos. A determinação laboratorial do NO representa um desafio devido, principalmente, à sua ínfima meia-vida e concentração em amostras biológicas. Recentemente, a citometria de fluxo foi proposta como método para determinação de NO intracelular, utilizando-se o diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2DA). Evidências crescentes sugerem um papel do NO resultante da NO-sintase induzível (iNOS) como mediador do processo de rejeição a enxertos. O transplante renal é o tratamento de escolha para pacientes que se encontram no estágio final da doença renal e a nefropatia crônica do enxerto (NCE) constitui a causa mais importante de perda do rim transplantado. Neste estudo, foi otimizado o protocolo para determinação de NO intracelular em monócitos e neutrófilos circulantes por citometria de fluxo e foi determinado o perfil de produção desse composto em pacientes transplantados renais com NCE (n=11) e indivíduos saudáveis (n=10). Não foi observada diferença na produção de NO, comparando-se os dois grupos. A produção de NO em monócitos e neutrófilos circulantes em pacientes com NCE provavelmente encontra-se suprimida devido à ação de imunossupressores.

**Palavras-chave:** óxido nítrico, transplante renal, nefropatia crônica do enxerto, citometria de fluxo, DAF-2DA

## ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is one of the most important biosynthesized molecules and participates as a mediator in various biological processes. The laboratorial determination of NO represents a challenge principally because of its unreliable half-life and concentration in biological samples. Recently, flow cytometry was proposed as a method for the determination of intracellular NO with 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2DA). Increasing evidence suggests a role for the NO resulting from inducible NO synthase (iNOS) as a mediator in the graft rejection process. Renal transplant is the treatment of choice for patients that are in the final stage of kidney disease and the chronic nephropathy of the graft is the most important cause of loss of a transplanted kidney. In the present study, the protocol for the determination of intracellular NO in monocytes and circulating neutrophils by flow cytometry was optimized, and the profile for the production of this compound in kidney-transplanted individuals with chronic nephropathy of the graft (n=11) and healthy individuals (n=10) was determined. No difference in the production of NO was observed in the two groups. The production of NO in monocytes and circulating neutrophils in patients with chronic nephropathy of the graft is probably suppressed as a result of the action of immunosuppressors.

**Keywords:** nitric oxide, renal transplant, chronic nephropathy of the graft, flow cytometry, DAF-2DA.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Síntese do óxido nítrico a partir da L-arginina .....	27
<b>Figura 2</b> – Representação esquemática da óxido nítrico sintase (NOS). .....	28
<b>Figura 3</b> – Reação entre o óxido nítrico e o ânion superóxido.....	29
<b>Figura 4</b> – Representação esquemática da inibição da enzima óxido nítrico sintase....	30
<b>Figura 5</b> – Inibidores da fosfodiesterase 5.....	35
<b>Figura 6</b> – Princípio da detecção do óxido nítrico pelo diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2DA).....	43
<b>Figura 7</b> – Dispersão da luz que define as propriedades morfométricas das células ou partículas (granulosidade/complexidade interna e tamanho). SSC = <i>side scatter</i> , FSC = <i>foward scatter</i> .....	45
<b>Figura 8</b> – Desenho esquemático de uma configuração padrão do citômetro de fluxo. O aparelho é constituído por sistemas fluidos, ópticos e eletrônicos que movem células ou partículas através do feixe do laser.....	46
<b>Figura 9</b> – Estratégias utilizadas para a análise do perfil de NO intracelular em monócitos e neutrófilos circulantes. ....	63
<b>Figura 10</b> – Perfis morfométricos e imunofenotípicos de monócitos após cultura <i>in vitro</i> por 120 minutos empregando creme leucocitário ou sangue total isento de plasma. Menor distorção do perfil imunofenotípico característico de monócitos, como células CD14 <sup>High+</sup> foi observada no protocolo empregando sangue total isento de plasma. ....	68
<b>Figura 11</b> – Análise morfométrica e imunofenotípica de monócitos DAF-2T <sup>+</sup> após cultura <i>in vitro</i> de sangue total isento de plasma na presença de diferentes concentrações de DAF-2DA por 120 minutos. Os resultados estão expressos sob a	

forma de percentual médio de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> ± desvio-padrão. Gráficos representativos de distribuição pontual por densidade ilustram os perfis morfométricos e imunofenotípicos de monócitos obtidos em cada protocolo avaliado.....69

**Figura 12** – Percentual de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> após diferentes períodos de cultura *in vitro* empregando amostras de sangue total isento de plasma na presença de 2,0μM de DAF-2DA. Os resultados estão expressos sob a forma de percentual de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> em cada protocolo avaliado. Análises das variações no percentual de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> nos diferentes tempos avaliados ( $\Delta$ =T120/T60; T180/T120 e T240/T180) estão representadas no gráfico.....71

**Figura 13** – Impacto da pré-incubação por 60 minutos de amostras de sangue total isentas de plasma com diferentes indutores da produção de NO seguidas de incubação por 180 minutos na presença de DAF-2DA 2,0μM, no perfil morfométrico e imunofenotípico de monócitos. Os resultados estão expressos sob a forma do impacto dos diferentes indutores da produção de NO no percentual de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> (Indutor/DAF-2DA). Gráficos representativos de distribuição pontual por densidade ilustram os perfis morfométricos e imunofenotípicos de monócitos obtidos em cada protocolo avaliado. PMA = phorbol 12-myristate 13-acetate; IONO = ionomicina; Con-A = concavalina-A; PHA = phytohemaglutinina; LPS = lipopolissacáride de *Escherichia coli*.....72

**Figura 14** – Impacto da pré-incubação por 10 minutos com diferentes inibidores da produção de NO no percentual de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> após incubação de amostras de sangue total isento de plasma por 180 minutos na presença de DAF-2DA 2,0μM. Os

resultados estão expressos sob a forma do impacto dos diferentes inibidores da produção de NO no percentual de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> (Inibidor/DAF-2DA x 100). .....73

**Figura 15** – Perfis morfométricos e imunofenotípicos de neutrófilos após cultura *in vitro* por 180 minutos empregando sangue total isento de plasma, seguido pela imunofenotipagem com anticorpos monoclonais anti-CD14 TC ou anti-CD16 TC. A melhor segregação da população de neutrófilos em relação à população de eosinófilos foi observada no protocolo empregando imunomarcagem com anticorpo monoclonal anti-CD16 TC. ....75

**Figura 16** - Perfis morfométricos e imunofenotípicos de monócitos e neutrófilos após cultura *in vitro* empregando amostras de sangue total isento de plasma, na ausência de DAF-2DA; na presença de DAF-2DA; na presença de AG e DAF-2DA e na presença de LPS e DAF-2DA. ....77

**Figura 17** – Produção intracelular de óxido nítrico por monócitos circulantes em pacientes com nefropatia crônica do enxerto e indivíduos controles saudáveis. Os resultados estão expressos como mediana (barras horizontais) e dispersão dos valores individuais (símbolos) dos percentuais de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> observados em culturas realizadas apenas na presença de DAF-2DA (●) bem como em culturas submetidas à estimulação com LPS (▲) e a inibição com AG (■). As diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) estão representadas pelas letras “a” e “c” em relação às culturas realizadas somente na presença de DAF-2DA e às culturas submetidas à inibição com AG, respectivamente. ....79

**Figura 18** – Impacto da estimulação *in vitro* com LPS na produção intracelular de óxido nítrico por monócitos circulantes em pacientes com nefropatia crônica do enxerto e indivíduos controles saudáveis. Os resultados estão expressos como mediana (barras

horizontais) e dispersão dos valores individuais (símbolos) dos percentuais de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> observados em culturas submetidas à estimulação com LPS em relação aos observados em culturas realizadas apenas na presença de DAF-2DA (◆), ou seja, (LPS/DAF-2DA). Diferença estatisticamente significativa (p<0,05) está representada por \* em relação ao grupo de indivíduos controles. ....80

**Figura 19** – Impacto da inibição *in vitro* com AG na produção intracelular de óxido nítrico por monócitos circulantes em pacientes com nefropatia crônica do enxerto e indivíduos controles saudáveis. Os resultados estão expressos como mediana (barras horizontais) e dispersão dos valores individuais (símbolos) dos percentuais de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> observados em culturas realizadas apenas na presença de DAF-2DA em relação aos observados em culturas submetidas à inibição com AG (▼), ou seja, (DAF-2DA/AG). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados. ....81

**Figura 20** – Produção intracelular de óxido nítrico por neutrófilos circulantes em pacientes com nefropatia crônica do enxerto e indivíduos controles saudáveis. Os resultados estão expressos como mediana (barras horizontais) e dispersão dos valores individuais (símbolos) dos percentuais de neutrófilos DAF-2T<sup>+</sup> observados em culturas realizadas apenas na presença de DAF-2DA (○), bem como em culturas submetidas à estimulação com LPS (△) e à inibição com AG (□). As diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) estão representadas pelas letras “a” e “c” em relação às culturas realizadas apenas na presença de DAF-2DA e às culturas submetidas à inibição com AG, respectivamente. ....83

**Figura 21** – Impacto da estimulação *in vitro* com LPS na produção intracelular de óxido nítrico por neutrófilos circulantes em pacientes com nefropatia crônica do enxerto e indivíduos controles saudáveis. Os resultados estão expressos como mediana (barras horizontais) e dispersão dos valores individuais (símbolos) dos percentuais de neutrófilos DAF-2T<sup>+</sup> observados em culturas submetidas à estimulação com LPS em relação aos observados em culturas realizadas apenas na presença de DAF-2DA (◇), ou seja, (LPS/DAF-2DA). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados. ....84

**Figura 22** – Impacto da inibição *in vitro* com AG na produção intracelular de óxido nítrico por neutrófilos circulantes em pacientes com nefropatia crônica do enxerto e indivíduos controles saudáveis. Os resultados estão expressos como média (barras horizontais) e dispersão dos valores individuais (símbolos) dos percentuais de neutrófilos DAF-2T<sup>+</sup> observados em culturas realizadas somente na presença de DAF-2DA em relação aos observados em culturas submetidas à inibição com AG (▽), ou seja, (DAF-2DA/AG). Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) está representada por \* em relação ao grupo de indivíduos controles. ....85

**Figura 23** – Produção intracelular de óxido nítrico por monócitos e neutrófilos circulantes em indivíduos controles saudáveis e pacientes com nefropatia crônica do enxerto. Os resultados estão expressos como medianas (barras horizontais) e valores máximos e mínimos dos percentuais de células DAF-2T<sup>+</sup> observados em culturas realizadas apenas na presença de DAF-2DA. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativa entre as populações celulares avaliadas em cada grupo.87

**Figura 24** – Impacto da estimulação *in vitro* com LPS na produção intracelular de óxido nítrico por monócitos e neutrófilos circulantes em indivíduos controles saudáveis e

pacientes com nefropatia crônica do enxerto. Os resultados estão expressos como medianas (barras horizontais) e valores máximos e mínimos dos percentuais de células DAF-2T<sup>+</sup> observados em culturas submetidas à estimulação com LPS em relação aos observados em culturas realizadas apenas na presença de DAF-2DA, ou seja, impacto do LPS no percentual de células DAF-2T<sup>+</sup> = (LPS/DAF-2DA). Diferença estatisticamente significativa (p<0.05) do maior impacto do LPS no percentual de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> em relação ao percentual de neutrófilos, seletivamente no grupo de indivíduos controles saudáveis, está representada por \* .....88

**Figura 25** – Impacto da inibição *in vitro* com AG na produção intracelular de óxido nítrico por monócitos e neutrófilos circulantes em indivíduos controles saudáveis e pacientes com nefropatia crônica do enxerto. Os resultados estão expressos como medianas (barras horizontais) e valores máximos e mínimos dos percentuais de células DAF-2T<sup>+</sup> observados em culturas realizadas apenas na presença de DAF-2DA em relação aos observados em culturas submetidas à inibição com AG, ou seja, impacto da AG no percentual de células DAF-2T<sup>+</sup> = (DAF-2DA/AG). Diferença estatisticamente significativa (p<0.05) do menor impacto da AG no percentual de neutrófilos DAF-2T<sup>+</sup> em relação ao percentual de monócitos, seletivamente no grupo de pacientes com NCE, está representada por \* .....89

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Principais fármacos utilizados no tratamento da disfunção erétil.....	34
<b>Tabela 2</b> – Sexo, média de idade e tempo pós-transplante dos integrantes dos dois grupos avaliados. ....	56
<b>Tabela 3</b> – Caracterização dos pacientes transplantados renais com nefropatia crônica do enxerto. ....	56
<b>Tabela 4</b> – Síntese dos parâmetros otimizados no procedimento experimental de análise da produção de óxido nítrico intracelular em monócitos e neutrófilos, empregando amostras de sangue total.....	76

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH: hormônio adenocorticotrófico  
AG: aminoguanidina  
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
APC: célula apresentadora de antígeno  
BH<sub>4</sub>: tetrahidrobiopterina  
BSA: albumina sérica bovina  
CaM: calmodulina  
Con-A: concanavalina – A  
CS: controles saudáveis  
DAF-2: 4,5-diaminofluoresceína  
DAF-2 DA: diacetato de 4,5-diaminofluoresceína  
DAF-2T: triazolofluoresceína  
DEPE: Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão  
DMSO: dimetilsulfóxido  
EDRF (*endothelial-derived relaxing factor*): Fator de relaxamento derivado do endotélio  
EPR: ressonância eletrônica paramagnética  
FAD: flavina adenina dinucleotídeo  
FMN: flavina mononucleotídeo  
FSC (*forward scatter*): tamanho  
GC: guanilato ciclase  
GMP: guanosina monofosfato  
GMPc: guanosina monofosfato cíclica  
HO: radical hidroxil  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio  
IL: interleucina  
IFN $\gamma$ : interferon  $\gamma$   
L-AA: N<sup>G</sup>-amino-L-arginina  
L-NA: N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina  
L-NAME: N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina-metil-éster  
L-NIO: N-imino-etil-L-ornitina  
L-NMMA: N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina  
LPS: lipopolissacáride de *Escherichia coli*  
MFF (*MACS FACS FIX*): solução fixadora.  
MHC (*major histocompatibility complex*): complexo de histocompatibilidade principal  
NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato  
NANC: não-adrenérgico não-colinérgico  
NCE: nefropatia crônica do enxerto  
NMDA: N-metil-D-aspartato  
NO: óxido nítrico  
NO<sub>2</sub><sup>-</sup>: nitrito  
NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: nitrato  
NOS: NO-sintase

cNOS: NO-sintase constitutiva  
eNOS: NO-sintase endotelial  
iNOS: NO-sintase induzível  
nNOS: NO-sintase neuronal  
O<sub>2</sub>: oxigênio  
O<sub>2</sub><sup>-</sup>: ânion superóxido  
ONOO<sup>-</sup>: ânion peroxinitrito  
PBS: solução fosfato tamponada  
PDE 5: fosfodiesterase 5  
PHA: fitohemaglutinina  
PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate  
RNA: ácido ribonucléico  
RNAm: RNA mensageiro  
ROS (*reactive oxygen species*): espécies reativas do oxigênio  
SSC (*side scatter*): granulidade  
TNF $\alpha$ : fator de necrose tumoral  $\alpha$   
#: número

## SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1 INTRODUÇÃO .....	21
1.1 ÓXIDO NÍTRICO (NO).....	21
1.2 SÍNTESE E INIBIÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO .....	26
1.3 AÇÕES BIOLÓGICAS DO ÓXIDO NÍTRICO.....	30
1.3.1 Óxido nítrico e função cardiovascular .....	31
1.3.2 Óxido nítrico e função erétil.....	32
1.3.3 Óxido nítrico e neurotransmissão.....	35
1.3.4 Óxido nítrico e inflamação .....	36
1.3.5 Óxido nítrico e transplante renal .....	38
1.4 DETERMINAÇÃO LABORATORIAL DO ÓXIDO NÍTRICO .....	40
1.4.1 Citometria de fluxo .....	44
2 JUSTIFICATIVA .....	49
3 OBJETIVOS .....	52
3.1 OBJETIVO GERAL .....	52
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	52
4 POPULAÇÃO E METODOLOGIA.....	54
4.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	54

4.2 POPULAÇÃO .....	54
4.3 AMOSTRA BIOLÓGICA .....	57
4.4 METODOLOGIA .....	58
4.4.1 Determinação de óxido nítrico intracelular em monócitos e neutrófilos circulantes, por citometria de fluxo – protocolo otimizado .....	58
4.4.2 Aquisição e análise dos dados de avaliação do perfil de óxido nítrico intracelular em monócitos e neutrófilos circulantes, por citometria de fluxo – protocolo otimizado .....	62
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	64
5 RESULTADOS .....	66
5.1 ESTABELECIMENTO DA METODOLOGIA DE CITOMETRIA DE FLUXO PARA ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO INTRACELULAR EM MONÓCITOS E NEUTRÓFILOS, EMPREGANDO AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL.....	66
5.1.1 Escolha do protocolo de pré-tratamento das amostras de sangue total.....	66
5.1.2 Determinação da concentração ideal de DAF-2DA.....	68
5.1.3 Escolha do melhor tempo de incubação com DAF-2DA .....	70
5.1.4 Seleção do melhor indutor da produção de NO intracelular.....	71
5.1.5 Seleção do melhor inibidor da produção de NO intracelular .....	73
5.1.6 Determinação do melhor protocolo de imunofenotipagem para seleção de neutrófilos.....	74
5.1.7 Síntese dos parâmetros otimizados na metodologia para análise da produção de NO intracelular em monócitos e neutrófilos em amostras de sangue total.....	75

5.2 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO INTRACELULAR EM MONÓCITOS E NEUTRÓFILOS CIRCULANTES EM PACIENTES COM NEFROPATIA CRÔNICA DO ENXERTO .....	78
5.2.1 Análise da produção de óxido nítrico intracelular em monócitos circulantes..	78
5.2.2 Análise da produção de óxido nítrico intracelular em neutrófilos circulantes .	82
6 DISCUSSÃO .....	91
7 CONCLUSÕES .....	102
8 PERSPECTIVAS .....	104
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	106
ANEXO A .....	117
ANEXO B .....	118
ANEXO C .....	119
ANEXO D .....	120
ANEXO E .....	124

# 1 INTRODUÇÃO

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 ÓXIDO NÍTRICO (NO)

O óxido nítrico (NO) é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, sintetizado a partir da L-arginina. Esse radical possui sete elétrons do átomo de nitrogênio e oito do oxigênio, sendo um elétron desemparelhado (BECKMAN; KOPPENOL, 1996). O NO constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas e está presente em quase todos os sistemas do organismo (MORRIS; BILLIAR, 1994).

Até meados da década de 1980, o NO era considerado apenas um membro de uma família de poluentes ambientais indesejáveis e carcinógenos potenciais encontrado na neblina, na fumaça dos cigarros e na descarga dos automóveis (JAMES, 1995). O interesse pelas funções biológicas do NO foi conseqüente do desfecho, praticamente simultâneo, de três linhas de pesquisa absolutamente independentes, que culminaram com um ponto em comum, o envolvimento dessa molécula em processos biológicos.

A primeira linha de pesquisa constava da investigação do papel do endotélio vascular no processo de relaxamento do vaso sanguíneo. O interesse por essa questão aconteceu após as conclusões de Furchgott e Zawadzki (1980), de que a ação de alguns vasodilatadores, como a acetilcolina, dependia da integridade do endotélio e envolvia a liberação de um fator essencial para o relaxamento vascular, que foi chamado de EDRF (*Endothelial-Derived Relaxing Factor*). Rapoport e Murad (1983) propuseram que o mecanismo pelo qual o EDRF causava o relaxamento vascular era

mediado pela guanosina monofosfato cíclica (GMPc). Aproximadamente sete anos após a descoberta do EDRF, estudos detalhados da sua ação biológica nos vasos (IGNARRO, 1987; MONCADA *et al.*, 1988; PALMER *et al.*, 1987) e nas plaquetas (RADOMSKI *et al.*, 1987) demonstraram que esse composto era idêntico ao NO. Curiosamente, dez anos antes, dois grupos de pesquisadores, Katsuki *et al.* (1977) e Schultz *et al.* (1977), buscavam um respaldo científico a uma conduta terapêutica introduzida, empiricamente, pela medicina chinesa há mais de 100 anos. Tratava-se do uso de nitratos orgânicos e de nitroglicerina como tratamento da angina *pectoris*, insuficiência cardíaca congestiva, hipertensão pulmonar e outras complicações vasculares. Ambos os grupos concluíram que nitratos orgânicos induzem a um aumento dos níveis de GMPc dependente da dose e que esses compostos eram, a princípio inativos, mas seu metabolismo resultava na produção de NO. Posteriormente, esses investigadores concluíram que o NO era a molécula efetora comum a todos os nitrovasodilatadores, que resultava na dilatação das artérias coronarianas, melhorava o suprimento sanguíneo ao coração e, conseqüentemente, aliviava os sintomas. Em 1977, Katsuki *et al.* demonstraram que o mecanismo pelo qual esses compostos causavam vasodilatação envolvia a ativação da enzima guanilato ciclase (GC), mediada por NO, e o conseqüente acúmulo de GMPc. É oportuno comentar que a trinitroglicerina é o composto ativo da dinamite e que, ironicamente, seu inventor, Alfred Nobel, embora relutante, teve que autorizar seu médico a administrar-lhe nitroglicerina quando foi acometido por uma crise de angina (SNYDER; BREDT, 1992). As conclusões de Katsuki *et al.* (1977) e de Rapoport e Murad (1983) estabeleceram, definitivamente, a importância do NO, exógeno ou endógeno, no processo de relaxamento vascular.

A segunda linha de pesquisa tratava da questão da produção de óxidos de nitrogênio pelos mamíferos. No início do século, Mitchell *et al.* (1916, citados por Schmidt e Walter, 1994), sugeriram que os mamíferos produziam óxidos de nitrogênio, ao demonstrarem que a quantidade eliminada desses compostos excedia a quantidade ingerida. Essa observação, entretanto, foi ignorada até o final da década de 1970. Durante todo esse período, acreditou-se que óxidos de nitrogênio inorgânicos eram produzidos somente por bactérias, via reações de nitrificação e denitrificação, e que em mamíferos esses compostos derivavam da dieta (SZABÓ, 1995). A constatação de que os organismos humano e animal eram capazes de converter nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) da dieta em nitrosaminas carcinogênicas, após a reação entre o  $\text{NO}_2^-$  e aminas, foi recebida com grande temor, levando a alterações nos hábitos alimentares, onde bacon e outros alimentos curados foram excluídos (MAGEE; BARNES, 1956, citados por SNYDER; BREDT, 1992). Um maior impacto e receio ocorreu quando Tannenbaum *et al.* (1978, citados por Green *et al.*, 1981) demonstraram, de modo inquestionável, a produção endógena de  $\text{NO}_3^-$  em mamíferos. Esses investigadores mostraram que camundongos e seres humanos alimentados com uma dieta pobre em  $\text{NO}_3^-$  excretavam quantidades substanciais desse composto. Posteriormente, Green *et al.* (1981) comprovaram a produção de  $\text{NO}_3^-$  em ratos isentos de germes e Green *et al.* (1981a), em um estudo do balanço metabólico, comprovaram a biossíntese de  $\text{NO}_3^-$  em homens saudáveis.

As observações de Hegesh e Shiloah (1982) de que altas concentrações de nitrato eram um achado constante em crianças com diarreia aguda de etiologias diversas sugeriram, pela primeira vez, uma associação entre a produção de  $\text{NO}_3^-$  e o sistema

imunológico. Snyder e Brecht (1992) citaram que a relação entre o sistema imune e  $\text{NO}_3^-$  foi reforçada pelas observações de que animais portadores de uma deficiência de macrófagos apresentavam baixa excreção de  $\text{NO}_3^-$ . Esses dados, aliados à demonstração da produção de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_2^-$  por macrófagos de rato *in vitro*, em resposta ao lipopolissacáride de *Escherichia coli* feita por Stuehr e Marletta (1985), estabeleceram, de forma definitiva, uma associação entre a presença de macrófagos, a resposta imune e a síntese de  $\text{NO}_3^-$ . Os trabalhos subseqüentes, desenvolvidos de modo independente por Iyengar *et al.* (1987) e Hibbs *et al.* (1987), esclareceram a origem do  $\text{NO}_3^-$ , estabelecendo a L-arginina como o aminoácido essencial para a sua produção. Hibbs *et al.* (1987), estudando os mecanismos envolvidos nas reações citotóxicas mediadas por macrófagos, verificaram que as atividades tumoricida e bactericida dos macrófagos eram dependentes de L-arginina e inibidas por um análogo desta, a  $\text{N}^G$ -monometil-L-arginina (L-NMMA). Esses investigadores demonstraram, também, que  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_2^-$  não eram os responsáveis pela citotoxicidade dos macrófagos e sugeriram a existência de um precursor desses compostos na cultura. Palmer *et al.* (1988) demonstraram que a L-arginina era o precursor fisiológico do NO nas células endoteliais. Com base nessa informação, vários grupos de investigadores suspeitaram que o NO fosse o provável precursor da síntese de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_2^-$  em macrófagos. Subseqüentemente, Marletta *et al.* (1988), Hibbs *et al.* (1988) e Stuehr e Nathan (1989) comprovaram essa hipótese e demonstraram que o NO é o principal mediador citotóxico de células imunes efectoras ativadas e constitui uma importante molécula reguladora do sistema imune.

A última linha de pesquisa referida estava associada à investigação do mecanismo de ação de neurotransmissores. Ferrendelli *et al.* (1974) demonstraram que o glutamato, um conhecido neurotransmissor, provocava um aumento de GMPc no sistema nervoso central. Miki *et al.* (1977), demonstraram a ativação da GC cerebral pelo NO. Nesse mesmo ano, Deguchi (1977), constatou a presença de um fator endógeno, de baixo peso molecular, capaz de ativar a GC em tecidos nervosos intactos de ratos. Achados similares foram relatados por Yoshikawa e Kuriyama (1980). Deguchi e Yoshioka (1982) identificaram o ativador endógeno da GC em células de neuroblastoma. Naturalmente, nessa época não havia, ainda, qualquer conhecimento sobre o NO como uma molécula mensageira e tampouco da sua formação a partir da L-arginina. O estabelecimento da via L-arginina - NO (PALMER *et al.*, 1988) e do paralelismo entre síntese de NO e acúmulo de GMPc (RAPOPORT; MURAD, 1983) nas células endoteliais levou vários grupos a pesquisar a existência dessa via no sistema nervoso central. Garthwaite *et al.* (1988), Knowles *et al.* (1989) e Bredt e Snyder (1989) confirmaram a produção de NO no sistema nervoso. Nesse mesmo ano, Garthwaite *et al.* (1989), mostraram que o glutamato é o mediador da liberação de NO por receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) estimulados. Bredt e Snyder (1990) isolaram do cerebelo de rato e purificaram, pela primeira vez, uma isoforma da enzima responsável pela formação de NO, a NO-sintase (NOS).

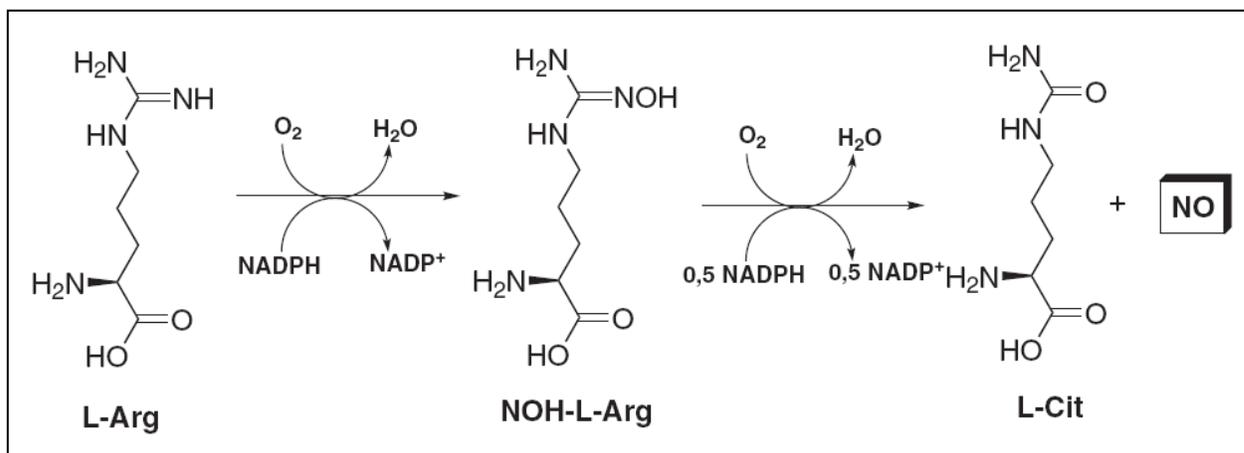
O desfecho comum dessas três linhas de pesquisa fez com que o NO passasse da condição de molécula sem importância biológica e pouco estudada para um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares. Nos últimos 25 anos, o NO tem sido alvo de uma infinidade de estudos e está constantemente surpreendendo a

comunidade científica, devido à quantidade de processos biológicos em que está envolvido.

## 1.2 SÍNTESE E INIBIÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO

A síntese do NO resulta da oxidação enzimática de um nitrogênio guanidino do aminoácido L-arginina para produzir L-citrulina. A reação de síntese do NO é catalisada pela enzima NO-sintase (NOS) (MONCADA *et al.*, 1991).

A enzima NOS catalisa a síntese do NO em dois ciclos distintos, produzindo a N-hidroxi-L-arginina como produto intermediário. Os dois ciclos consomem uma molécula de oxigênio ( $O_2$ ) e necessitam da participação de elétrons exógenos que são fornecidos pela nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) como mostrado na Figura 1. A atividade da NOS também é influenciada pelos co-fatores flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e a tetrahydrobiopterina ( $BH_4$ ) (GORREN; MAYER, 2007).

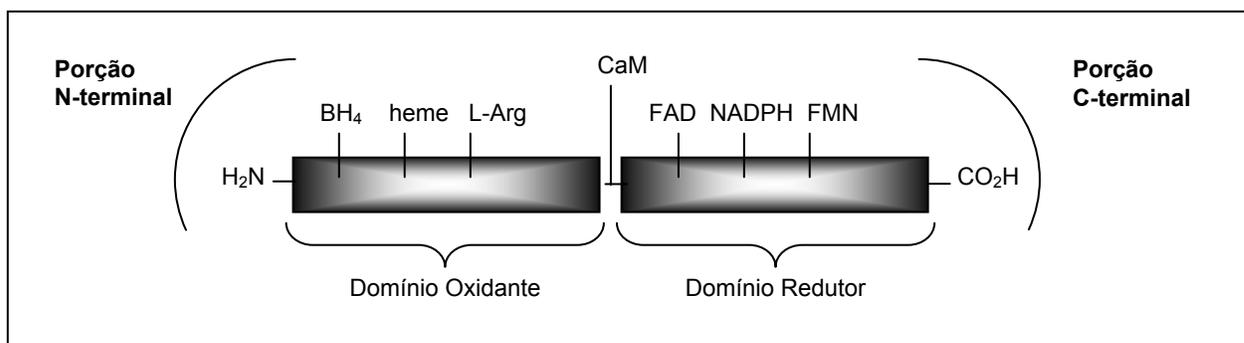


**Figura 1** – Síntese do óxido nítrico a partir da L-arginina

São descritas na literatura três isoformas da NOS cujos nomes se referem ao tecido no qual a isoforma foi primeiramente identificada. Duas das isoformas são dependentes de cálcio/calmodulina e denominadas isoformas constitutivas: isoforma neuronal (nNOS ou NOS I) e isoforma endotelial (eNOS ou NOS III). A outra isoforma é independente de cálcio e denominada induzível (iNOS ou NOS II). As isoformas constitutivas (cNOS) são expressas constitutivamente nas células enquanto a iNOS se expressa em macrófagos e outras células após um estímulo imunológico ou exposição a citocinas inflamatórias (MONCADA; HIGGS, 2006). Uma vez sintetizada, a iNOS é capaz de produzir grandes quantidades de NO até que a L-arginina ou os co-fatores necessários para sua síntese sejam depletados ou ocorra morte celular. A cNOS é capaz de produzir pequenas quantidades de NO durante poucos minutos (XIE; NATHAN, 1994).

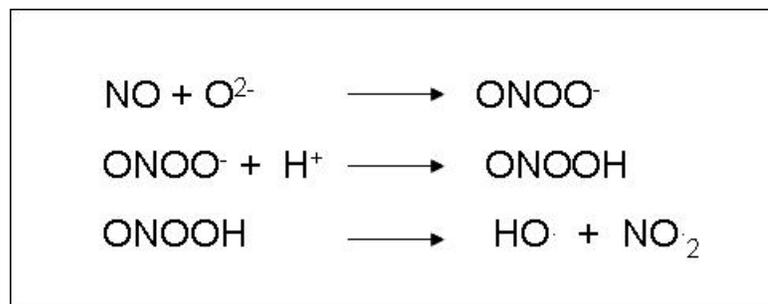
As três isoformas apresentam grande homologia estrutural que inclui dois domínios: um redutor, na porção C-terminal, onde estão localizados os sítios de ligação para o NADPH e para os co-fatores FAD e FMN; e outro oxidante, na porção N-terminal, onde

estão localizados os sítios para o grupo heme,  $BH_4$  e o substrato L-arginina. Entre os dois domínios está localizado o sítio de ligação do cálcio à calmodulina (CaM) (BARRETO *et al.*, 2005). Na Figura 2 está representada de forma esquemática a enzima NOS.



**Figura 2** – Representação esquemática da óxido nítrico sintase (NOS).

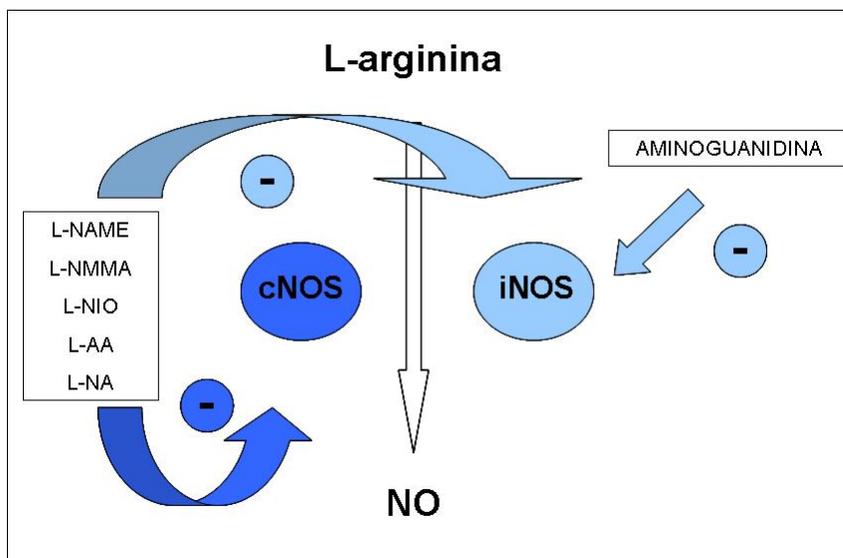
O NO, resultante da iNOS é potencialmente tóxico, especialmente em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante. O mecanismo de ação citotóxica do NO ocorre pela formação de peroxinitrito, um potente agente oxidante. O NO reage com ânion superóxido ( $O_2^-$ ), resultando na formação do ânion peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). O peroxinitrito pode protonar-se na presença de íons  $H^+$ , formando  $ONOOH$ , que sofre degradação e resulta no radical  $NO_2$  e radical hidroxil ( $HO\cdot$ ). O hidroxil é um radical altamente tóxico e reage indiscriminadamente com qualquer componente celular. A reação entre o NO e o  $O_2^-$  está representada na Figura 3 (DINU; GILCA, 1994; BECKMAN; KOPPENOL, 1996).



**Figura 3** – Reação entre o óxido nítrico e o ânion superóxido.

A cNOS foi inicialmente identificada no endotélio vascular e recebeu a denominação de isoforma endotelial. Atualmente, sabe-se que a eNOS também está presente nas plaquetas e em algumas populações de neurônios. A nNOS, inicialmente identificada no cérebro, coluna espinhal e sistema nervoso periférico, também está presente no epitélio da traquéia e brônquios (MONCADA *et al.*, 1997).

A síntese do NO pode ser inibida por análogos da L-arginina como a N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina (L-NMMA), N-imino-etil-L-ornitina (L-NIO), N<sup>G</sup>-amino-L-arginina (L-AA), N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (L-NA) e o metil éster correspondente, o N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME). Esses inibidores atuam de forma competitiva sobre as três isoformas da NOS. Além desses inibidores, a aminoguanidina (AG) também é capaz de inibir a NOS apresentando relativa seletividade para a iNOS (UCHIDA *et al.*, 2007). A ação dos inibidores da NOS está representada na Figura 4.



**Figura 4** – Representação esquemática da inibição da enzima óxido nítrico sintase.

Embora a NOS seja a principal enzima associada à produção de NO, em algumas situações especiais, esta molécula pode ser produzida por outros mecanismos independentes da NOS. O NO pode ser produzido pela via da xantina oxidase, pelo peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e L-arginina por uma reação não enzimática ou pela redução de nitritos em ácidos (GUIX *et al.*, 2005).

### 1.3 AÇÕES BIOLÓGICAS DO ÓXIDO NÍTRICO

O NO está envolvido em diversos processos fisiológicos e patológicos. Sua importância biológica é representada pela capacidade de atuar como um importante segundo-mensageiro, ativando ou inibindo moléculas-alvo envolvidas em diferentes processos como regulação do tônus vascular, controle imunológico e neurotransmissão (RÄTHEL *et al.*, 2003; BARRETO *et al.*, 2005). Ao contrário de outros mensageiros químicos, o

NO independe de sua topologia estrutural para se ligar a receptores ou enzimas, mas depende de sua ação redox. O NO não é armazenado *in vivo*, mas sim sintetizado quando necessário. Como outras moléculas mensageiras, uma alteração nos níveis do NO endógeno, pode ter conseqüências distintas. Em alguns casos, a deficiência na produção de NO pode resultar em hipertensão, angina e impotência, em outros, sua superprodução pode ocasionar respostas inflamatórias graves, sepse, choque circulatório ou até mesmo infarto (BARRETO *et al.*, 2005).

### 1.3.1 Óxido nítrico e função cardiovascular

Atualmente está bem estabelecida a ação vasoprotetora do NO. Essa molécula antagoniza as contrações da musculatura lisa vascular e inibe a ativação plaquetária, contribuindo para a manutenção do tônus vascular e prevenindo a formação de placas ateroscleróticas (FILHO; ZILBERSTEIN, 2000). O NO também participa do controle da contração e do ritmo cardíaco e é produzido por vários tipos celulares incluindo os cardiomiócitos (RASTALDO *et al.*, 2007).

Embora a ação vascular do NO mais estudada seja a vasodilatação, sabe-se que essa molécula possui uma ação bimodal sobre o tônus vascular. Graser e Vanhoutte (1991) e Pearson e Vanhoutte (1993) mostraram que pequenas concentrações de NO eram capazes de induzir vasoconstrição. Enquanto a vasodilatação induzida pelo NO é conseqüente à redução da concentração intracelular de cálcio, a vasoconstrição parece ser induzida pelo aumento dessa concentração (RASTALDO *et al.*, 2007).

O NO liberado pelo endotélio vascular pode afetar a contração do miocárdio, devido à proximidade entre os capilares coronarianos e os cardiomiócitos. Os cardiomiócitos também produzem NO e esse atua sobre o miocárdio. O NO possui efeito inotrópico positivo ou negativo dependendo da concentração e da isoforma da NOS e está demonstrado que o coração dos mamíferos expressa as três isoformas da NOS (RASTALDO *et al.*, 2007).

A eNOS é encontrada nos miócitos, células endoteliais e músculo liso vascular, e a nNOS é encontrada nos neurônios. O NO em altas concentrações atua como inotrópico negativo levando ao aumento da dilatação diastólica, sem influenciar os índices de contractilidade miocárdica. Já a redução, mas não a supressão, da liberação endógena de NO provocada pelos inibidores da NOS promove o efeito inotrópico positivo, ou seja, aumenta a contração do miocárdio. Estas mesmas células, quando ativadas, expressam também a iNOS, como ocorre na miocardite, rejeição a transplante e na sepse. Níveis elevados de NO atuam como uma toxina, levando à disfunção cardíaca característica da síndrome de resposta inflamatória sistêmica (FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

### **1.3.2 Óxido nítrico e função erétil**

A disfunção erétil ou impotência sexual masculina, depois da ejaculação precoce, é o comprometimento mais comum da função sexual masculina.

Atualmente, sabe-se que a maioria dos casos de disfunção erétil é provocada por problemas vasculares. O conhecimento das bases fisiológicas e bioquímicas da função erétil nos últimos anos possibilitou a evolução das opções de tratamento da disfunção erétil (NEVES *et al.*, 2004).

Estudos sobre a fisiologia da ereção estabeleceram o papel do NO como o principal modulador bioquímico desta função. A ereção ocorre quando um estímulo erótico processado no hipotálamo resulta na inibição do tônus simpático, no aumento da neurotransmissão parassimpática e na liberação de NO. Dessa forma, O NO é capaz de ativar a enzima guanilato ciclase, responsável pela síntese de guanosina monofosfato cíclica (GMPc). O aumento de GMPc na camada muscular dos vasos sanguíneos do corpo cavernoso resulta, em última instância, na diminuição do influxo de cálcio e no relaxamento da parede vascular. Este efeito permite a entrada de sangue nos sinusóides cavernosos, produzindo a ereção. Após a ereção, para retornar ao estado flácido, a GMPc formada é hidrolisada a guanosina monofosfato (GMP) pela enzima fosfodiesterase tipo 5 (PDE 5). Nesta etapa atuam os inibidores de PDE 5 que bloqueiam a hidrólise da GMPc. Dessa forma, a concentração intracelular de GMPc permanece elevada por mais tempo e conseqüentemente os níveis de cálcio são reduzidos, o que resulta no relaxamento da parede vascular e em uma ereção mais duradoura (NEVES *et al.*, 2004; BURNETT, A. L., 2007).

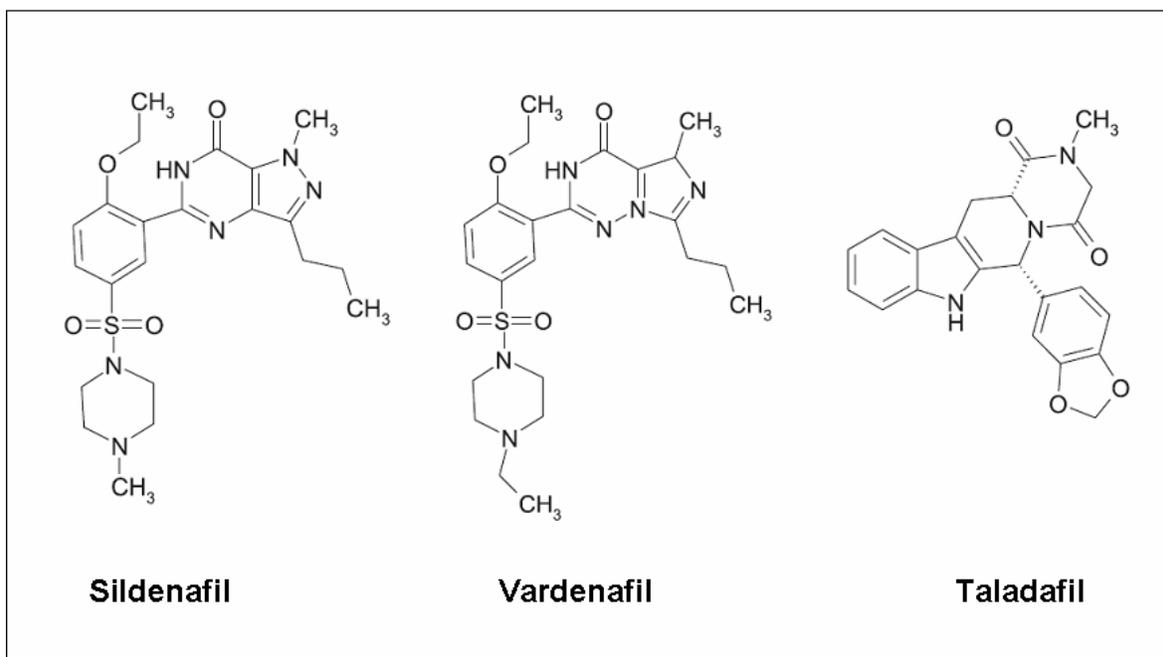
Atualmente, esta ação do NO é bem explorada e no mercado são encontradas formas farmacêuticas de aplicação local e de administração oral para o tratamento da disfunção erétil. Os principais fármacos utilizados, segundo a Agência Nacional de

Vigilância Sanitária (ANVISA), estão apresentados na Tabela 1. A administração oral é fácil, não-invasiva, reversível e bem tolerada tanto pelo paciente quanto por sua parceira. Assim, os fármacos de administração oral tornaram-se a terapia de primeira escolha para os mais diversos casos de disfunção erétil (NEVES *et al.*, 2004).

**Tabela 1** – Principais fármacos utilizados no tratamento da disfunção erétil

<b><i>Classe farmacológica</i></b>	<b><i>Princípio ativo</i></b>
<b>Bloqueadores <math>\alpha</math>-adrenérgicos</b>	Fentolamina e Ioimbina
<b>Prostaglandinas</b>	Alprostadil
<b>Relaxantes da musculatura lisa</b>	Papaverina
<b>Agentes dopaminérgicos</b>	Apomorfina
<b>Doadores de óxido nítrico</b>	L-arginina
<b>Inibidores da fosfodiesterase-5</b>	Sildenafil, Vardenafil e Taladafil

Os principais inibidores da fosfodiesterase 5 (PDE 5) utilizados no tratamento da disfunção erétil estão representados na Figura 5.



**Figura 5** – Inibidores da fosfodiesterase 5.

### 1.3.3 Óxido nítrico e neurotransmissão

As primeiras evidências do papel do NO como neurotransmissor ocorreram a partir dos trabalhos de Garthwaite *et al.* (1988) que demonstraram que a estimulação dos receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) pelo neurotransmissor glutamato promove a liberação de uma molécula bastante similar ao EDRF. A partir da constatação de que o EDRF era idêntico ao NO, esse passou a ser reconhecido como um neurotransmissor que atua tanto no sistema nervoso central quanto no sistema nervoso periférico por meio de mecanismos dependentes da GMPc (CALABRESE *et al.*, 2007).

No sistema nervoso central, a produção de NO está associada à função cognitiva, desde a indução e manutenção da plasticidade sináptica até o controle do sono, apetite,

temperatura corpórea e neurosecreção. No sistema nervoso periférico o NO regula o mecanismo não-adrenérgico não-colinérgico (NANC) de relaxamento das células musculares lisas (GUIX *et al.* 2005).

Apesar das funções essenciais desempenhadas pelo NO, quando essa molécula é produzida em grande quantidade, ela passa da condição de um neuromodulador fisiológico importante para um fator neurotóxico. A produção exacerbada de NO pode ocorrer pela estimulação persistente da nNOS ou pela expressão da iNOS por diversos estímulos como endotoxinas ou citocinas. O NO mostra-se especialmente nocivo em condições patológicas ao reagir com o ânion superóxido e gerar peroxinitrito. Nas doenças neurodegenerativas ocorre uma morte lenta e gradual de populações específicas de neurônios que pode ocorrer de maneira esporádica ou determinada por mutação genética hereditária. A doença de Parkinson, doença de Huntington, mal de Alzheimer e esclerose múltipla são exemplos de processos neurodegenerativos onde a participação do NO é sugerida, uma vez que todos eles estão associados ao estresse oxidativo (GUIX *et al.* 2005; CALABRESE *et al.*, 2007).

#### **1.3.4 Óxido nítrico e inflamação**

Inflamação é a resposta do organismo a danos relacionados a estímulos físicos e químicos nocivos ou por toxinas microbiológicas. Este processo está envolvido em diversas patologias como artrite, asma, esclerose múltipla e doenças inflamatórias intestinais. O NO possui um papel regulador em diversos estágios do processo

inflamatório, como a regulação das propriedades pró-inflamatórias do endotélio e da migração de células para o sítio inflamatório (GUZIK *et al.*, 2003).

Durante a resposta inflamatória, ocorre uma grande formação de NO via iNOS, ultrapassando as quantidades fisiológicas. O NO produzido por macrófagos ativados imunológica ou quimicamente possui ação citotóxica e citostática, promovendo a destruição de microrganismos invasores e de células tumorais, bem como a nitrosilação de macromoléculas (GUZIK *et al.*, 2003). No entanto, a produção excessiva desta molécula pode causar vasodilatação local, inibir a mitogênese e acidentalmente lesar os tecidos vizinhos ou mesmo a célula que o produziu. A base bioquímica da ação citotóxica e citostática do NO são as enzimas contendo ferro envolvidas na respiração mitocondrial e na síntese do DNA.

Durante o processo inflamatório, grandes quantidades de NO são geradas juntamente com grandes quantidades de ânion superóxido. Como mostrado na Figura 3, o NO pode reagir com o ânion superóxido e formar o peroxinitrito. O peroxinitrito é um poderoso agente oxidante e o mediador dos efeitos citotóxicos do NO como o dano ao DNA, oxidação do LDL colesterol, inibição da enzima aconitase e da respiração celular (GUZIK *et al.*, 2003; SZABÓ *et al.*, 2007). O peroxinitrito está envolvido no desenvolvimento de situações clínicas como a hipercolesterolemia, diabetes e doença arterial coronariana. Existem evidências de que ocorre um aumento da formação de espécies reativas do oxigênio nos vasos sangüíneos em algumas patologias e que o tratamento com anti-oxidantes resulta em melhora da circulação nas coronárias em pacientes com doença arterial coronariana e diabetes (MONCADA; HIGGS, 2006).

As propriedades tóxicas do NO são a chave para a patogênese do choque séptico. A intensa produção de NO durante a septicemia parece ser a responsável pela hipotensão arterial irreversível, perda da resposta à noradrenalina, acidose, necrose e apoptose (PARRATT, 1997). Entretanto, é importante lembrar a importância do NO produzido pela iNOS na defesa do hospedeiro através da destruição de microrganismos (GUZIK *et al.*, 2003).

O NO também está envolvido na regulação da liberação de hormônios envolvidos no controle do processo inflamatório. O NO desempenha um importante papel inibitório da produção de hormônio adenocorticotrófico (ACTH) e conseqüentemente inibe a secreção de hormônios anti-inflamatórios como o cortisol (GUZIK *et al.*, 2003).

### **1.3.5 Óxido nítrico e transplante renal**

O transplante renal é o tratamento de escolha para um número significativo de pacientes que se encontram no estágio final da doença renal (MANZANO *et al.*, 2005). No entanto, a perda do rim transplantado por processo de rejeição, ainda constitui um desafio (AQUINO-DIAS *et al.*, 2008). Tanto a resposta imune mediada por células, representada morfológicamente por infiltração celular (rejeição celular), como a humoral, que se manifesta por lesão vascular (rejeição vascular), estão envolvidas no processo (BRENNER; RECTOR, 1991).

No rim normal, a iNOS está presente em células do segmento tubular distal. Essa isoforma da enzima NOS, quando estimulada por citocinas em um processo inflamatório, é capaz de produzir NO enquanto houver L-arginina disponível (MORRISSEY *et al.*, 1994). O NO resultante da i-NOS é também produzido por células mononucleares ativadas que infiltram o glomérulo e o espaço intersticial na inflamação (KASHEM *et al.*, 1996).

A nefropatia crônica do enxerto (NCE) decorre da contínua agressão imunológica e não imunológica ao rim transplantado e constitui a causa mais importante de perda do rim transplantado. Caracteriza-se pela deterioração progressiva, irreversível, funcional e morfológica do enxerto renal, que ocorre meses ou anos após o transplante. Essa perda lenta e variável da função renal está associada, freqüentemente, a proteinúria e hipertensão (PAUL, 1999; KRIEGER *et al.* 2003). O exame histológico mostra que todos os componentes do parênquima renal estão envolvidos, com fibrose intersticial proeminente, hipertrofia dos glomérulos, expansão da matriz, aterosclerose do rim em consequência a uma obliteração gradual da luz dos vasos sanguíneos. A obstrução da luz dos vasos ocorre principalmente por hiperplasia da camada íntima, consequente à contínua estimulação e lesão do endotélio vascular, infiltração inflamatória moderada de macrófagos e linfócitos na parede vascular, deposição de imunoglobulina, complemento e fibrina na parede dos vasos (PAUL, 1999; RACUSEN *et al.*, 1999, KRIEGER *et al.* 2003).

Um aumento da expressão da iNOS em pacientes transplantados renais com rejeição aguda, comparados com transplantados renais com função normal do enxerto ou com

disfunções que não fossem rejeição, foi detectado por Albrecht *et al.* (2000). Em um experimento com ratos, Lu *et al.* (1999) relataram que a ocorrência e a progressão de rejeição aguda ao rim transplantado eram acompanhadas pelo aumento de nitrato (metabólito do NO). Koyama *et al.* (2000) sugeriram que a determinação dos níveis plasmáticos dos metabólitos estáveis do NO ( $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$ ) poderia ser útil para prever o progresso de uma rejeição renal crônica, pois detectaram níveis elevados destes metabólitos de seis a doze meses antes da perda do órgão transplantado. No transplante renal admite-se que exista uma regulação mútua entre as citocinas (IL-2, IL-6 e outras) e o NO (ALBRECHT *et al.*, 2000; KASHEM *et al.*, 1996). Em pacientes transplantados cardíacos, com diagnóstico de rejeição aguda, Benvenuti *et al.* (1996) detectaram um aumento da concentração de nitrato plasmático.

Embora a imunossupressão constitua um procedimento obrigatório após transplantes de órgãos, a sua utilização está associada a uma série de efeitos colaterais indesejáveis. O risco aumentado de ocorrência de infecções e de desenvolvimento de linfomas e outros tipos de cânceres constituem as principais limitações do uso da terapia imunossupressora (KRENSKY, 2001; FISHER *et al.*, 2002).

#### **1.4 DETERMINAÇÃO LABORATORIAL DO ÓXIDO NÍTRICO**

A determinação de NO em amostras biológicas constitui um desafio devido principalmente à ínfima meia-vida desse composto, cerca de quatro a seis segundos no plasma e dez a sessenta segundos nos tecidos (KIECHLE, MALINSKI, 1993). Diversos

métodos utilizando as mais avançadas tecnologias têm sido propostos na literatura para determinação de NO, tanto direta quanto indiretamente, por meio de ensaios que reflitam a sua presença. A determinação direta pode ser feita por ressonância eletrônica paramagnética (EPR), quimioluminescência e detecção eletroquímica através de sensores (ARCHER, 1993),

A medida indireta de NO é freqüentemente feita pela reação de Griess, onde seus metabólitos estáveis, nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) são avaliados. Esta metodologia pressupõe a redução prévia do nitrato a nitrito, utilizando-se a enzima nitrato redutase ou cádmio, e a posterior determinação do nitrito pela reação de Griess (TSIKAS, 2007). Nitrato e nitrito oriundos da dieta podem estar presentes no plasma e alterar a determinação plasmática de NO por essa metodologia. Desta forma, as amostras sangüíneas devem ser coletadas após jejum de 12 horas precedido de, no mínimo, dois dias de dieta restrita de alimentos ricos em nitrato e nitrito, como cenoura, beterraba, couve, acelga, alface, espinafre, taioba, rabanete, melancia, morango, queijos, alimentos defumados (ex. lingüiça, bacon) ou embutidos (ex. salsicha, mortadela, presunto), carnes com conservantes (ex. enlatadas), bebidas alcoólicas, água mineral, aveia e milho.

Outras metodologias para determinação indireta do NO incluem a determinação da metemoglobina (resultante da oxidação da hemoglobina pelo NO), detecção de nitrosil hemoglobina ou NO-hemoglobina (produzida pela reação do NO com a hemoglobina das hemácias desoxigenadas), determinação de L-citrulina plasmática (co-produto da reação de produção de NO), quantificação da NOS, determinação da atividade da NOS,

avaliação de suas ações fisiológicas (relaxamento vascular e a inibição da agregação plaquetária), determinação da GMPc (mensageira secundária do NO), uso de inibidores da NOS e detecção de resíduos de 3-nitrotirosina (KIECHLE; MALINSKI, 1993; ARCHER, 1993).

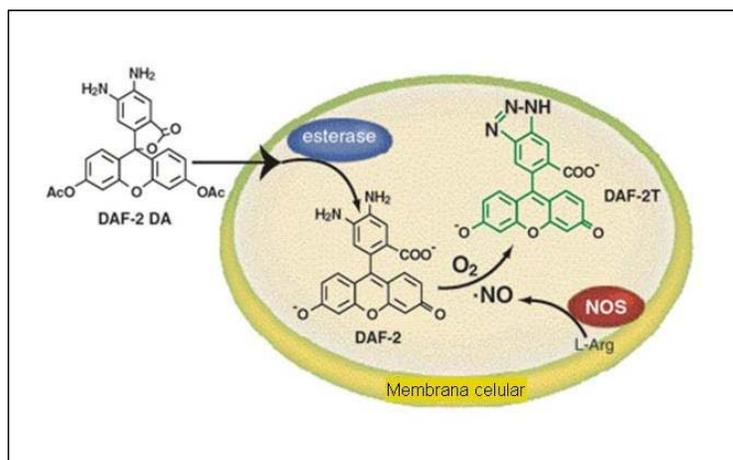
Em seres humanos, a determinação do NO é ainda mais complexa, considerando-se a dificuldade de obtenção de amostra biológica devido a questões éticas. As determinações sistêmicas, especialmente de  $\text{NO}_3^-$  e GMPc, têm sido utilizadas como métodos indiretos para avaliação do NO. No entanto, há evidências na literatura de um aumento localizado da produção desse composto, o que não seria evidenciado pela avaliação sistêmica do mesmo (SLADEK *et al.*, 1997).

Fragmentos de artérias de tecido subcutâneo, anéis de artéria umbilical, fragmentos placentários, leucócitos e plaquetas circulantes têm sido utilizados para a determinação de NO, por meio de diferentes metodologias. Entretanto, é imprescindível a observação rigorosa de uma série de cuidados necessários para preservar a célula endotelial (fonte de NOS) e evitar a inativação dessa enzima pelas proteases tissulares.

Recentemente, foi proposta a determinação de NO intracelular por citometria de fluxo, utilizando-se o diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2DA) (STRIJDOM *et al.*, 2004). Essa metodologia baseia-se na capacidade do NO de oxidar o reagente 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2), que não é fluorescente para uma forma fluorescente. A medida da fluorescência é feita pela leitura da amostra no citômetro de fluxo e é

proporcional à concentração de NO nas células (HAVENGA *et al.*, 2001; STRIJDOM *et al.*, 2004).

O diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2DA), desenvolvido por Kojima *et al.* (1998), é um reagente permeável à membrana celular que permite a determinação do NO intracelular por citometria de fluxo. O DAF-2DA é convertido a 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2) por meio da ação de esterases intracelulares. O DAF-2 não é permeável à membrana celular permanecendo, portanto, no interior das células, como mostrado na Figura 6. Em pH fisiológico, o DAF-2 é relativamente não fluorescente. No entanto, na presença de NO e oxigênio, um produto fluorescente é formado, o triazolofluoresceína (DAF-2T). Assim, a intensidade da fluorescência é proporcional à concentração de NO intracelular.



**Figura 6** – Princípio da detecção do óxido nítrico pelo diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2DA).

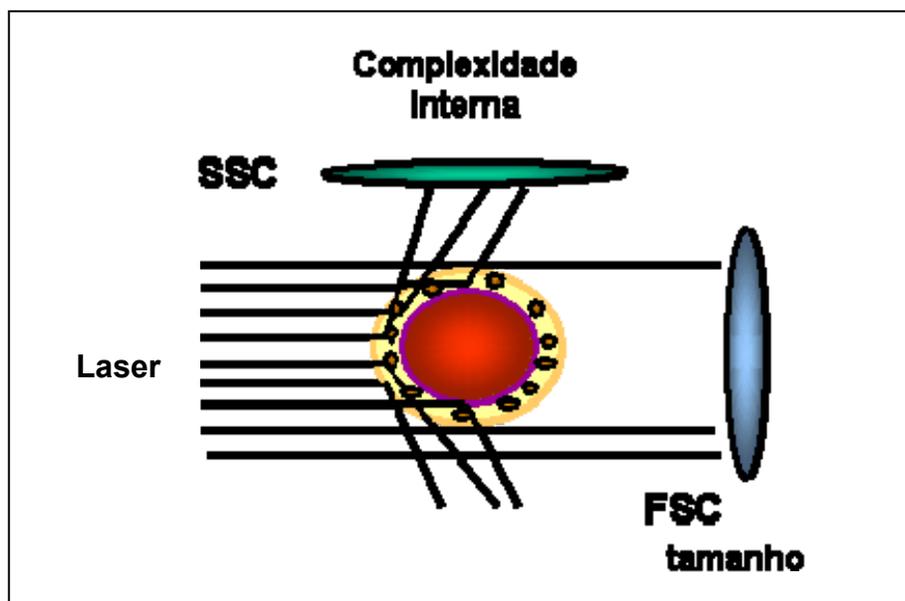
### 1.4.1 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma ferramenta que proporciona de maneira rápida e objetiva a determinação das características físicas, biológicas e químicas das células. Essa metodologia é permite a análise de um grande número de células em um curto período de tempo (HU *et al.*, 2000). De modo geral, todo material biológico que contém células ou partículas em suspensão pode ser avaliado por citometria de fluxo.

Os citômetros de fluxo foram introduzidos comercialmente no final dos anos 70. Para o desenvolvimento da citometria de fluxo, alguns marcos no desenvolvimento científico foram importantes. Em 1930, Caspersson e Thorell iniciaram os trabalhos com automação em citologia e, em 1934, Moldaven propôs a contagem fotoelétrica de células em tubo capilar. Em 1940, Coons conseguiu ligar anticorpos com partículas fluorescentes para marcação de proteínas celulares específicas. Coulter, em 1949, apresentou o princípio Coulter com o título “o significado da contagem de partículas suspensas em fluido”. Em 1950, Caspersson descreveu a medição microespectrofotométrica de células no ultravioleta e regiões visíveis do espectro. Neste mesmo ano, Coons e Kaplan reportaram que a fluorescência conjugada na forma de isocianeto melhora o resultado da coloração permanecendo como escolha na fluorescência. Kamenstsky e Melamed (1967) elaboraram o método de Moldaven que força a célula através de um tubo capilar e desenharam uma separação celular em fluxo (*sorter*). Em 1969, Van Dilla, Fulwyler e colaboradores desenvolveram o primeiro detector de fluorescência que utilizava o princípio do foco hidrodinâmico (alinhamento de células), configuração óptica e uma fonte de excitação com laser de argônio. Em

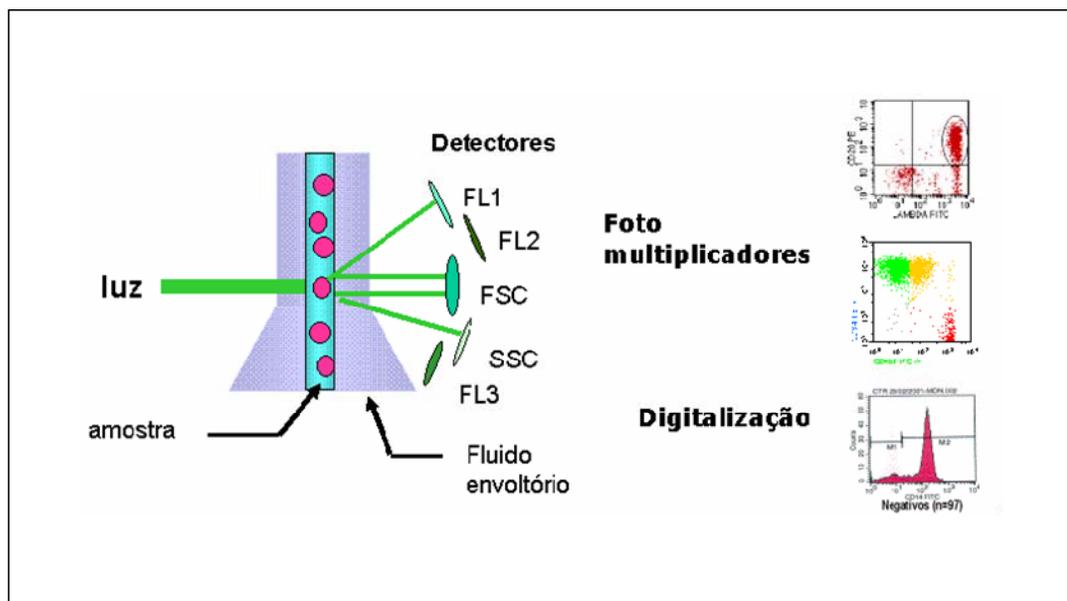
1972, Herzenberg descreveu uma versão melhorada de um *sorter* de células capaz de detectar células com fraca fluorescência coradas com anticorpos ligados à fluoresceína. Em 1975, Kohler e Milstein introduziram a tecnologia de anticorpos monoclonais, que são reagentes imunológicos altamente específicos no estudo celular (BACAL; FAULHABER, 2003).

No citômetro de fluxo, as propriedades morfométricas de células ou partículas em suspensão, orientadas num fluxo laminar e interceptadas uma a uma por um feixe de laser, são determinadas através da dispersão luminosa ocasionada nesse feixe de laser e são então detectadas e mensuradas por sensores (detectores). A luz dispersa é então coletada por um sistema óptico que permite identificar as células ou partículas pelo seu tamanho e complexidade interna, conforme mostrado na Figura 7.



**Figura 7** – Dispersão da luz que define as propriedades morfométricas das células ou partículas (granulosidade/complexidade interna e tamanho). SSC = *side scatter*, FSC = *forward scatter*.

Além desses parâmetros de tamanho e complexidade interna, o laser também é capaz de excitar o fluorocromo. Diferentes fluorocromos são associados aos anticorpos que se ligam de forma seletiva a antígenos de superfície celular ou de partículas. Esses fluorocromos absorvem a luz e a emitem num comprimento de onda maior e específico. Cada fluorocromo possui um padrão espectral distinto de absorção e emissão, de tal maneira que diferentes cores de luz podem ser opticamente separadas pelos filtros seletivos encontrados nos citômetros (BACAL; FAULHABER, 2003). Os fótons de luz gerados atingem detectores específicos e são convertidos em pulsos elétricos que são proporcionais ao número de fótons recebidos. Estes pulsos são convertidos em sinais digitais e os resultados podem ser analisados separadamente pelo computador acoplado ao aparelho, como representado na Figura 8 (JAROSZESKI; RADCLIFF, 1999; BACAL; FAULHABER, 2003).



**Figura 8** – Desenho esquemático de uma configuração padrão do citômetro de fluxo. O aparelho é constituído por sistemas fluidos, ópticos e eletrônicos que movem células ou partículas através do feixe do laser.

As aplicações para a técnica de citometria de fluxo são inúmeras. O desenvolvimento de anticorpos monoclonais dirigidos contra uma grande variedade de constituintes celulares possibilitou a utilização da citometria de fluxo em investigações complexas de imunofenotipagem (JAROSZESKI; RADCLIFF, 1999). Hemácias, plaquetas, linfócitos, monócitos e granulócitos podem ser assim identificados, quantificados e funcionalmente caracterizados.

Dentre as aplicações clínicas da citometria de fluxo, destaca-se: análise da subpopulação linfocítica; diagnóstico e acompanhamento de leucemias e linfomas; diagnóstico e acompanhamento do mieloma múltiplo; detecção de células neoplásicas não hematopoiéticas; monitoramento quimioterápico (doença residual mínima); análise de reticulócitos; diagnóstico de hemoglobinúria paroxística noturna; detecção de anticorpos antiplaquetários; análise do conteúdo de DNA; quantificação de células progenitoras e avaliação imunológica de paciente transplantado (BACAL; FAULHABER, 2003).

## **2 JUSTIFICATIVA**

## 2 JUSTIFICATIVA

O NO constitui uma das mais importantes moléculas biossintetizadas e participa como mediador em diversos processos biológicos. No entanto, a determinação laboratorial do NO representa um desafio devido, principalmente, à sua ínfima meia-vida (cerca de quatro a seis segundos no plasma e dez a sessenta segundos nos tecidos) e pequena concentração em amostras biológicas. Dessa forma, métodos indiretos baseadas em ensaios que refletem a presença desse composto, têm sido amplamente utilizados para avaliar sua produção. Recentemente, a citometria de fluxo foi proposta como método para determinação de NO intracelular, utilizando-se o diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2DA). Esta metodologia baseia-se na capacidade do DAF-2DA penetrar no citoplasma celular, onde é convertido em 4,5-diamonofluoresceína (DAF-2), e na oxidação deste produto pelo NO levando a formação do triazolofluoresceína (DAF-2T). Este produto triazólico (DAF-2T) emite uma fluorescência de cor verde cuja intensidade pode ser mensurada no citômetro de fluxo e é proporcional à concentração intracelular de NO. Cumpre ressaltar a vantagem desta metodologia de identificar a célula produtora de NO. Evidências crescentes sugerem um papel do NO resultante da NO-sintase induzível (iNOS) como mediador do processo de rejeição a enxertos. Um aumento da síntese de NO tem sido relatado na rejeição renal, tanto em modelos animais como em humanos. A monitorização dos pacientes transplantados renais compreende a determinação dos marcadores de função renal (creatinina e uréia), determinação da concentração plasmática das drogas imunossupressoras, avaliação da função metabólica, o hemograma e a biópsia do rim transplantado. A elevação dos níveis plasmáticos de creatinina fornece apenas uma

indicação de disfunção do enxerto. A avaliação histológica de fragmento de biópsia é o padrão-ouro para definir se a elevação da creatinina é devido a um processo de rejeição. As desvantagens desse método incluem a complexidade de realização (pelo procedimento cirúrgico), os riscos associados ao mesmo e o custo elevado. Cumpre ressaltar, que o procedimento para biópsia é invasivo, requer anestesia, internação e está associado a inúmeros riscos para um paciente já debilitado pela doença renal e cirurgia recente. A dificuldade de diagnosticar precocemente e controlar o processo de rejeição, antes que ocorra dano irreversível ao enxerto, tem motivado a realização de inúmeras pesquisas com transplantados, visando determinar marcadores não invasivos que possam auxiliar a clínica no acompanhamento dos pacientes. Considerando a dificuldade na monitoração dos pacientes transplantados renais, o papel do NO na resposta inflamatória e a complexidade da determinação laboratorial do NO, o estabelecimento da metodologia de citometria de fluxo para análise da produção de NO intracelular em monócitos e neutrófilos circulantes e a subsequente determinação do perfil de produção do mesmo em pacientes com nefropatia crônica do enxerto, torna-se altamente desejável.

**3 OBJETIVOS**

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Estabelecer a metodologia de citometria de fluxo para determinação de óxido nítrico em monócitos e neutrófilos circulantes e aplicá-la em amostras de pacientes com nefropatia crônica do enxerto.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Estabelecer a metodologia de citometria de fluxo para análise da produção de óxido nítrico em monócitos e neutrófilos circulantes, empregando amostras de sangue total.
  
- ✓ Determinar o perfil de produção de óxido nítrico intracelular em monócitos e neutrófilos circulantes de pacientes com nefropatia crônica do enxerto.

## 4 POPULAÇÃO E METODOLOGIA

## **4 POPULAÇÃO E METODOLOGIA**

### **4.1 ASPECTOS ÉTICOS**

Este projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (ANEXO A), pela direção do Hospital São Francisco de Assis / Belo Horizonte / Minas Gerais (ANEXO B) e pela Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão (DEPE) do Hospital das Clínicas / UFMG (ANEXO C).

O esclarecimento dos objetivos da pesquisa, utilizando-se linguagem clara, foi conduzido pelos pesquisadores, a todos os participantes do estudo e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi obtido em todos os casos (ANEXO D). Esse termo foi feito em duas vias, uma entregue ao participante e a outra arquivada pelos pesquisadores.

Uma ficha clínica contendo dados importantes para análise dos resultados foi preenchida em todos os casos (ANEXO E).

### **4.2 POPULAÇÃO**

Foram avaliados 21 indivíduos distribuídos em dois grupos:

Grupo I: controles saudáveis (CS) – indivíduos clinicamente saudáveis com idade similar à dos integrantes do grupo II (n=10).

Grupo II: pacientes submetidos a transplante renal no Hospital São Francisco de Assis / Belo Horizonte / Minas Gerais e no Hospital das Clínicas / UFMG que evoluíram para nefropatia crônica do enxerto (n=11). O tempo de transplante dos pacientes variou de 1 a 96 meses (Tabela 2) e esses estavam em uso de imunossupressores, especialmente, ciclosporina, tacrolimus e micofenolato mofenil associados a glicocorticóide (prednisona).

O diagnóstico de nefropatia crônica do enxerto foi realizado pela equipe médica do Serviço de Transplante Renal do Hospital São Francisco de Assis, sob coordenação do médico nefrologista Geraldo Majella Medeiros de Paula e pela equipe médica do Serviço de Transplante Renal do Hospital das Clínicas / UFMG, sob coordenação do médico nefrologista Fernando Lucas Júnior.

Os pacientes com processos infecciosos, sugeridos pelo leucograma e exame de urina rotina, bem como aqueles submetidos a vacinação recente foram excluídos do estudo.

Os indivíduos do grupo controle saudável (grupo I) que apresentaram leucocitose também foram excluídos do estudo.

As características dos participantes do estudo estão apresentadas nas Tabelas 2 e 3.

**Tabela 2** – Sexo, média de idade e tempo pós-transplante dos integrantes dos dois grupos avaliados.

<b>Grupo</b>	<b>Sexo</b>			<b>Idade*</b> <b>(anos)</b>	<b>Tempo pós transplante#</b> <b>(meses)</b>
	<b>Masculino</b>	<b>Feminino</b>	<b>Total</b>		
<b>CS</b>	03	07	10	37	-
<b>NCE</b>	07	04	11	45	1 – 97

\* Valores expressos em média; # valor mínimo e máximo; NCE – Nefropatia crônica do enxerto; CS – Controle saudável

**Tabela 3** – Caracterização dos pacientes transplantados renais com nefropatia crônica do enxerto.

<b>Identificação</b>	<b>Tempo pós transplante</b> <b>(meses)</b>	<b>Drogas imunossupressoras</b> <b>utilizadas</b>
P01	95	Tacrolimus
P02	34	Ciclosporina, micofenolato mofetil
P03	60	Micofenolato mofetil
P04	76	Tacrolimus, micofenolato mofetil
P05	97	Sirolimus, micofenolato mofetil
P06	58	Sirolimus, micofenolato mofetil
P07	84	Tacrolimus, micofenolato mofetil
P08	36	Micofenolato mofetil
P09	15	Tacrolimus, micofenolato mofetil
P10	01	Ciclosporina, micofenolato mofetil
P11	05	Tacrolimus, micofenolato mofetil

### 4.3 AMOSTRA BIOLÓGICA

Para estabelecer a metodologia de citometria de fluxo para análise da produção de óxido nítrico intracelular em monócitos e neutrófilos circulantes, foram utilizadas amostras de 10mL de sangue heparinizado colhidos de indivíduos saudáveis.

Para determinar o perfil de produção de óxido nítrico intracelular em monócitos e neutrófilos circulantes em pacientes com nefropatia crônica do enxerto, foram colhidas amostras de 10mL de sangue heparinizado de todos os participantes da pesquisa (grupos I e II).

As amostras dos pacientes com nefropatia crônica do enxerto (grupo II) foram obtidas no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital São Francisco de Assis/ Belo Horizonte/ Minas Gerais e no ambulatório do Hospital das Clínicas / UFMG, no momento da coleta para os exames de acompanhamento pós-transplante. Os resultados dos hemogramas dos pacientes foram fornecidos pelos laboratórios dos hospitais envolvidos na pesquisa (Hospital São Francisco de Assis e Hospital das Clínicas / UFMG) e não apresentaram alterações dignas de registro.

As amostras do grupo I (CS) foram coletadas no Laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFMG. Além dos 10mL de sangue heparinizado, foram coletados 5mL em EDTA para a realização do hemograma. Esse foi realizado utilizando-se o contador eletrônico de células, Counter-Coulter, no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFMG.

#### **4.4 METODOLOGIA**

Nesse estudo, buscou-se inicialmente estabelecer a metodologia de citometria de fluxo para análise da produção de óxido nítrico intracelular em monócitos e neutrófilos, empregando amostras de sangue total. Para tanto, uma adaptação da técnica previamente descrita por HAVENGA *et al.* (2001) e STRIJDOM *et al.* (2004) foi realizada. Em seguida, a metodologia otimizada foi utilizada para determinar o perfil de produção de óxido nítrico intracelular em monócitos e neutrófilos circulantes em pacientes com nefropatia crônica do enxerto.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração do Centro de Pesquisas René Rachou / Fiocruz.

##### **4.4.1 Determinação de óxido nítrico intracelular em monócitos e neutrófilos circulantes, por citometria de fluxo – protocolo otimizado**

A metodologia utilizada neste trabalho foi adaptada dos protocolos originais descritos por HAVENGA *et al.* (2001) e STRIJDOM *et al.* (2004), conforme descrito a seguir:

Para o pré-tratamento da amostra de sangue total, dois protocolos foram avaliados: isolamento de creme leucocitário e uso de sangue total isento de plasma.

No protocolo de isolamento do creme leucocitário, após a centrifugação da amostra de sangue, desprezou-se o plasma e separou-se o creme leucocitário, com subsequente lise das hemácias com cloreto de amônio e lavagem dos leucócitos. Após a contagem de leucócitos viáveis utilizando a câmara de Neubauer e o corante azul de tripan, adicionou-se PBS 2% BSA em quantidade suficiente para obter  $1 \times 10^7$  leucócitos/mL. Este procedimento permitiu estimar o número de leucócitos viáveis por tubo, definindo que 50 $\mu$ L de creme leucocitário corresponderia a 500 mil leucócitos.

No protocolo de utilização de sangue total isento de plasma, após a coleta de 10mL de sangue total em heparina sódica, ajustou-se a global de leucócitos para 10.000/ $\mu$ L. Para este ajuste, utilizou-se a global de leucócitos apresentada nos hemogramas. Desta forma, centrifugou-se a amostra de sangue a 3000 rpm por 10 minutos a 18°C, retirou-se o plasma e acrescentou-se igual volume de PBS 1X 2% BSA. Posteriormente, transferiu-se o sangue isento de plasma com o PBS 1X 2% BSA para um tubo de polipropileno de 14mL. O conteúdo desse tubo foi novamente centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos a 18°C e o sobrenadante foi desprezado. Posteriormente acrescentou-se o mesmo volume de PBS 1X 2% BSA. Finalmente, este tubo foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos a 18°C e retirou-se quantidade suficiente de sobrenadante para obter 10.000 leucócitos/ $\mu$ L. Este protocolo de pré-tratamento da amostra foi o escolhido neste estudo.

Neste estudo, buscou-se obter o perfil de produção de NO por monócitos e neutrófilos em diferentes condições experimentais: produção basal (somente na presença de DAF-

2DA), após estímulo e após inibição. Para cada condição foi feito um tubo controle, ou seja, um tubo na ausência do reagente DAF-2DA, para avaliar a ocorrência de possíveis reações inespecíficas. Para a realização das diferentes condições experimentais, transferiu-se 50 $\mu$ L da amostra (equivalente a 500.000 leucócitos) para tubos de polipropileno.

Para avaliar o perfil de produção basal de NO por monócitos e neutrófilos, incubou-se 50 $\mu$ L da amostra em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 180 minutos somente na presença de 10 $\mu$ L de solução de DAF-2DA 10 $\mu$ M (concentração final de DAF-2DA=2 $\mu$ M).

Para avaliar o perfil de produção de NO após estímulo, incubou-se previamente 50 $\mu$ L da amostra por 1 hora em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> na presença de diferentes indutores da produção de NO, incluindo phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) na concentração final de 0,25 $\mu$ g/mL, PMA+ionomicina nas concentrações finais de 0,25 $\mu$ g/mL e 1,0 $\mu$ g/mL respectivamente, concavalina-A (ConA) na concentração final de 64 $\mu$ g/mL, fitohemaglutinina (PHA) na concentração final de 100 $\mu$ g/mL e lipopolissacáride (LPS) de *Escherichia coli* na concentração final de 10 $\mu$ g/mL, seguida pela incubação por 180 minutos na presença de DAF-2DA na concentração 2,0 $\mu$ M. O LPS foi o indutor escolhido neste estudo e foi utilizado na concentração final 10 $\mu$ g/mL, ou seja, 5 $\mu$ L de solução de LPS 100 $\mu$ g/mL para 50 $\mu$ L de amostra.

Para avaliar o perfil de produção de NO após inibição, incubou-se previamente 50 $\mu$ L da amostra por 10 minutos em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> na presença de dois inibidores

da produção de NO, N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) e aminoguanidina (AG), seguida de incubação por 180 minutos na presença de DAF-2DA na concentração de 2,0 $\mu$ M. Os inibidores foram utilizados na concentração final 10mM, ou seja, 5 $\mu$ L de solução de 100mM para 50 $\mu$ L de amostra. O inibidor escolhido neste estudo foi a AG.

Todos os tubos foram preparados em duplicata para possibilitar a posterior marcação de monócitos (anti-CD14 TC) e neutrófilos (anti-CD16 TC) em tubos distintos.

Após as incubações, todos os tubos de cultura foram transferidos imediatamente para o gelo e adicionou-se 0,5 $\mu$ L de anticorpo anti-CD14 TC ou anti-CD16 TC, seguido de incubação por 20 minutos.

Posteriormente, adicionou-se 2mL de solução de lise com simultânea agitação no vortex, seguida de incubação por 10 minutos. Após essa incubação, adicionou-se 1mL de PBS 1X, centrifugou-se os tubos a 1300 rpm por 7 minutos a 4°C e verteu-se cuidadosamente os tubos com posterior re-suspensão do *pellet* no vortex. Novamente, adicionou-se 1mL de PBS 1X, centrifugou-se os tubos a 1300 rpm por 7 minutos a 18°C e verteu-se cuidadosamente os tubos retirando o excesso de líquido com papel absorvente. Finalmente adicionou-se 200 $\mu$ L de PBS 1X e transferiu-se o conteúdo para tubos de poliestireno de 5mL para imediata leitura no citômetro de fluxo.

Todo o experimento foi realizado ao abrigo da luz, pois os anticorpos e o reagente DAF-2DA são fotossensíveis.

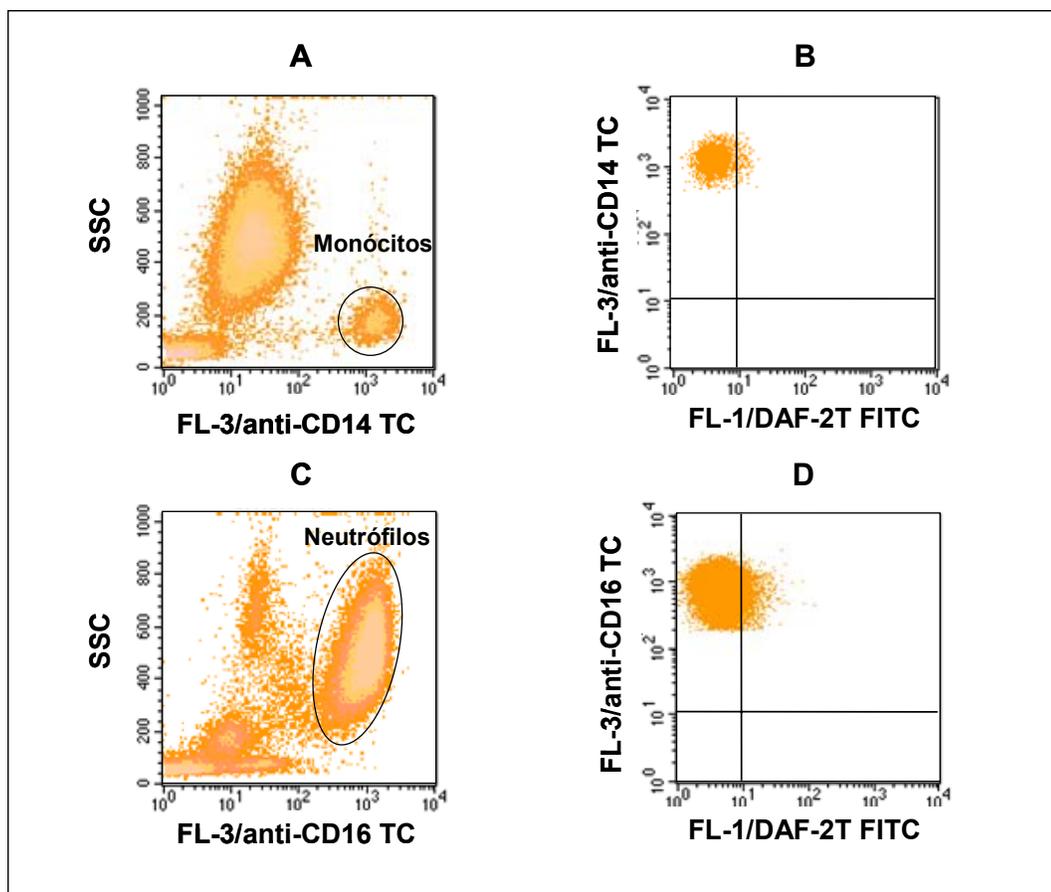
#### **4.4.2 Aquisição e análise dos dados de avaliação do perfil de óxido nítrico intracelular em monócitos e neutrófilos circulantes, por citometria de fluxo – protocolo otimizado**

Um total de 50 mil eventos/tubo foram obtidos usando citômetro de fluxo FACScan® (BD). Para a aquisição e análise dos dados foi utilizado o *software* CELLQuest™, como recomendado pelo fabricante.

As diferentes estratégias utilizadas para a análise do perfil de NO intracelular nas subpopulações de leucócitos estão representadas na Figura 9. A análise seletiva de monócitos foi estabelecida pela combinação de marcadores anti-receptor de superfície celular (FL-3) versus granulosidade (SSC), para discriminar e selecionar de forma segura, os monócitos como células  $SSC^{Low}CD14^{High+}$  (Figura 9 A). Seguindo a seleção da população de monócitos, o percentual de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> foi determinado em gráficos de FL-1/DAF-2T FITC versus FL-3/anti-CD14 TC (Figura 9 B).

A análise seletiva de neutrófilos foi estabelecida por uma combinação de marcadores anti-receptor de superfície celular (FL-3) versus granulosidade (SSC), para discriminar e selecionar de forma segura os neutrófilos como células  $SSC^{high}CD16^{high+}$  (Figura 9 C). Seguindo a seleção da população de neutrófilos, o percentual de neutrófilos DAF-2T<sup>+</sup> foi determinado em gráficos de FL-1/DAF-2T FITC versus FL-3/anti-CD16 TC (Figura 9 D).

Os ajustes de FL-1 foram feitos a partir dos perfis obtidos durante a leitura dos tubos contendo apenas sangue total isento de plasma marcado com anti-CD14 TC ou anti-CD16 TC.



**Figura 9** – Estratégias utilizadas para a análise do perfil de NO intracelular em monócitos e neutrófilos circulantes.

Todos os resultados foram expressos como percentual de células DAF-2T<sup>+</sup>, correspondente ao quadrante superior direito - duplo positivo (Q2).

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do *software GraphPad Prism 4.00* (San Diego, CA). Os resultados deste estudo que assumiram distribuição não paramétrica foram analisados, primeiramente, pelo teste ANOVA *Kruskal-Wallis*, seguido do teste de comparações múltiplas *Dunn`s*. Estes testes estatísticos foram empregados em todos os casos onde foram abordadas comparações entre três grupos estudados. Para análise comparativa entre dois grupos, foi empregado o teste não paramétrico *Mann-Witney* para a grande maioria das análises e o Test T de *Student – one tailed* especificamente para a análise do impacto da inibição da AG em neutrófilos de indivíduos controles saudáveis e pacientes com NCE. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 ESTABELECIMENTO DA METODOLOGIA DE CITOMETRIA DE FLUXO PARA ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO INTRACELULAR EM MONÓCITOS E NEUTRÓFILOS, EMPREGANDO AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL**

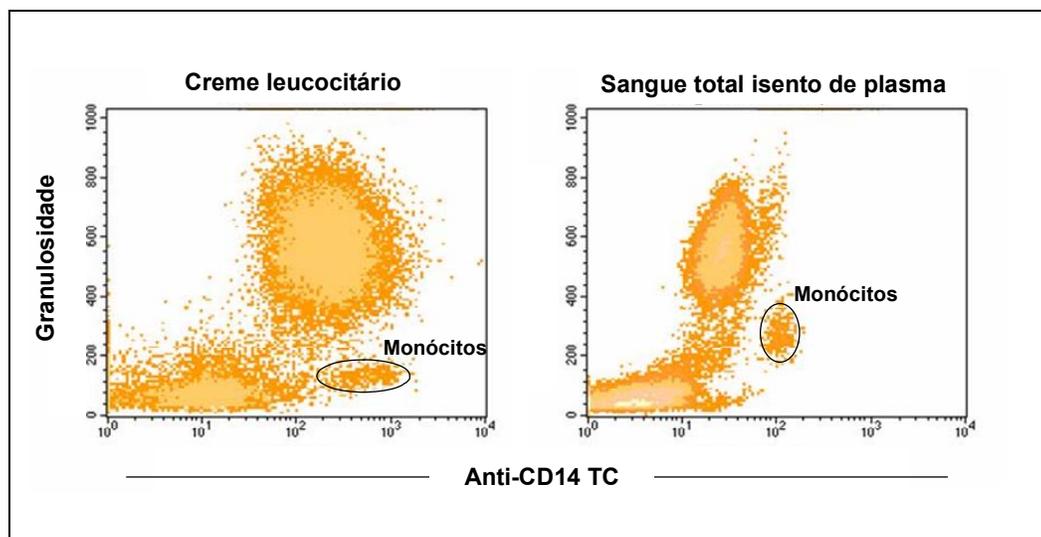
Para o estabelecimento da metodologia de citometria de fluxo para análise de óxido nítrico intracelular, amostras de sangue total heparinizado, obtido de indivíduos saudáveis foram submetidas a diferentes protocolos experimentais visando otimizar as diferentes etapas do procedimento experimental, incluindo: 1) escolha do protocolo de pré-tratamento das amostras de sangue total; 2) determinação da concentração ideal de DAF-2DA; 3) escolha do melhor tempo de incubação com DAF-2DA; 4) seleção do melhor indutor da produção de NO intracelular; 5) seleção do melhor inibidor da produção de NO intracelular. Essas etapas do procedimento experimental foram realizadas focalizando as análises no perfil de produção de NO por monócitos circulantes. Após a otimização dessas etapas, foi determinado o melhor protocolo de imunofenotipagem para seleção de neutrófilos e as análises subseqüentes foram realizadas nas populações de monócitos e neutrófilos do sangue periférico.

#### **5.1.1 Escolha do protocolo de pré-tratamento das amostras de sangue total**

Dois protocolos de pré-tratamento das amostras de sangue total foram avaliados no presente estudo: protocolo #1) isolamento do creme leucocitário e protocolo #2)

utilização de sangue total isento de plasma. O primeiro protocolo previa a separação do creme leucocitário dos demais constituintes sanguíneos, com subsequente lise das hemácias e ajuste da suspensão de leucócitos para  $1 \times 10^7$  leucócitos/mL. O protocolo #2 previa a utilização de sangue total isento de plasma e ajuste do número de leucócitos para  $1 \times 10^7$ /mL.

Os resultados dos perfis imunofenotípico e morfométrico de leucócitos utilizando os dois protocolos de pré-tratamento das amostras de sangue total estão demonstrados na Figura 10. A análise dos perfis demonstra que o protocolo #2 promoveu melhor segregação das populações de monócitos com fenótipo característico de células  $CD14^{High+}$  baseada no perfil imunofenotípico de marcação com anti-CD14 TC. Além disso, esse protocolo promoveu menor distorção no perfil morfométrico de monócitos, como demonstrado pela distribuição mais homogênea e compacta em relação àquela obtida pelo protocolo #1. Dessa forma, o protocolo #2 foi selecionado para as etapas subsequentes de otimização da metodologia.

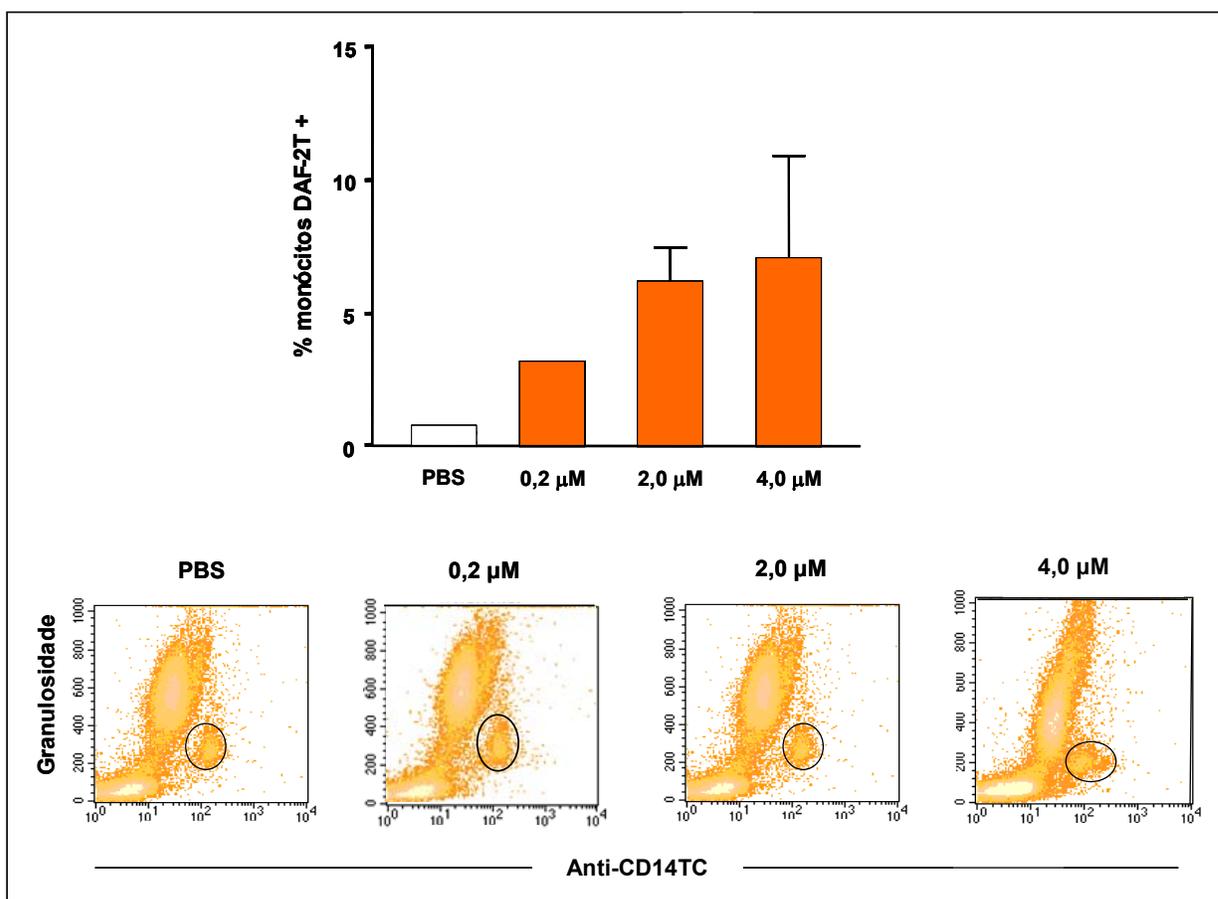


**Figura 10** – Perfis morfométricos e imunofenotípicos de monócitos após cultura *in vitro* por 120 minutos empregando creme leucocitário ou sangue total isento de plasma. Menor distorção do perfil imunofenotípico característico de monócitos, como células CD14<sup>High+</sup> foi observada no protocolo empregando sangue total isento de plasma.

### 5.1.2 Determinação da concentração ideal de DAF-2DA

Para determinar a concentração ideal de DAF-2DA para análise da produção NO intracelular por monócitos circulantes, amostras de sangue total isentas de plasma foram incubadas por 120 minutos na presença de DAF-2DA, nas concentrações finais 0,2 $\mu$ M, 2,0 $\mu$ M e 4,0 $\mu$ M. Os resultados do percentual de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> utilizando as três concentrações de DAF-2DA, bem como na presença de PBS estão mostrados na Figura 11. A análise dos dados demonstrou maiores percentuais de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> nos protocolos que empregaram DAF-2DA nas concentrações 2,0 $\mu$ M e 4,0 $\mu$ M. A análise subsequente em gráficos de distribuição pontual por densidade permitiu identificar menor distorção no perfil imunofenotípico de monócitos nos experimentos

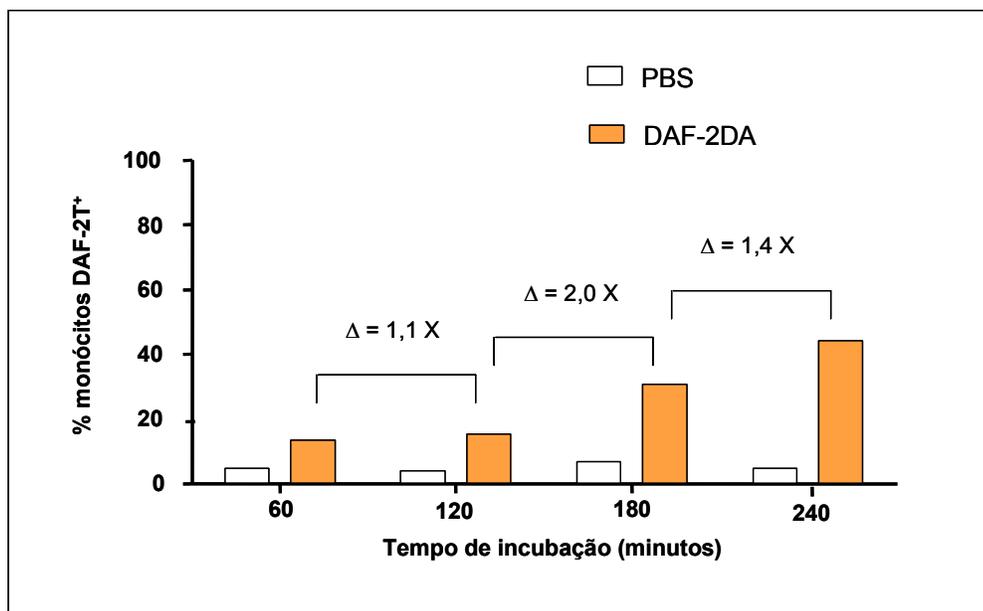
empregando DAF-2DA na concentração 2,0 $\mu$ M, como demonstrado pela distribuição mais homogênea e compacta em relação àquela obtida pela utilização de DAF-2DA 4,0 $\mu$ M. Dessa forma, a concentração de DAF-2DA de 2,0 $\mu$ M foi selecionada para as etapas subseqüentes de otimização da metodologia.



**Figura 11** – Análise morfolométrica e imunofenotípica de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> após cultura *in vitro* de sangue total isento de plasma na presença de diferentes concentrações de DAF-2DA por 120 minutos. Os resultados estão expressos sob a forma de percentual médio de monócitos DAF-2T<sup>+</sup>  $\pm$  desvio-padrão. Gráficos representativos de distribuição pontual por densidade ilustram os perfis morfolométricos e imunofenotípicos de monócitos obtidos em cada protocolo avaliado.

### 5.1.3 Escolha do melhor tempo de incubação com DAF-2DA

Para a escolha do tempo ideal de incubação para análise do NO intracelular em monócitos, as amostras de sangue total isento de plasma foram incubadas por, 60, 120, 180 e 240 minutos na presença de DAF-2DA na concentração final de  $2,0\mu\text{M}$ . Os resultados da cinética de tempo de incubação estão representados na Figura 12. A análise dos dados demonstrou um aumento progressivo nos percentuais de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> em função do tempo de incubação com DAF-2DA. Entretanto, a magnitude do aumento foi superior entre os intervalos 120 – 180 minutos (= 2,0 vezes) em relação aos demais intervalos avaliados (60 – 120 minutos = 1,1 vezes; 180 – 240 minutos = 1,4 vezes). Dessa forma, o protocolo empregando o tempo de incubação de 180 minutos foi selecionado para as etapas subseqüentes de otimização da metodologia.

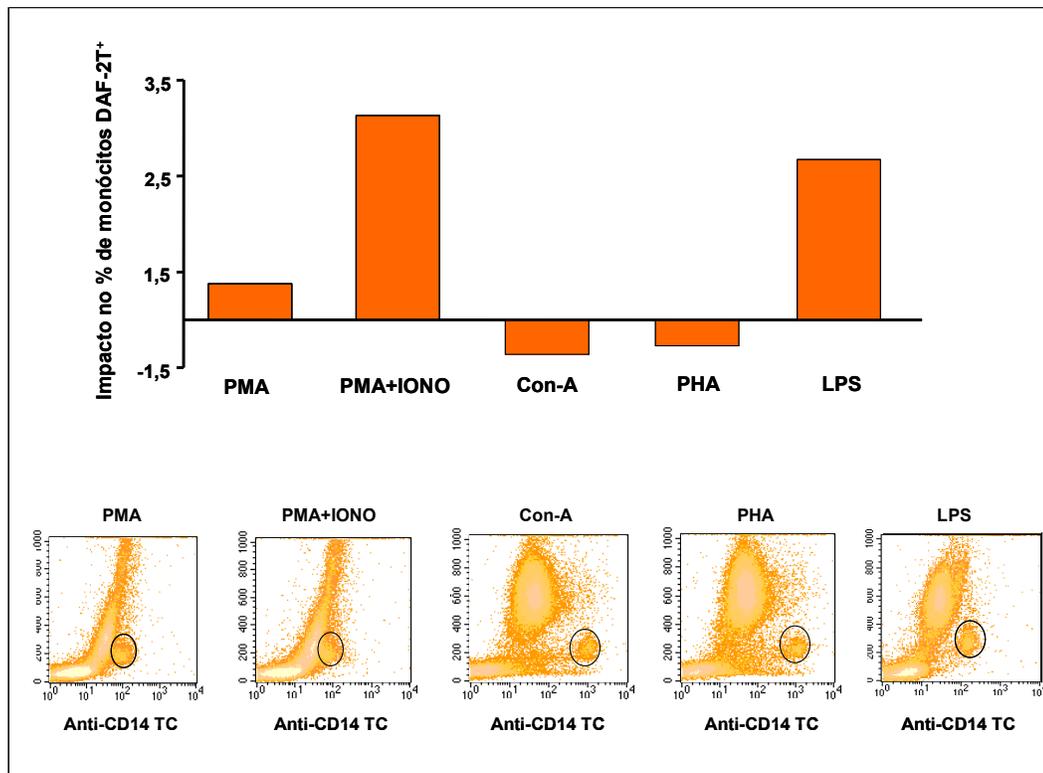


**Figura 12** – Percentual de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> após diferentes períodos de cultura *in vitro* empregando amostras de sangue total isento de plasma na presença de 2,0 $\mu$ M de DAF-2DA. Os resultados estão expressos sob a forma de percentual de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> em cada protocolo avaliado. Análises das variações no percentual de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> nos diferentes tempos avaliados ( $\Delta$ =T120/T60; T180/T120 e T240/T180) estão representadas no gráfico.

#### 5.1.4 Seleção do melhor indutor da produção de NO intracelular

Para a seleção do melhor indutor da produção de NO intracelular em monócitos, as amostras de sangue total isento de plasma foram pré-incubadas por 60 minutos, na presença de diferentes indutores da produção de NO, incluindo PMA, PMA+ionomicina, ConA, PHA e LPS, seguida pela incubação por 180 minutos na presença de DAF-2DA na concentração de 2,0 $\mu$ M. Os resultados do impacto dos diferentes indutores da produção de NO intracelular no percentual de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> estão mostrados na Figura 13. A análise dos dados demonstrou maiores impactos sobre percentuais de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> nos protocolos que empregaram PMA+ionomicina e LPS. A análise

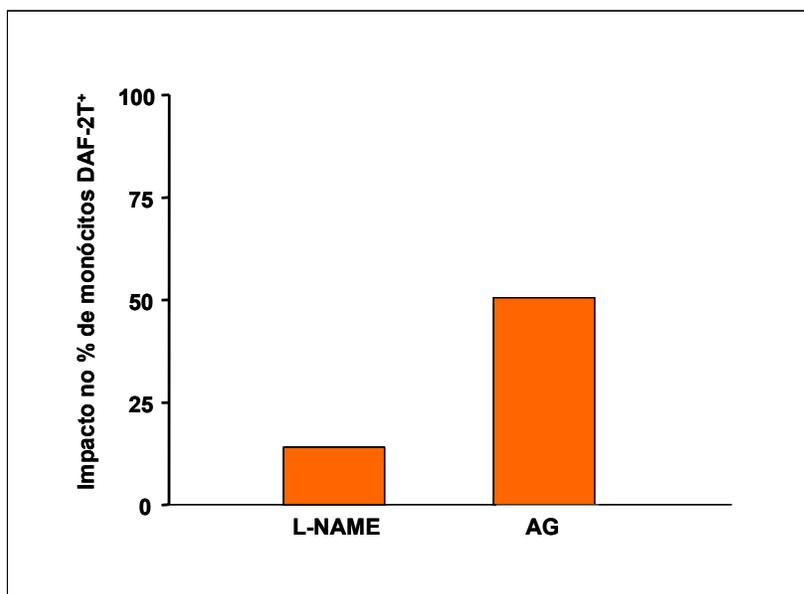
subseqüente em gráficos de distribuição pontual por densidade permitiu identificar menor distorção no perfil imunofenotípico de monócitos nos experimentos empregando LPS, como demonstrado pela distribuição mais homogênea e compacta em relação àquela obtida pela utilização de PMA+ionomicina. Dessa forma, o LPS foi selecionado para as etapas subseqüentes de otimização da metodologia.



**Figura 13** – Impacto da pré-incubação por 60 minutos de amostras de sangue total isentas de plasma com diferentes indutores da produção de NO seguidas de incubação por 180 minutos na presença de DAF-2DA 2,0µM, no perfil morfométrico e imunofenotípico de monócitos. Os resultados estão expressos sob a forma do impacto dos diferentes indutores da produção de NO no percentual de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> (Indutor/DAF-2DA). Gráficos representativos de distribuição pontual por densidade ilustram os perfis morfométricos e imunofenotípicos de monócitos obtidos em cada protocolo avaliado. PMA = phorbol 12-myristate 13-acetate; IONO = ionomicina; Con-A = concavalina-A; PHA = phytohemaglutinina; LPS = lipopolissacáride de *Escherichia coli*.

### 5.1.5 Seleção do melhor inibidor da produção de NO intracelular

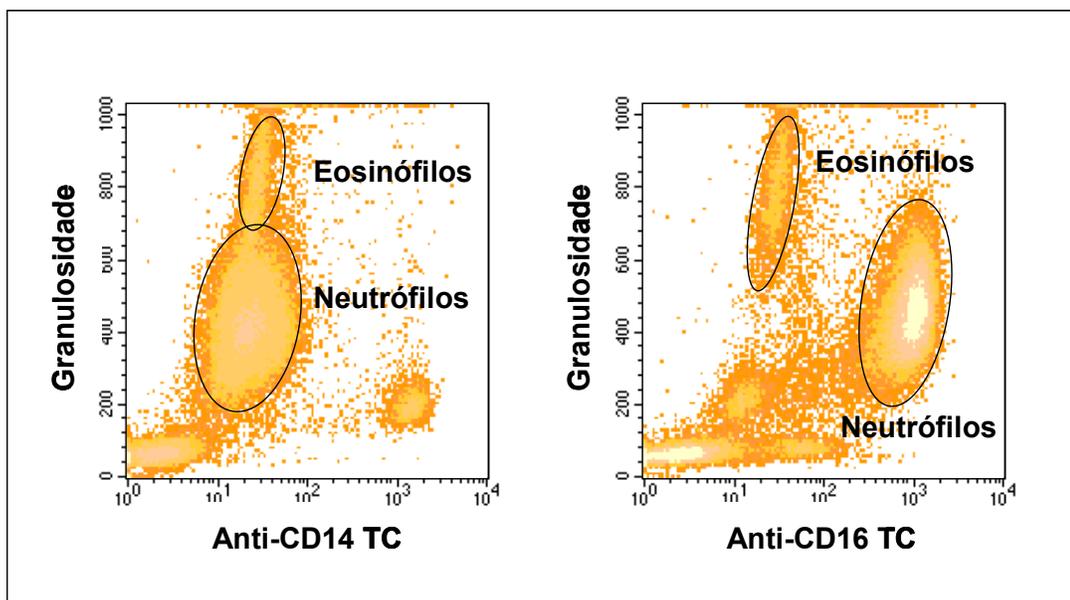
Para a seleção do melhor inibidor da produção de NO intracelular em monócitos, as amostras de sangue total isento de plasma foram pré-incubadas por 10 minutos, na presença de dois inibidores da produção de NO, N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) e aminoguanidina (AG), seguida de incubação por 180 minutos na presença de DAF-2DA na concentração de 2,0 $\mu$ M. Os resultados do impacto dos diferentes inibidores sobre o percentual de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> estão mostrados na Figura 14. A análise dos dados demonstrou maior impacto de inibição no percentual de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> no protocolo que empregou aminoguanidina. Dessa forma, a aminoguanidina foi selecionada como inibidor da produção de NO intracelular no protocolo otimizado.



**Figura 14** – Impacto da pré-incubação por 10 minutos com diferentes inibidores da produção de NO no percentual de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> após incubação de amostras de sangue total isento de plasma por 180 minutos na presença de DAF-2DA 2,0 $\mu$ M. Os resultados estão expressos sob a forma do impacto dos diferentes inibidores da produção de NO no percentual de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> (Inibidor/DAF-2DA x 100).

### **5.1.6 Determinação do melhor protocolo de imunofenotipagem para seleção de neutrófilos**

Para a escolha do melhor protocolo de imunofenotipagem para a seleção da população de neutrófilos do sangue periférico e análise da produção de NO intracelular, as amostras de sangue total isento de plasma foram incubadas por 180 minutos na presença de DAF-2DA na concentração de  $2,0\mu\text{M}$ , seguido pela imunofenotipagem por meio da incubação paralela com anticorpos monoclonais anti-CD14 TC e anti-CD16 TC. Os resultados dos perfis imunofenotípicos e morfométricos de neutrófilos estão mostrados na Figura 15. A análise dos gráficos de distribuição pontual por densidade permitiu identificar que a imunomarcação com anticorpos anti-CD16 TC permitiu uma melhor segregação dos neutrófilos em relação aos eosinófilos que o protocolo empregando anti-CD14 TC. Dessa forma, a imunofenotipagem com anti-CD16 TC foi incorporada paralelamente ao protocolo de marcação com anti-CD14 TC na otimização da metodologia.



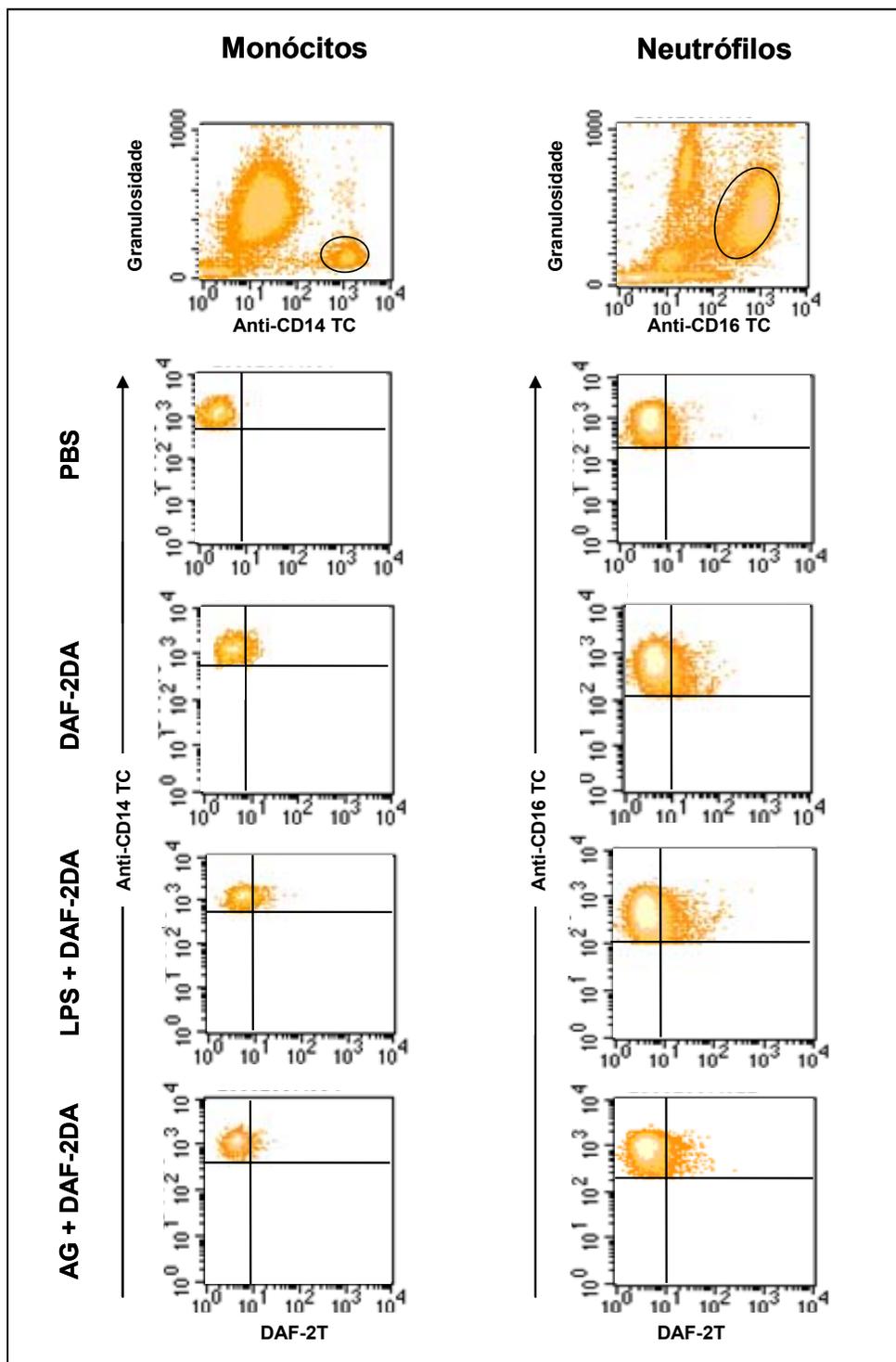
**Figura 15** – Perfis morfométricos e imunofenotípicos de neutrófilos após cultura *in vitro* por 180 minutos empregando sangue total isento de plasma, seguido pela imunofenotipagem com anticorpos monoclonais anti-CD14 TC ou anti-CD16 TC. A melhor segregação da população de neutrófilos em relação à população de eosinófilos foi observada no protocolo empregando imunomarcagem com anticorpo monoclonal anti-CD16 TC.

### 5.1.7 Síntese dos parâmetros otimizados na metodologia para análise da produção de NO intracelular em monócitos e neutrófilos em amostras de sangue total

Uma síntese dos parâmetros otimizados para a determinação do NO intracelular em monócitos e neutrófilos circulantes por citometria de fluxo está representada na Tabela 3. Os perfis morfométricos e imunofenotípicos de monócitos e neutrófilos após cultura *in vitro* empregando sangue total isento de plasma, nas diferentes condições otimizadas (ausência de DAF-2DA; presença de DAF-2DA; presença de LPS e DAF-2DA e presença de AG e DAF-2DA) estão representados na Figura 16.

**Tabela 4** – Síntese dos parâmetros otimizados no procedimento experimental de análise da produção de óxido nítrico intracelular em monócitos e neutrófilos, empregando amostras de sangue total

<b><i>Variável</i></b>	<b><i>Condição Otimizada</i></b>
<b>Protocolo de preparação da amostra</b>	Sangue isento de plasma
<b>Concentração final de DAF-2 DA</b>	2 $\mu$ M
<b>Tempo de incubação com DAF-2 DA</b>	180 minutos
<b>Indutor da produção de NO</b>	LPS concentração final 10 $\mu$ g/mL
<b>Inibidor da produção de NO</b>	AG concentração final 10mM
<b>Imunofenotipagem para monócitos</b>	Anti-CD14 TC
<b>Imunofenotipagem para neutrófilos</b>	Anti-CD16 TC



**Figura 16** - Perfis morfométricos e imunofenotípicos de monócitos e neutrófilos após cultura *in vitro* empregando amostras de sangue total isento de plasma, na ausência de DAF-2DA; na presença de DAF-2DA; na presença de AG e DAF-2DA e na presença de LPS e DAF-2DA.

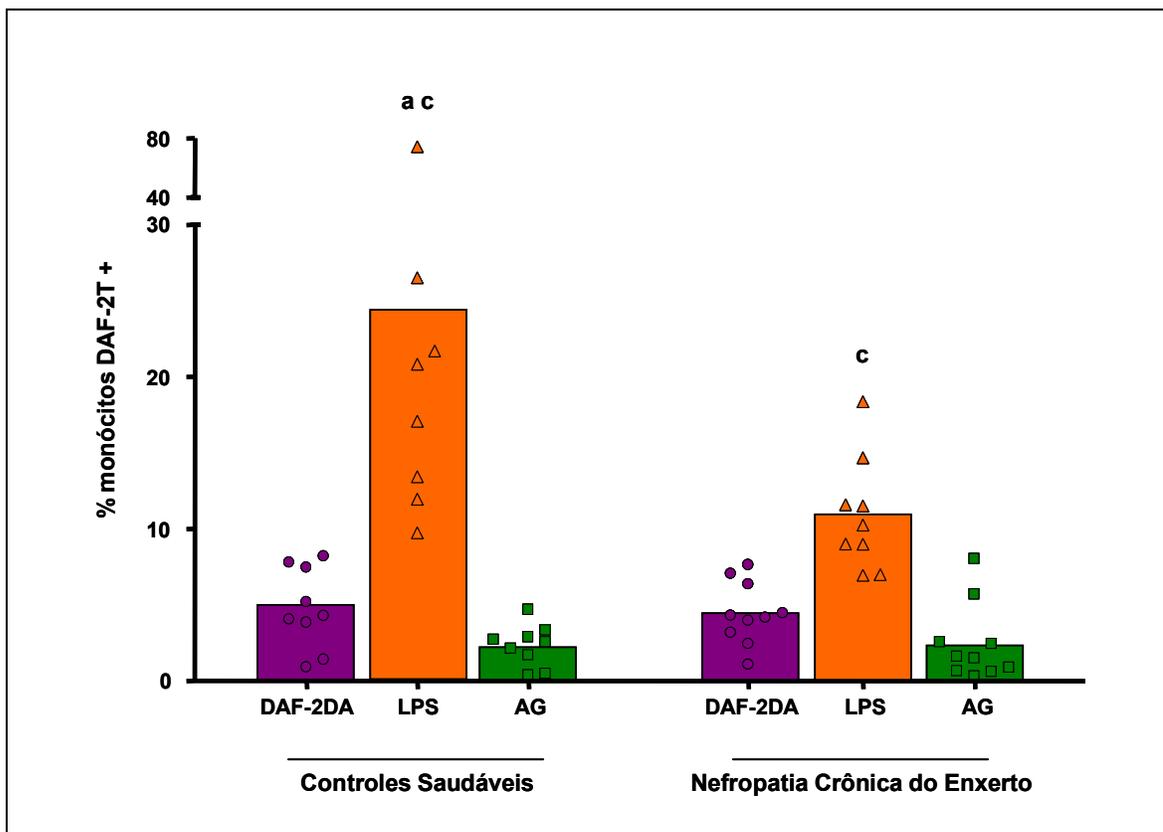
## **5.2 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO INTRACELULAR EM MONÓCITOS E NEUTRÓFILOS CIRCULANTES EM PACIENTES COM NEFROPATIA CRÔNICA DO ENXERTO**

Para a determinação do perfil de produção de NO intracelular em monócitos e neutrófilos circulantes, a metodologia otimizada neste estudo foi empregada em amostras de sangue total isento de plasma de 10 controles saudáveis (Grupo I) e 11 pacientes com nefropatia crônica do enxerto (Grupo II).

### **5.2.1 Análise da produção de óxido nítrico intracelular em monócitos circulantes**

Os resultados da produção de óxido nítrico intracelular em monócitos circulantes em pacientes com nefropatia crônica do enxerto bem como em indivíduos controles saudáveis estão mostrados na Figura 17. Os resultados estão mostrados como percentual de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> em culturas *in vitro* de sangue total realizadas apenas na presença de DAF-2DA, bem como em culturas submetidas à estimulação com LPS e à inibição com AG. A análise dos dados demonstrou que no grupo de indivíduos controles saudáveis, o percentual mediano de monócitos DAF-2T<sup>+</sup>, observado em culturas estimuladas com LPS diferiu significativamente daqueles observados nas culturas realizadas somente na presença de DAF-2DA bem como daquelas submetidas à inibição com AG. Por outro lado, a análise dos dados no grupo de pacientes com nefropatia crônica do enxerto demonstrou que o percentual de

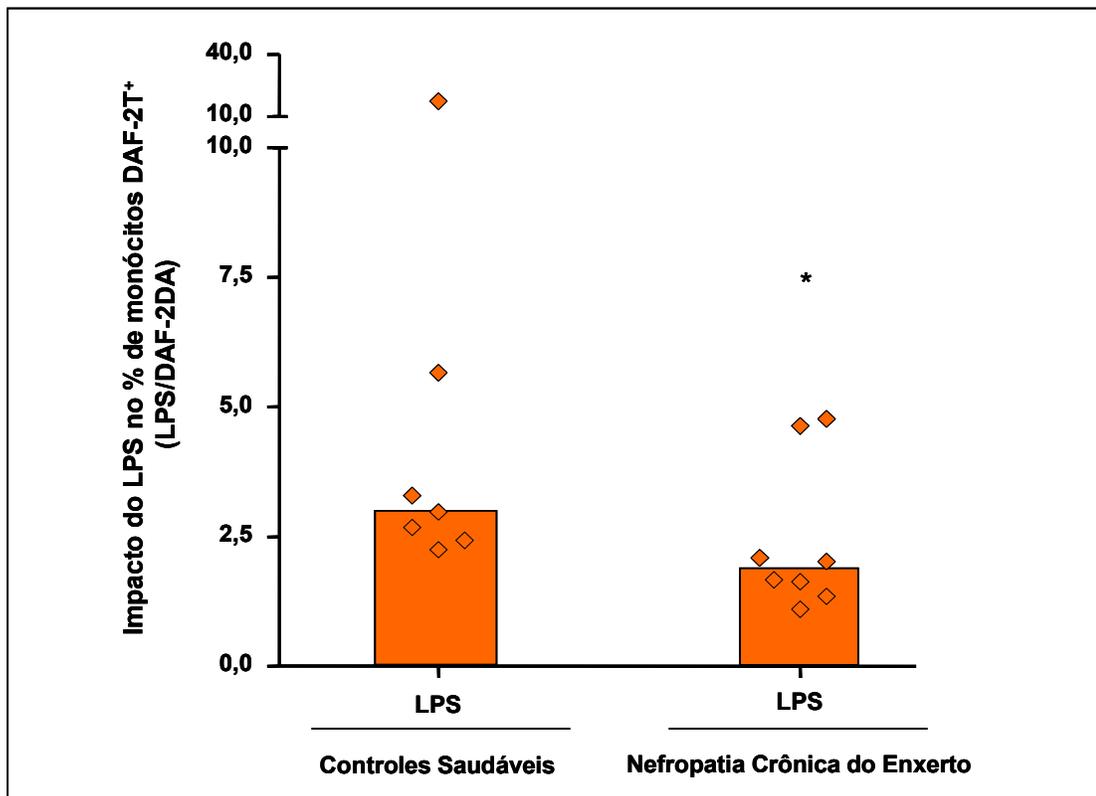
monócitos DAF-2T<sup>+</sup> observado nas culturas estimuladas com LPS diferiu significativamente apenas em relação àquelas submetidas à inibição com AG.



**Figura 17** – Produção intracelular de óxido nítrico por monócitos circulantes em pacientes com nefropatia crônica do enxerto e indivíduos controles saudáveis. Os resultados estão expressos como mediana (barras horizontais) e dispersão dos valores individuais (símbolos) dos percentuais de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> observados em culturas realizadas apenas na presença de DAF-2DA (●) bem como em culturas submetidas à estimulação com LPS (▲) e a inibição com AG (■). As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelas letras “a” e “c” em relação às culturas realizadas somente na presença de DAF-2DA e às culturas submetidas à inibição com AG, respectivamente.

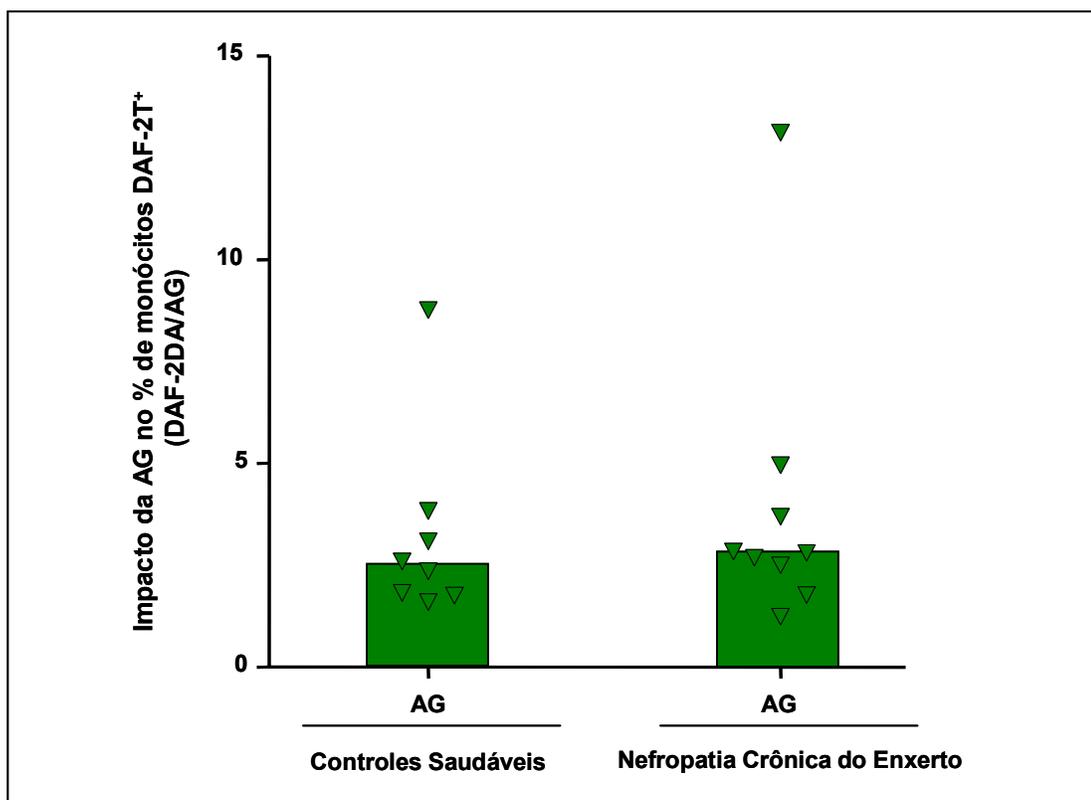
Os resultados do impacto da estimulação *in vitro* com LPS na produção de óxido nítrico intracelular em monócitos circulantes em pacientes com nefropatia crônica do enxerto bem como em indivíduos controles saudáveis estão mostrados na Figura 18. Os

resultados estão mostrados como valores percentuais de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> observados em culturas submetidas à estimulação com LPS em relação aos observados em culturas realizadas somente na presença de DAF-2DA. A análise dos dados demonstrou que a estimulação com LPS resultou em menor impacto na produção de óxido nítrico intracelular em monócitos do grupo pacientes com nefropatia crônica do enxerto em relação ao grupo de indivíduos controles saudáveis.



**Figura 18** – Impacto da estimulação *in vitro* com LPS na produção intracelular de óxido nítrico por monócitos circulantes em pacientes com nefropatia crônica do enxerto e indivíduos controles saudáveis. Os resultados estão expressos como mediana (barras horizontais) e dispersão dos valores individuais (símbolos) dos percentuais de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> observados em culturas submetidas à estimulação com LPS em relação aos observados em culturas realizadas apenas na presença de DAF-2DA (◆), ou seja, (LPS/DAF-2DA). Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) está representada por \* em relação ao grupo de indivíduos controles.

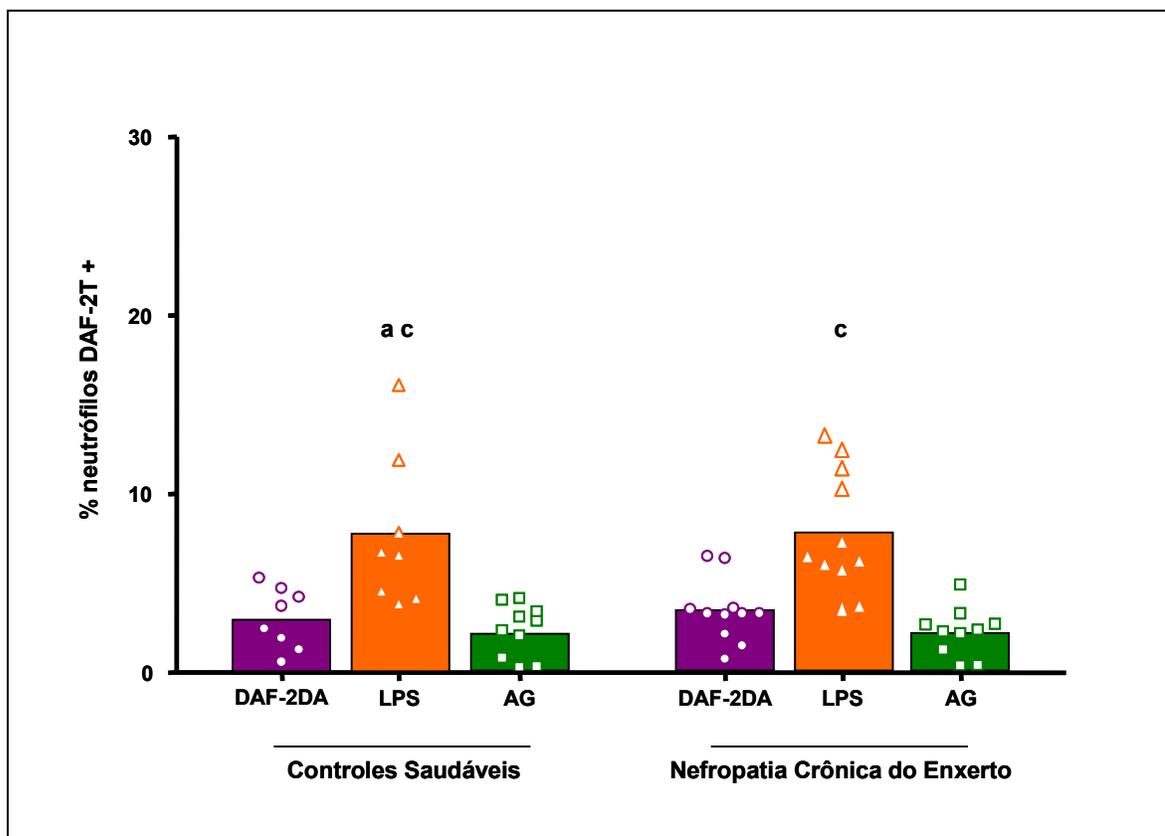
Os resultados do impacto da inibição *in vitro* com AG na produção de óxido nítrico intracelular em monócitos circulantes em pacientes com nefropatia crônica do enxerto, bem como em indivíduos controles saudáveis estão mostrados na Figura 19. Os resultados estão mostrados como valores percentuais de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> observados em culturas submetidas à inibição com AG em relação aos observados em culturas realizadas somente na presença de DAF-2DA. A análise dos dados não demonstrou diferença significativa entre os grupos avaliados.



**Figura 19** – Impacto da inibição *in vitro* com AG na produção intracelular de óxido nítrico por monócitos circulantes em pacientes com nefropatia crônica do enxerto e indivíduos controles saudáveis. Os resultados estão expressos como mediana (barras horizontais) e dispersão dos valores individuais (símbolos) dos percentuais de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> observados em culturas realizadas apenas na presença de DAF-2DA em relação aos observados em culturas submetidas à inibição com AG (▼), ou seja, (DAF-2DA/AG). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados.

### 5.2.2 Análise da produção de óxido nítrico intracelular em neutrófilos circulantes

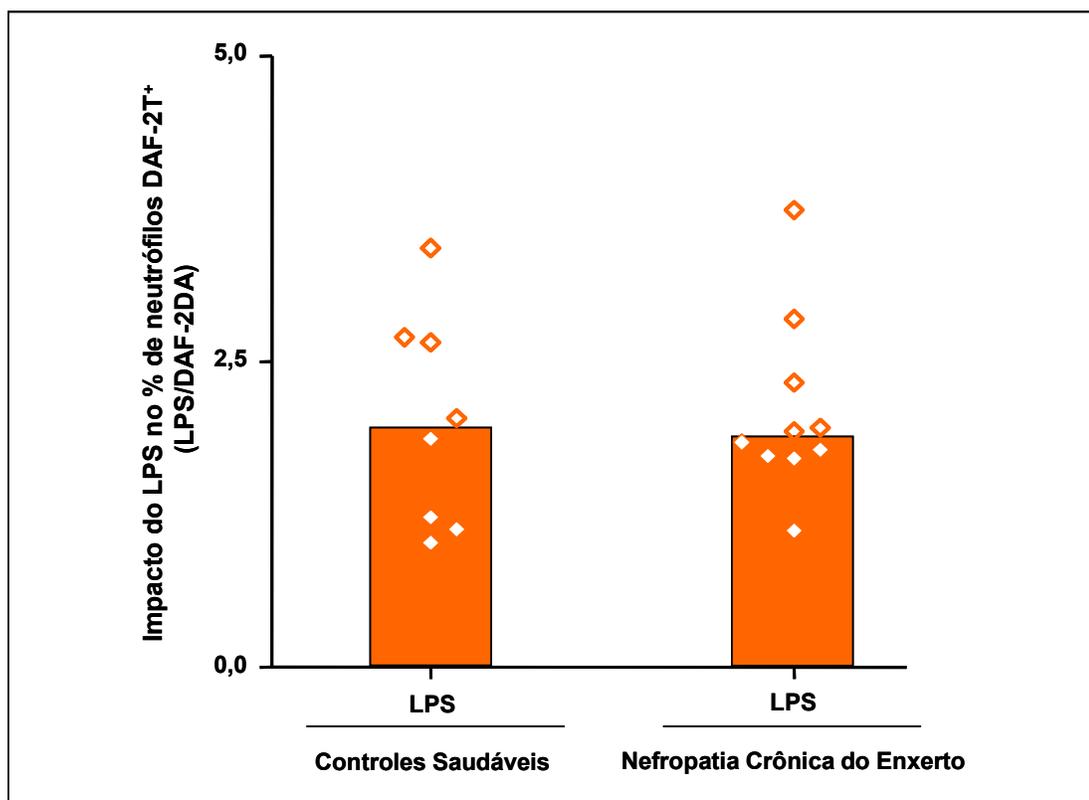
Os resultados da produção de óxido nítrico intracelular em neutrófilos circulantes em pacientes com nefropatia crônica do enxerto bem como em indivíduos controles saudáveis estão mostrados na Figura 20. Os resultados estão mostrados como percentual de neutrófilos DAF-2T<sup>+</sup> em culturas *in vitro* de sangue total realizadas somente na presença de DAF-2DA, bem como em culturas submetidas à estimulação com LPS e à inibição com AG. A análise dos dados demonstrou que no grupo de indivíduos controles saudáveis, o percentual mediano de neutrófilos DAF-2T<sup>+</sup>, observado em culturas estimuladas com LPS diferiu significativamente daqueles observados nas culturas realizadas somente na presença de DAF-2DA bem como daquelas submetidas à inibição com AG. Por outro lado, a análise dos dados no grupo de pacientes com nefropatia crônica do enxerto demonstrou que o percentual de neutrófilos DAF-2T<sup>+</sup> observado nas culturas estimuladas com LPS diferiu significativamente apenas em relação àquelas submetidas à inibição com AG.



**Figura 20** – Produção intracelular de óxido nítrico por neutrófilos circulantes em pacientes com nefropatia crônica do enxerto e indivíduos controles saudáveis. Os resultados estão expressos como mediana (barras horizontais) e dispersão dos valores individuais (símbolos) dos percentuais de neutrófilos DAF-2T<sup>+</sup> observados em culturas realizadas apenas na presença de DAF-2DA (○), bem como em culturas submetidas à estimulação com LPS (△) e à inibição com AG (□). As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelas letras “a” e “c” em relação às culturas realizadas apenas na presença de DAF-2DA e às culturas submetidas à inibição com AG, respectivamente.

Os resultados do impacto da estimulação *in vitro* com LPS na produção de óxido nítrico intracelular em neutrófilos circulantes em pacientes com nefropatia crônica do enxerto, bem como em indivíduos controles saudáveis estão mostrados na Figura 21. Os resultados estão mostrados como valores percentuais de neutrófilos DAF-2T<sup>+</sup> observados em culturas submetidas à estimulação com LPS em relação aos observados em culturas realizadas somente na presença de DAF-2DA. A análise dos

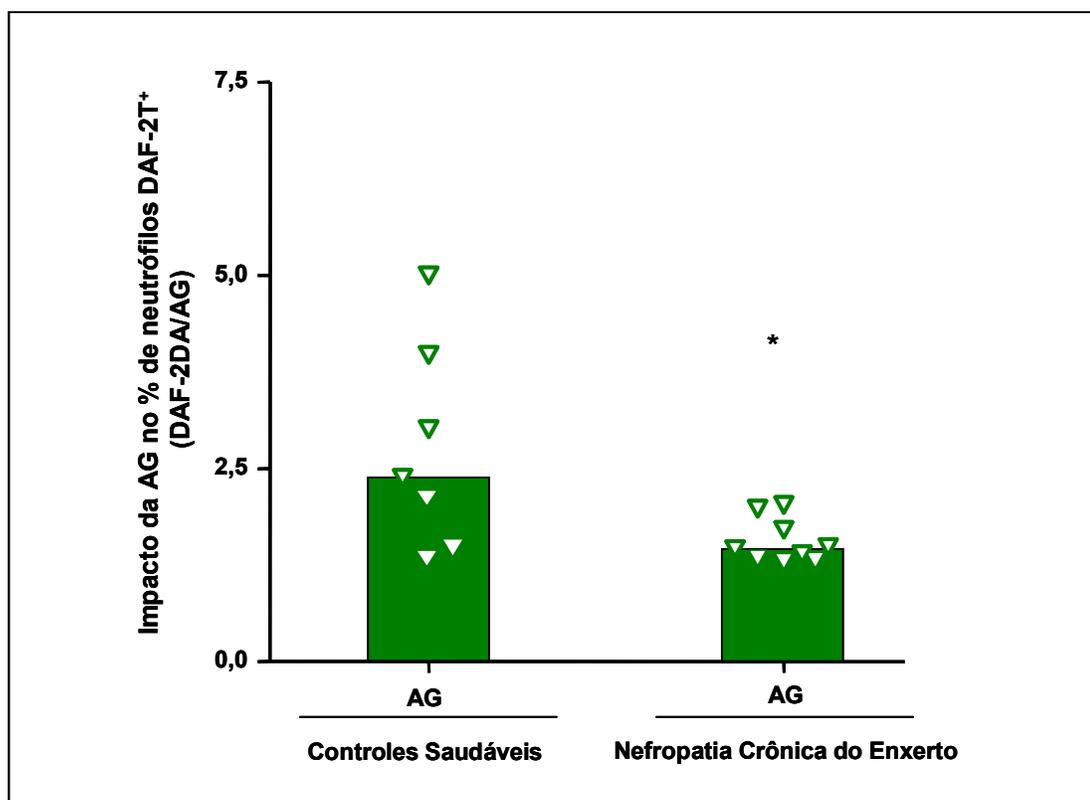
dados não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados.



**Figura 21** – Impacto da estimulação *in vitro* com LPS na produção intracelular de óxido nítrico por neutrófilos circulantes em pacientes com nefropatia crônica do enxerto e indivíduos controles saudáveis. Os resultados estão expressos como mediana (barras horizontais) e dispersão dos valores individuais (símbolos) dos percentuais de neutrófilos DAF-2T<sup>+</sup> observados em culturas submetidas à estimulação com LPS em relação aos observados em culturas realizadas apenas na presença de DAF-2DA (◇), ou seja, (LPS/DAF-2DA). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados.

Os resultados do impacto da inibição *in vitro* com AG na produção de óxido nítrico intracelular em neutrófilos circulantes em pacientes com nefropatia crônica do enxerto, bem como em indivíduos controles saudáveis estão mostrados na Figura 22. Os resultados estão mostrados como valores percentuais de neutrófilos DAF-2T<sup>+</sup>

observados em culturas submetidas à inibição com AG em relação aos observados em culturas realizadas somente na presença de DAF-2DA. A análise dos dados demonstrou que a inibição com AG resultou em menor impacto na produção de óxido nítrico intracelular em neutrófilos do grupo com nefropatia crônica do enxerto em relação ao grupo de indivíduos controles saudáveis (Test T de *Student – one tailed*).



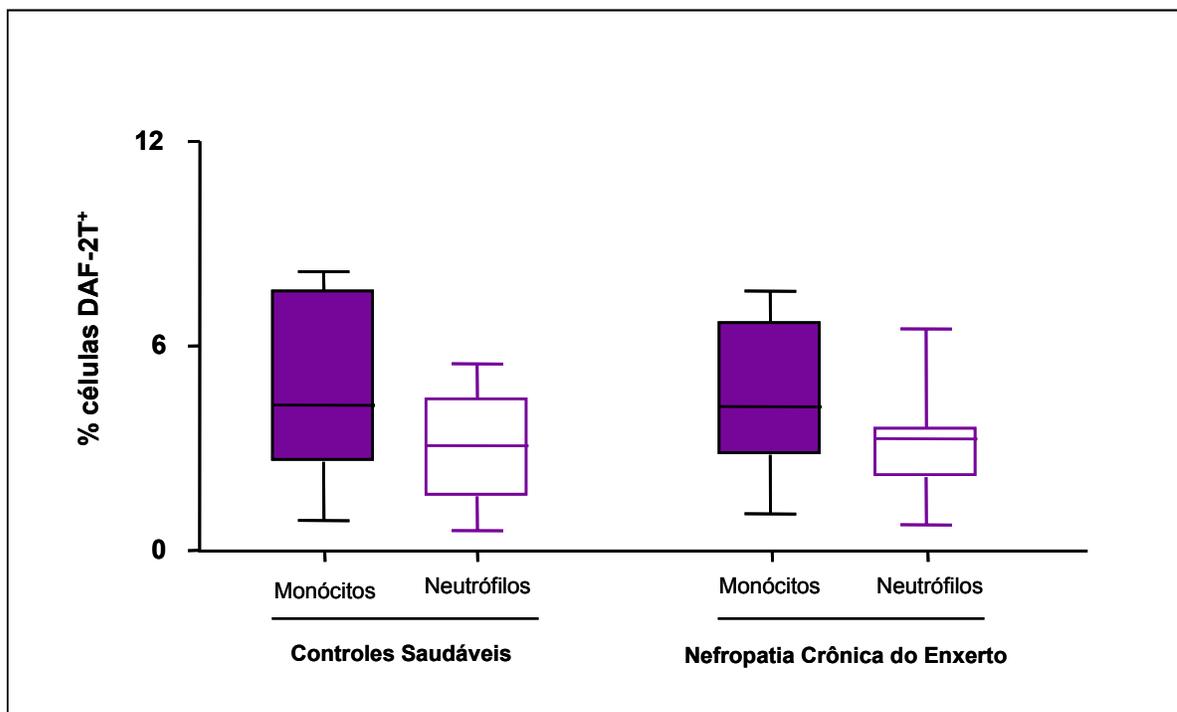
**Figura 22** – Impacto da inibição *in vitro* com AG na produção intracelular de óxido nítrico por neutrófilos circulantes em pacientes com nefropatia crônica do enxerto e indivíduos controles saudáveis. Os resultados estão expressos como média (barras horizontais) e dispersão dos valores individuais (símbolos) dos percentuais de neutrófilos DAF-2T<sup>+</sup> observados em culturas realizadas somente na presença de DAF-2DA em relação aos observados em culturas submetidas à inibição com AG (▽), ou seja, (DAF-2DA/AG). Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) está representada por \* em relação ao grupo de indivíduos controles.

Em conjunto, os dados demonstraram perfis distintos na análise de óxido nítrico intracelular em monócitos e neutrófilos circulantes em pacientes com nefropatia crônica do enxerto em relação ao grupo de indivíduos controles saudáveis.

Essas diferenças ficaram mais evidentes nas análises do impacto diferencial do LPS e da AG sobre monócitos e neutrófilos.

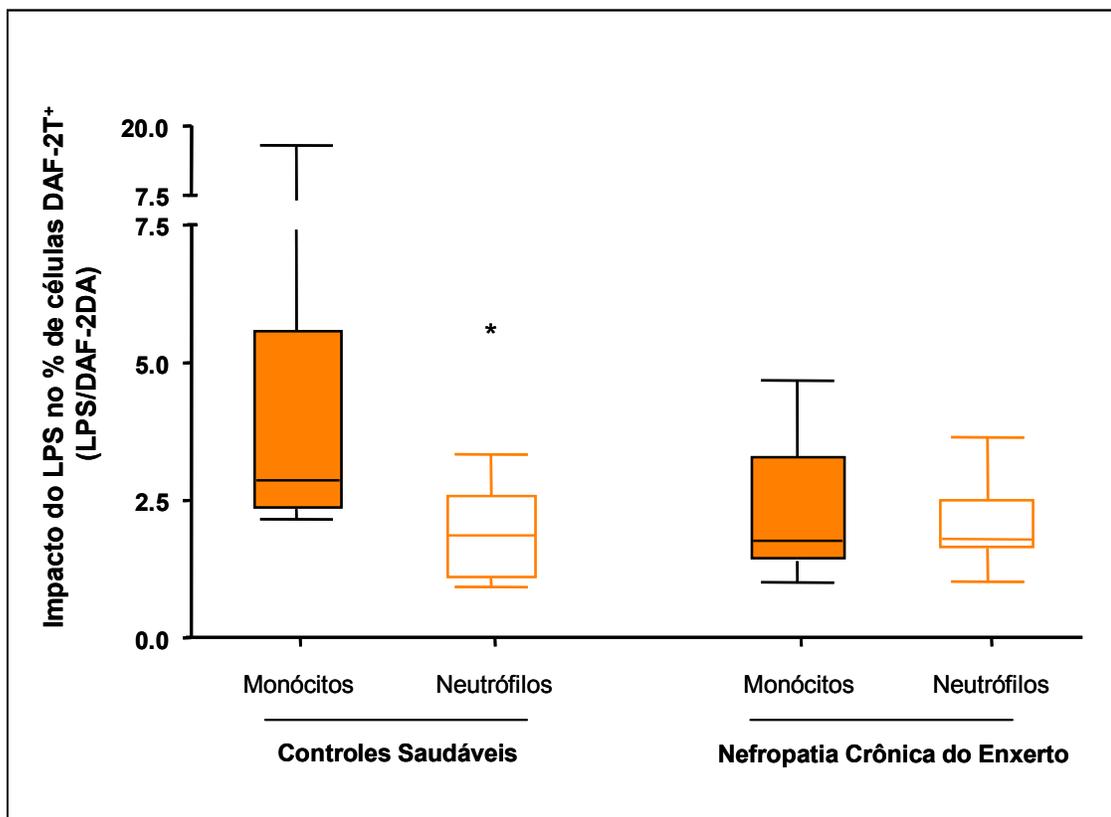
Na tentativa de explicar essas diferenças, análises complementares dos resultados foram realizadas visando avaliar comparativamente os perfis de células DAF-2T<sup>+</sup> na população de monócitos e neutrófilos, bem como o impacto do LPS e da AG nessas duas populações celulares.

Os resultados do perfil basal do percentual de células DAF-2T<sup>+</sup> na população de monócitos e neutrófilos estão representados na Figura 23. A análise dos dados não demonstrou diferenças significativas entre as populações de monócitos e neutrófilos, nos dois grupos avaliados.



**Figura 23** – Produção intracelular de óxido nítrico por monócitos e neutrófilos circulantes em indivíduos controles saudáveis e pacientes com nefropatia crônica do enxerto. Os resultados estão expressos como medianas (barras horizontais) e valores máximos e mínimos dos percentuais de células DAF-2T<sup>+</sup> observados em culturas realizadas apenas na presença de DAF-2DA. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativa entre as populações celulares avaliadas em cada grupo.

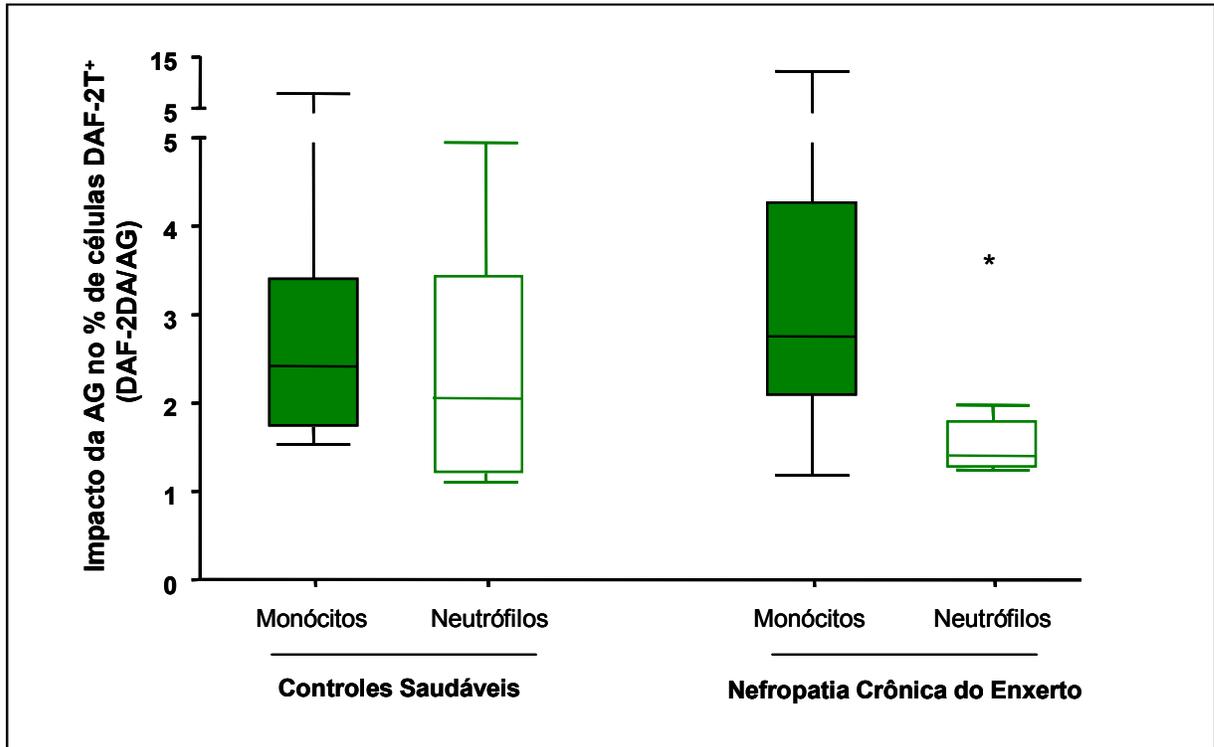
Os resultados do perfil do impacto da estimulação *in vitro* com LPS na produção de óxido nítrico intracelular pelas populações de monócitos e neutrófilos estão representados na Figura 24. A análise dos dados demonstrou que a estimulação com LPS resultou em maior impacto no percentual de células DAF-2T<sup>+</sup> na população de monócitos em relação à população de neutrófilos, seletivamente no grupo de indivíduos controles saudáveis. Nenhuma diferença entre as populações de monócitos e neutrófilos foi observada no grupo de pacientes com nefropatia crônica do enxerto.



**Figura 24** – Impacto da estimulação *in vitro* com LPS na produção intracelular de óxido nítrico por monócitos e neutrófilos circulantes em indivíduos controles saudáveis e pacientes com nefropatia crônica do enxerto. Os resultados estão expressos como medianas (barras horizontais) e valores máximos e mínimos dos percentuais de células DAF-2T<sup>+</sup> observados em culturas submetidas à estimulação com LPS em relação aos observados em culturas realizadas apenas na presença de DAF-2DA, ou seja, impacto do LPS no percentual de células DAF-2T<sup>+</sup> = (LPS/DAF-2DA). Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) do maior impacto do LPS no percentual de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> em relação ao percentual de neutrófilos, seletivamente no grupo de indivíduos controles saudáveis, está representada por \*.

Os resultados do perfil do impacto da inibição *in vitro* com AG na produção de óxido nítrico intracelular pelas populações de monócitos e neutrófilos estão representados na Figura 25. A análise dos dados demonstrou que a inibição com AG resultou em menor impacto no percentual de células DAF-2T<sup>+</sup> na população de neutrófilos em relação à população de monócitos, seletivamente no grupo de pacientes com nefropatia crônica

do enxerto. Nenhuma diferença entre as populações de monócitos e neutrófilos foi observada no grupo de indivíduos controles saudáveis.



**Figura 25** – Impacto da inibição *in vitro* com AG na produção intracelular de óxido nítrico por monócitos e neutrófilos circulantes em indivíduos controles saudáveis e pacientes com nefropatia crônica do enxerto. Os resultados estão expressos como medianas (barras horizontais) e valores máximos e mínimos dos percentuais de células DAF-2T<sup>+</sup> observados em culturas realizadas apenas na presença de DAF-2DA em relação aos observados em culturas submetidas à inibição com AG, ou seja, impacto da AG no percentual de células DAF-2T<sup>+</sup> = (DAF-2DA/AG). Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) do menor impacto da AG no percentual de neutrófilos DAF-2T<sup>+</sup> em relação ao percentual de monócitos, seletivamente no grupo de pacientes com NCE, está representada por \*.

## 6 DISCUSSÃO

## 6 DISCUSSÃO

O NO constitui uma importante molécula reguladora do sistema imune e mediador citotóxico de células imunes efectoras ativadas. A determinação direta de NO em amostras biológicas constitui um desafio principalmente devido à sua ínfima meia-vida e concentração. Dessa forma, diversas metodologias indiretas, baseadas em ensaios que reflitam sua presença, têm sido freqüentemente utilizadas para avaliar sua produção.

A determinação direta do NO por citometria de fluxo foi recentemente proposta e baseia-se na capacidade do NO de oxidar o reagente 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2), que não é fluorescente para uma forma fluorescente. Neste estudo foram otimizadas as condições para avaliação da produção de NO intracelular em monócitos e neutrófilos circulantes.

Para a definição do melhor protocolo, várias tentativas foram feitas em diversas fases do processo. Para a escolha do pré-tratamento das amostras de sangue total, avaliou-se inicialmente a utilização do creme leucocitário, pois as metodologias descritas na literatura de determinação de NO utilizando o DAF-2DA utilizavam culturas de células de outros tecidos purificadas. Entretanto, os perfis imunofenotípico e morfométrico de leucócitos obtidos com a utilização do creme leucocitário mostraram-se inadequados. Dessa forma, o protocolo utilizando sangue total isento de plasma foi o escolhido por apresentar melhores perfis imunofenotípico e morfométrico de leucócitos, como demonstrado na Figura 10.

A definição da concentração ideal de DAF-2DA foi obtida com base em dois parâmetros; o percentual de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> e a análise dos perfis morfométricos e imunofenotípicos dos leucócitos nas diferentes concentrações avaliadas. Embora o maior percentual de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> tenha sido observado com a utilização de DAF-2DA na concentração final de 4,0 $\mu$ M, essa concentração promoveu uma distorção no perfil imunofenotípico dos leucócitos, o que não foi observado com a utilização de DAF-2DA na concentração final de 2,0 $\mu$ M, como demonstrado na Figura 11. Dessa forma, a concentração de 2,0 $\mu$ M mostrou-se a mais adequada.

Para a definição do melhor tempo de incubação com DAF-2DA, avaliou-se a magnitude do aumento de percentual de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> em função do tempo de incubação com DAF-2DA. O aumento do tempo de incubação com DAF-2DA de 120 pra 180 minutos promoveu um aumento no percentual de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> de duas vezes, enquanto o incremento do tempo de incubação com DAF-2DA de 180 pra 240 minutos promoveu um aumento no percentual de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> de apenas 1,4 vezes, como demonstrado na Figura 12. Assim, optou-se pelo tempo de 180 minutos.

Para a escolha do melhor indutor da produção de NO intracelular em monócitos, dois parâmetros foram avaliados; o impacto no percentual de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> e a análise dos perfis morfométricos e imunofenotípicos dos leucócitos na presença de diferentes substâncias indutoras. Embora o maior impacto no percentual de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> tenha sido observado com a utilização de PMA+ionomicina, a utilização desses indutores promoveu uma distorção no perfil imunofenotípico dos leucócitos, o que não

foi observado com a utilização do LPS, como demonstrado na Figura 13. Assim, ficou definida a utilização do LPS como indutor da produção de NO intracelular neste estudo.

Para a escolha do melhor inibidor da produção de NO intracelular em monócitos, avaliou-se o impacto no percentual de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> na presença de L-NAME e de AG. Embora o L-NAME seja o inibidor da NOS mais freqüentemente utilizado, neste estudo o maior impacto no percentual de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> foi observado com a utilização da AG, como demonstrado na Figura 14. Apesar de não ter sido observada diferença estatisticamente significativa entre o percentual de monócitos e neutrófilos DAF-2T<sup>+</sup> na presença de AG e apenas na presença de DAF-2DA nos dois grupos avaliados (Figuras 17 e 20), a mediana do impacto da utilização da AG no percentual de células DAF-2T<sup>+</sup> foi superior a 50% em monócitos e neutrófilos de indivíduos controles saudáveis e em monócitos de pacientes com NCE (Figuras 19 e 22).

Para definir o melhor protocolo de imunofenotipagem para a análise do perfil de produção de NO em neutrófilos, considerou-se a separação das populações leucocitárias promovida por diferentes anticorpos. Embora a utilização do anticorpo monoclonal anti-CD14 TC tenha se mostrado adequada para a seleção da população de monócitos e análise da produção do NO nestas células, este anticorpo não permitiu uma boa segregação dos neutrófilos em relação aos eosinófilos, como demonstrado na Figura 15. Dessa forma o uso do anticorpo monoclonal anti-CD16 TC foi incorporado ao protocolo.

Uma vez otimizadas as condições experimentais, realizou-se a determinação do perfil de produção de NO intracelular em monócitos e neutrófilos de 11 pacientes com NCE e 10 indivíduos controles saudáveis, utilizando-se sangue total isento de plasma como amostra.

A literatura revela um aumento da produção de NO na rejeição renal aguda. Um estudo anterior realizado no Laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFMG, onde o NO foi avaliado indiretamente, pela determinação de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_2^-$  plasmáticos (Reação de Griess) e expresso pela relação  $\text{NO}_2^-/\text{creatinina}$ , revelou um aumento do NO na rejeição renal aguda. Nos pacientes com NCE, este aumento não foi observado (Silva, 2004). Embora não tenha sido obtido um aumento de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_2^-$  plasmáticos em pacientes com NCE, no presente estudo optou-se por avaliar a produção de NO em pacientes com NCE, devido a dificuldade de obtenção de pacientes com rejeição renal aguda. Atualmente, os modernos esquemas imunossupressores utilizados previnem a ocorrência da rejeição aguda. Além disso, havia a expectativa de que o uso de uma metodologia mais sensível que a Reação de Griess, como a citometria de fluxo, pudesse revelar um aumento da produção de NO em pacientes com NCE.

Outros relatos da literatura confirmam o aumento da síntese de NO em pacientes com rejeição renal aguda (Albrecht *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2004). Albrecht *et al.* (2000) relataram um aumento da expressão da iNOS e uma diminuição da expressão da eNOS em pacientes com rejeição renal aguda. Em pacientes transplantados cardíacos também foi obtido um aumento da produção de NO no processo de rejeição aguda (Benvenuti *et al.*, 1996).

Em modelo animal, utilizando-se ratos, foi demonstrado um aumento da iNOS no rim transplantado (avaliada por *Western-blot*) e um aumento de NO (avaliado pela determinação de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_2^-$  plasmáticos), a partir do quarto dia após o transplante, sugerindo o início do processo de rejeição aguda (Suzuki et.al., 2004).

Em 2005, Ouyang *et al.* mostraram que o uso de um inibidor específico da iNOS (FR260330) foi capaz de prevenir a ocorrência de rejeição crônica da aorta em ratos, evidenciando o papel do NO proveniente da iNOS neste tipo de rejeição.

Segundo Vos *et al.* (2004), o NO derivado da iNOS está relacionado com a ocorrência de rejeição dos enxertos, enquanto o NO derivado da cNOS parece proteger o órgão transplantado.

Albrecht *et al.* (2002) mostraram que, assim como na rejeição aguda, durante a falência crônica do rim transplantado ocorre um aumento da expressão da iNOS no interstício e uma redução da expressão glomerular da eNOS, associados ao aumento da formação de espécies reativas do oxigênio (ROS).

Relatos na literatura sugerem que um mecanismo de ação dos imunossupressores é a inibição da iNOS, com a conseqüente diminuição da produção de NO. Kaibori *et al.* (1999) sugeriram que o tacrolimus inibiu a expressão do RNAm para iNOS em cultura de hepatócitos de ratos, quando essas células foram estimuladas pela citocina inflamatória IL-1 $\beta$ . No entanto, este efeito não foi observado com o uso da ciclosporina.

Contrariando este achado, Attur *et al.* (2000) demonstraram que a ciclosporina e a rapamicina, inibiram a expressão do RNAm para iNOS em cultura de macrófagos, após a estimulação imunológica com lipopolissacáride bacteriano, o que não foi observado com o uso do tacrolimus.

Lessio *et al.* (2005) também demonstraram que a ciclosporina inibiu a expressão de iNOS de células da artéria renal de ratos, sugerindo que a redução da NO poderia estar relacionada a nefrotoxicidade da ciclosporina.

Tuñón *et al.* (2003) demonstraram que tacrolimus e a rapamicina inibiram a produção de NO e a expressão do RNAm para iNOS em cultura *in vitro* de hepatócitos de rato, estimuladas com LPS.

Sabe-se que o micofenolato mofetil é capaz de inibir a síntese de NO *in vitro*. Lui *et al.* (2001), em um experimento com camundongos, concluíram que o micofenolato mofetil foi capaz de reduzir *in vivo* a expressão do RNAm para iNOS e a produção de NO no rim, sob condições isquêmicas.

O presente estudo não revelou um aumento da produção de NO por monócitos e neutrófilos circulantes em pacientes com NCE em relação aos controles saudáveis, como demonstrado nas Figuras 17, 20 e 23. Uma justificativa para esse resultado é o uso de imunossupressores por todos os pacientes do grupo NCE. Sabe-se que os imunossupressores são capazes de inibir a síntese de NO, principalmente pela inibição da expressão da iNOS.

Outro dado relevante observado neste estudo, foi o menor impacto do LPS no percentual de monócitos DAF-2T<sup>+</sup> no grupo NCE em relação ao grupo controle saudável, como mostrado na Figura 18. Esse menor impacto do LPS não foi observado em neutrófilos de pacientes com NCE (Figura 21). Esse dado sugere que o uso de imunossupressores reduz a resposta de monócitos, mas não de neutrófilos à estimulação com LPS. Uma possível explicação para esse fenômeno poderia ser a menor expressão constitutiva de CD14 pela população de neutrófilos em relação à população de monócitos. Sabe-se que a indução da produção de óxido nítrico pelo LPS é mediada pela interação do LPS com o complexo CD14/TLR-4 (GANGLOFF *et al.*, 2005). Isso poderia justificar a menor indução de produção de óxido nítrico mediada por LPS na população de neutrófilos e conseqüentemente o perfil diferenciado do impacto do LPS na produção de NO em monócitos e neutrófilos. Os resultados da Figura 24 corroboram com essa hipótese, demonstrando que na presença de LPS, ocorre um maior impacto no percentual de células DAF-2T<sup>+</sup> na população de monócitos em relação aos neutrófilos seletivamente no grupo de indivíduos controles saudáveis.

Em relação ao impacto da AG no percentual de células DAF-2T<sup>+</sup>, os dados sugerem que no microambiente de imunossupressão os neutrófilos tornam-se mais refratários à inibição por AG (Figura 22). Na tentativa de explicar esse fenômeno foi proposta uma hipótese que diferenças na produção basal de NO por monócitos e neutrófilos nos dois grupos avaliados poderiam justificar essa refratariedade. Entretanto, os resultados apresentados na Figura 23 não suportam essa hipótese. Uma possibilidade seria que indivíduos submetidos à imunossupressão poderiam apresentar perfis distintos de expressão de isoformas da NOS em neutrófilos e monócitos. Nesse contexto, uma outra

hipótese a ser investigada seria que neutrófilos de pacientes com nefropatia crônica do enxerto apresentariam perfil distinto de isoformas de NOS, com menor contribuição da iNOS nos neutrófilos em relação aos monócitos. Os resultados da Figura 25 corroboram com essa hipótese, demonstrando que na presença de AG, um inibidor seletivo da iNOS, há um menor impacto no percentual de células DAF-2T<sup>+</sup> na população de neutrófilos em relação aos monócitos seletivamente no grupo NCE. Estudos complementares tornam-se necessários para investigar essa hipótese.

A NCE resulta da associação de causas imunológicas (rejeição) e não imunológicas (ZHANG *et al.*, 2003). Os antígenos do enxerto promovem a ativação do sistema imune. Entretanto, fatores independentes dos aloantígenos, como a causa da morte do doador ou tempo de isquemia e reperfusão do rim, podem ativar ou amplificar a resposta imune pela produção de espécies reativas de oxigênio, mediadores pró-inflamatórios e fatores de crescimento, o que pode resultar na apoptose das células do epitélio tubular renal (JOOSTEN *et al.*, 2003).

Diversos fatores estão associados ao processo NCE, como episódios repetidos de rejeição aguda, diferenças de histocompatibilidade entre doador e receptor, idade e morte cerebral do doador, nefrotoxicidade induzida por drogas (principalmente a ciclosporina), tempo de isquemia e reperfusão, função retardada do enxerto, hipertensão, hiperlipidemia, infecções bacterianas e por citomegalovírus (PAUL, 1999; KRIEGER *et al.* 2003). Histologicamente a NCE manifesta-se por uma oclusão vascular progressiva, uma variedade de lesões glomerulares (como glomeruloesclerose e hipertrofia), aterosclerose, com hiperplasia da camada íntima vascular de artérias e

arteríolas, fibrose intersticial acompanhada de atrofia tubular e infiltração inflamatória moderada de macrófagos e linfócitos na parede vascular (PAUL, 1999; RACUSEN *et al.*, 1999; KRIEGER *et al.*, 2003).

O reconhecimento do aloantígeno pelo linfócito T constitui o evento central que inicia o processo de rejeição ao órgão. Existem duas vias distintas de reconhecimento do aloantígeno: via direta e via indireta. Na via direta ocorre o reconhecimento do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) da superfície das células do doador pelas células T. Na via indireta, os aloantígenos são processados e apresentados pelas células apresentadoras de antígeno (APC) e posteriormente reconhecidos pelas células T. A participação dessas duas vias no início do processo de rejeição está bem estabelecida, já a contribuição de ambas na fase mais tardia do processo não está bem definida. Acredita-se que a rejeição aguda seja mediada principalmente pela via direta e a NCE pela via indireta (GALLON *et al.*, 1995; LEMOS *et al.*, 1999).

Os linfócitos T CD4 (auxiliares ou *helper*) possuem um papel importante na regulação da resposta imune pela interação com as APCs, linfócitos T citotóxicos, macrófagos e linfócitos B. Os linfócitos T auxiliares podem ser subdivididos em Th1 e Th2 de acordo com o perfil de citocinas produzidas pelos mesmos. Os linfócitos Th1 participam da resposta de hipersensibilidade tardia e da atividade citotóxica. Os linfócitos Th2 auxiliam na resposta dos linfócitos B. A rejeição celular aguda é uma resposta imune mediada por linfócitos Th1. Na NCE, o papel das células Th1 e Th2 ainda não está bem estabelecido (LEMOS *et al.*, 1999).

Outro dado relevante para a análise dos resultados obtidos neste estudo, é o uso de glicocorticóides pelos pacientes com NCE. Os glicocorticóides, como a prednisona e a prednisolona, são reguladores da transcrição gênica e estão presentes na maioria dos regimes imunossupressores. Os glicocorticóides inibem a proliferação das células T, a imunidade dependente de células T e a expressão dos genes que codificam citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ). Além disso, os glicocorticóides possuem ação antiinflamatória, sendo capazes de inibir a iNOS (THOMPSON, 2003). Esta inibição poderia explicar porque, apesar da NCE ser um processo associado à inflamação, não foi observado um aumento na produção de NO pelos monócitos e neutrófilos do sangue periférico nesta condição.

Concluindo, a metodologia otimizada neste estudo permitiu a análise do perfil de produção de NO intracelular em monócitos e neutrófilos circulantes em pacientes com NCE. Em processos patológicos, nos quais a participação de monócitos e neutrófilos é importante e o NO possui ação citotóxica e citostática (processos inflamatórios/imunológicos), certamente a aplicação da citometria de fluxo para avaliar a produção intracelular de NO será de grande valor.

## **7 CONCLUSÕES**

## 7 CONCLUSÕES

Após a realização do presente estudo pode-se concluir:

- ✓ O reagente DAF-2DA permite a análise por citometria de fluxo da produção de óxido nítrico intracelular em monócitos e neutrófilos, empregando amostras de sangue total.
- ✓ A produção de óxido nítrico em monócitos e neutrófilos circulantes em pacientes com nefropatia crônica do enxerto provavelmente encontra-se suprimida pela ação de imunossupressores.
- ✓ O impacto do LPS no percentual de células DAF-2T<sup>+</sup> é maior na população de monócitos em relação aos neutrófilos seletivamente no grupo de indivíduos controles saudáveis.
- ✓ É possível a utilização da citometria de fluxo para determinar o perfil de produção de óxido nítrico intracelular em monócitos e neutrófilos circulantes em processos inflamatórios/ imunológicos onde ocorre a participação dessas células.

## 8 PERSPECTIVAS

## **8 PERSPECTIVAS**

Avaliar o potencial da determinação de óxido nítrico intracelular em monócitos e neutrófilos circulantes como método auxiliar para monitoração de estados inflamatórios/ imunológicos, como processos infecciosos e tumorais.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRECHT, E. W.; VAN GOOR, H.; TIEBOSCH, A. T.; MOSHAGE, H.; TEGZESS, A. M.; STEGEMAN, C. A. Nitric oxide production and nitric oxide synthase expression in acute human renal allograft rejection. *Transplantation*, v. 70, n. 11, p. 1610-1616, 2000.

ALBRECHT, E. W.; STEGEMAN, C. A.; TIEBOSCH, A. T.; TEGZESS, A. M.; VAN GOOR, H. Expression of inducible and endothelial nitric oxide synthases, formation of peroxynitrite and reactive oxygen species in human chronic renal transplant failure. *American Journal of Transplantation*, v. 2, n. 5, p. 448-453, 2002.

AQUINO-DIAS, E. C.; JOELSONS, G.; SILVA, D. M.; BERDISCEWSKI, R. H.; RIBEIRO, A. R.; VERONOSE, F. J.; GONÇALVES, L. F.; MANFRO, R. C. Non-invasive diagnosis of acute rejection in kidney transplants with delayed graft function. *Kidney International*, v. 23, p. [Epub ahead of print], 2008.

ARCHER, S. Measurement of nitric oxide in biological models. *The FASEB Journal*, v. 7, n. 2, p. 349-360, 1993.

ATTUR, M. G.; PATEL, R.; THAKKER, G.; VYAS, P.; LEVARTOVSKY, D.; PATEL, P.; NAGVI, S.; RAZA, R.; PATEL, K.; ABRAMSON, D.; BRUNO, G.; ABRAMSON, S. B.; AMIM, A. R. Differential anti-inflammatory effects of immunosuppressive drugs: cyclosporin, rapamycin and FK-506 on inducible nitric oxide synthase, nitric oxide, cyclooxygenase-2 and PGE2 production. *Inflammation Research*, v. 49, n. 1, p. 20-26, 2000.

BACAL, N. S.; FAULHABER, M. H. W. Aplicação prática em citometria de fluxo. 1. ed. São Paulo: Ateneu, 2003. 90 p.

BARRETO, R. L.; CORREIA, C. R. D.; MUSCARÁ, M. N. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. *Química Nova*, v. 28, n. 6, p. 1046-1054, 2005.

BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *The American Journal of Physiology*, v. 271, p. 1424-1437, 1996.

BENVENUTI, C.; BORIES, P. N.; LOISANCE, D. Increased serum nitrate concentration in cardiac transplant patients. A marker for acute allograft cellular rejection. *Transplantation*, v. 61, n. 5, p. 745-749, 1996.

BURNETT, A. L. Molecular pharmacotherapeutic targeting of PDE5 for preservation of penile health running head: PDE5 targeting to preserve penile health. *Journal of Andrology*, v. 17, p. 1-43, 2007.

BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 86, n. 22, p. 9031-9033, 1989.

BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 87, n. 2, p. 682-685, 1990.

BRENNER, B. M.; RECTOR, F. C. *The Kidney*, W.B.Saunders Company, Philadelphia, USA. 4ª ed, 1991.

CALABRESE, V.; MANCUSO, C.; CALVANI, M.; RIZZARELLI, E.; BUTTERFIELD, D. A.; STELLA, A. M. G. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nature*, v. 8, p. 766-775, 2007.

DEGUCHI, T. Endogenous activating factor for guanylate cyclase in synaptosomal-soluble fraction of rat brain. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 252, n. 21, p. 7617-7619, 1977.

DEGUCHI, T.; YOSHIOKA, M. L-arginine identified as an endogenous activator for soluble guanylate cyclase from neuroblastoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 257, n. 17, p. 10147-10151, 1982.

DINU, V.; GILCA, M. Nitric oxide: a signaling and killer molecule. *Revue Roumaine de Biochimie*, v. 31, n. 4, p.289-302, 1994.

FERRENDELLI, J. A.; CHANG, M. M.; KINSCHERF, D. A. Elevation of cyclic GMP levels in central nervous system by excitatory and inhibitory amino acids. *Journal of Neurochemistry*, v. 22, n. 4, p. 535-540, 1974.

FILHO, R. F.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000.

FISHER, J. S.; WOODLE, E. S.; THISTLETHWAITE, J. R. Kidney transplantation: graft monitoring and immunosuppression. *World Journal of Surgery*, v. 26, n. 2, p. 185-193, 2002.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. the obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288, p. 373-376, 1980.

GALLON, L.; WATSCHINGER, B.; MURPHY, B.; AKALIN, E.; SAYEGH, M. H.; CARPENTER, C. B. The indirect pathway of allorecognition. The occurrence of self-restricted T cell recognition of allo-MHC peptides early in acute renal allograft rejection and its inhibition by conventional immunosuppression. *Transplantation*, v. 59, n. 4, p. 612-616, 1995.

GANGLOFF, S. C.; ZÄHRINGER, U.; BLONDIN, C.; GUENOUNOU, M.; SILVER, J.; GOYERT, S. M. Influence of CD14 on ligand interactions between lipopolysaccharide and its receptor complex. *The Journal of Immunology*, v. 175, n. 6, p. 3940-3945, 2005.

GARTHWAITE, J.; CHARLES, S. L.; CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature*, v. 336, n. 6197, p. 385-388, 1988.

GARTHWAITE, J.; GARTHWAITE, G.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology*, v. 172, n. 4-5, p. 413-416, 1989.

GORREN, A. C. F.; MAYER, B. Nitric oxide synthase: a cytochrome P450 family foster child. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1770, n. 3, p. 432-445, 2007.

GRASER, T.; VANHOUTTE, P. M. Hypoxic concentration of canine coronary arteries: role of endothelium and cGMP. *American Journal of Physiology*, V. 261, p. H1769-1777, 1991.

GREEN, L. C.; TANNENBAUM, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Science*, v. 212, n. 3, p. 56-58, 1981.

GREEN, L. C.; LUZURIAGA, K. R.; WAGNER, D. A.; RAND, W.; ISTFAN, N.; YOUNG, V. R.; TANNENBAUM, S. R. Nitrate biosynthesis in man. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 78, n. 12, p. 7764-7768, 1981.

GUIX, F. X.; URIBESALGO, I.; COMA, M.; MUNOZ, F. J. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Progress in Neurobiology*, v. 76, n. 2, p. 126-152, 2005.

GUZIK, T. J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 54, n. 4, p. 469-487, 2003.

HAVENGA, M. J.; VAN DAM, B.; GROOT, B. S.; GRIMBERGEN, J. M.; VALERIO, D.; BOUT, A.; QUAX, P. H. Simultaneous detection of NOS-3 protein expression and nitric oxide production using a flow cytometer. *Analytical Biochemistry*, v. 290, n. 2, p. 283-291, 2001.

HEGESH, E.; SHILOAH, J. Blood nitrates and infantile methemoglobinemia. *Clinica Chimica Acta*, v. 125, n. 2, p. 107-115, 1982.

HIBBS Jr, J. B.; VAVRIN, Z.; TAINTOR, R. R. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *The Journal of Immunology*, v. 138, n. 2, p. 550-565, 1987.

HIBBS Jr, J. B.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z.; RACHLIN, E. M. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 157, n. 1, p. 87-94, 1988.

HU, H.; DALESKOG, M.; LI, N. Influences of fixatives on flow cytometric measurements of platelet P-selectin expression and fibrinogen binding. *Thrombosis Research*, v. 100, n. 3, p. 161-166, 2000.

IGNARRO, L. J.; BYRNS, R. E.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circulation Research*, v. 61, n. 6, p. 866-879, 1987.

IYENGAR, R.; STUEHR, D. J.; MARLETTA, M. A. Macrophage synthesis of nitrit, nitrate, and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 84, n. 18, p. 6369-6373, 1987.

JAMES, S. L. Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiological Reviews*, v. 59, n. 4, p. 533-547, 1995.

JAROSZESKI, M. J.; RADCLIFF, G. Fundamentals of flow cytometry. *Molecular Biotechnology*, v. 11, n. 1, p. 37-53, 1999.

JOOSTEN, S. A.; VAN KOOTEN, C.; PAUL, L. C. Pathogenesis of chronic allograft rejection. *Transplant International*, v. 16, n. 3, p. 137-145, 2003.

KAIBORI, M.; OKUMURA, T.; ITO, S.; ODA, M.; INOUE, T.; KAMIYAMA, Y. Inhibition of iNOS induction by FK506, but not by cyclosporine, in rat hepatocytes. *Transplantation Proceedings*, v. 31, n. 1-2, p. 804-805, 1999.

KASHEM, A.; ENDOH, M.; YANO, N.; YAMAUCHI, F.; NOMOTO, Y.; SAKAI, H. Expression of inducible-NOS in human glomerulonephritis: the possible source is infiltrating monocytes/macrophages. *Kidney International*, v. 50, n. 2, p. 392-399, 1996.

KATSUKI, S.; ARNOLD, W.; MITTAL, C.; MURAD, F. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *Journal of Cyclic Nucleotide Research*, v. 3, n. 1, p. 23-35, 1977.

KIECHLE, F. L.; MALINSKI, T. Nitric oxide. Biochemistry, pathophysiology, and detection. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 100, n. 5, p. 567-575, 1993.

KNOWLES, R. G.; PALACIOS, M.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: A transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 86, n. 13, p. 5159-5162, 1989.

KOJIMA, H.; SAKURAI, K.; KIKUCHI, K.; KAWAHARA, S.; KIRINO, Y.; NAGOSHI, H.; HIRATA, Y.; NAGANO, T. Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based

on the fluorescein chromophore. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 46, n. 2, p. 373-375, 1998.

KOYAMA, I.; NEMOTO, K.; WATANABE, T.; SHINOZUKA, N.; OGAWA, N.; NAGASHIMA, N.; OMOTO, R. Serum nitric oxide level as a prognostic parameter for chronic rejection after renal transplantation. *Transplantation Proceedings*, v. 32, n. 7, p. 1789-1790, 2000.

KRENSKY, A. M. Immunologic tolerance. *Pediatric Nephrology*, v. 16, n. 8, p. 675-679, 2001.

KRIEGER, N. R.; BECKER, B. N.; HEISEY, D. M.; VOSS, B. J.; D'ALESSANDRO, A. M.; BECKER, Y. T.; ODORICO, J. S.; KALAYOGLU, M.; PIRSCH, J. D.; SOLLINGER, H. W.; KNECHTLE, S. J. Chronic allograft nephropathy uniformly affects recipients of cadaveric, nonidentical living-related, and living-unrelated grafts. *Transplantation*, v. 75, n. 10, p. 1677-1682, 2003.

LEMOS, F. B. C.; DAVID-NETO, E.; AZEVEDO, L. S. F. Revisão/Atualização em transplante renal: nefropatia crônica do transplante. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v. 21, n. 2, p. 85-90, 1999.

LESSIO, C.; SILVA, F. A.; GLÓRIA, M. A.; DI TOMMASO, A. B.; MOURO, M. G.; DI MARCO, G. S.; SCHOR, N.; HIGA, E. M. Cyclosporine A and NAC on the inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide synthesis in rat renal artery cultured cells. *Kidney International*, v. 68, n. 6, p. 2508-2516, 2005.

LU, Y. P.; FAN, T. W.; TANG, X. D.; YANG, Y. R. Experimental study of the role of nitric oxide in acute renal allograft rejection. *Transplantation Proceedings*, v. 31, n. 1-2, p. 317-318, 1999.

LUI, S. L.; CHAN, L. Y.; ZHANG, X. H.; ZHU, W.; CHAN, T. M.; FUNG, P. C.; LAI, K. N. Effect of mycophenolate mofetil on nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase gene expression during renal ischaemia-reperfusion injury. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v. 16, n. 8, p. 1577-1582, 2001.

MANZANO, A. M. C.; BUENROSTRO, L. E. M.; ESPINOZA, L. G.; TABLEROS, N. G.; DEL CAMPO, F. M.; ROTTER, R. C.; VALERA, I.; ALBERU, J. Markers of inflammation before and after renal transplantation. *Transplantation*, v. 80, n. 1, p. 47-51, 2005.

MARLETTA, M. A.; YOON, P. S.; IYENGAR, R.; LEAF, C. D.; WISHNOK, J. S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry*, v. 27, n. 24, p. 8706-8711, 1988.

MIKI, N.; KAWABE, Y.; KURIVAMA, K. Activation of cerebral guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 75, n. 4, p. 851-856, 1977.

MONCADA, S.; RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M. Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochemical Pharmacology*, v. 37, n. 13, p. 2495-2501, 1988.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacology Reviews*, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MONCADA, S.; HIGGS, A.; FURCHGOT, R. International union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research. *Pharmacological Reviews*, v. 49, n. 2, p. 137-142, 1997.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *British Journal of Pharmacology*, v. 147, n. 1, p. S193-S201, 2006.

MORRIS, S. M.; BILLIAR, T. R. New insights into regulation of inducible nitric oxide synthesis. *The American Journal of Physiology*, n. 266: p. 829-839, 1994.

MORRISSEY, J. J.; McCracken, R.; KANETO, H.; VEHASKARI, M.; MONTANI, D.; KLAHR, S. Location of an inducible nitric oxide synthase mRNA in the normal kidney. *Kidney International*, v. 45, n. 4, p. 998-1005, 1994.

NEVES, G.; RATES, S. M. k.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Agentes dopaminérgicos e o tratamento da disfunção erétil. *Química Nova*, v. 27, n. 6, p. 949-957, 2004.

OUYANG, J.; XU, D.; ZHANG, X.; QI, S.; MA, A.; JIANG, W.; CHIDA, N.; SUDO, Y.; TAMURA, K.; DALOZE, P.; CHEN, H. Effect of a novel inducible nitric oxide synthase inhibitor in prevention of rat chronic aortic rejections. *Transplantation*, v. 79, n. 10, p. 1386-1392, 2005.

PALMER, R. M. J.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, v. 327, p. 524-526, 1987.

PALMER, R. M. J.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, v. 333, n. 6174, p. 664-666, 1988.

PARRATT, J. R. Nitric oxide. A key mediator in sepsis and endotoxaemia? *Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 48, n. 4, p. 493-506, 1997.

PAUL, L.C. Chronic allograft nephropathy: An update. *Kidney International*, v. 56, p. 783-793, 1999.

PEARSON, P. J.; VANHOUTTE, P. M. Vasodilator and vasoconstrictor substances produced by the endothelium. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, v. 122, p. 1-67, 1993.

RACUSEN, L. C.; SOLEZ, K.; COLVIN, R. B.; BONSB, S. M.; CASTRO, M. C.; CAVALLO, T.; CROKER, B. P.; DEMETRIS, A. J.; DRACHENBERG, C. B.; FOGO, A. B.; FURNESS, P.; GABER, L. W.; GIBSON, I. W.; GLOTZ, D.; GOLDBERG, J. C.; GRANDE, J.; HALLORAN, P. F.; HANSEN, H. E.; HARTLEY, B.; HAYRY, P. J.; HILL, C. M.; HOFFMAN, E. O.; HUNSICKER, L. G.; LINDBLAD, A. S.; MARCUSSEN, N.; MIHATSCH, M. J.; NADASDY, T.; NICKERSON, P.; OLSEN, T. S.; PAPADIMITRIOU, J. C.; RANDHAWA, P. S.; RAYNER, D. C.; ROBERTS, I.; ROSE, S.; RUSH, D.; SALINAS-MADRIGAL, L.; SALOMON, D. R.; SUND, S.; TASKINEN, E.; TRPKOV, K.; YAMAGUCHI, Y. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney International*, v. 55, n. 2, p. 713-723, 1999.

RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *British Journal of Pharmacology*, v. 92, n. 1, p. 181-187, 1987.

RAPOPORT, R. M.; MURAD, F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circulation Research*, v. 52, n. 3, p. 352-357, 1983.

RASTALDO, R.; PAGLIARO, P.; CAPPELLO, S.; PENNA, C.; MANCARDI, D.; WESTERHOF, N.; LOSANO, G. Nitric oxide and cardiac function. *Life Sciences*, v. 81, p. 779-793, 2007.

RÄTHEL, T. R.; LEIKERT, J. F.; VOLLMAR, A. M.; DIRSCH, V. M. Application of 4,5-diaminofluorescein to reliably measure nitric oxide released from endothelial cells *in vitro*. *Biological Procedures Online*, v. 5, n. 1, p. 136-142, 2003.

SCHMIDT, H. H. H. W.; WALTER, U. NO at work. *Cell*, v. 78, p. 919-925, 1994.

SCHULTZ, K-D.; SCHULTZ, K.; SCHULTZ, G. Sodium nitroprusside and other smooth muscle-relaxants increase cyclic GMP levels in rat ductus deferens. *Nature*, v. 265, p. 750-751, 1977.

SILVA, R. M. M. Avaliação da síntese de óxido nítrico (NO) em transplantados renais. 2004. 115f. (Dissertação de mestrado em ciências farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2004.

SLADEK, S. M.; MAGNESS, R. R.; CONRAD, K. P. Nitric oxide and pregnancy. *The American Journal of Physiology*, v. 272, n. 2 Pt 2, p. R441-463, 1997.

SNYDER, S. H.; BREDT, D. S. Biological roles of nitric oxide. *Scientific American*, v. 266, p. 68-71, 1992.

STRIJDOM, H.; MULLER, C.; LOCHNER, A. Direct intracellular nitric oxide detection in isolated adult cardiomyocytes: flow cytometric analysis using the fluorescent probe, diaminofluorescein. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 37, n. 4, p. 897-902, 2004.

STUEHR, D. J.; MARLETTA, M. A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 82, n. 22, p. 7738-7742, 1985.

STUEHR, D. J.; NATHAN, C. F. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *Journal of Experimental Medicine*, v. 169, n. 5, p. 1543-1555, 1989.

SUZUKI, A.; KUDOH, S.; MORI, K.; TAKAHASHI, N.; SUZUKI, T. Expression of nitric oxide synthase in acute renal allograft rejection in the rat. *International Journal of Urology*, v. 11, n. 10, p. 837-844, 2004.

SZABÓ, C. Alterations in nitric oxide production in various forms of circulatory shock. *New Horizons*, v. 3, n. 1, p. 2-32, 1995.

SZABÓ, C.; ISCHIROPOULOS, H.; RADI, R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 6, n. 8, p. 662-680, 2007.

THOMPSON, B. T. Glucocorticoids and acute lung injury. *Critical Care Medicine*, v. 31, n. 4, p. S253-257, 2003.

TSIKAS, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *Journal of Chromatography B*, v. 851, p. 51-70, 2007.

TUÑÓN, M. J.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; GUTIÉRREZ, B.; CULEBRAS, J. M.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. Effects of FK506 and rapamycin on generation of reactive oxygen species, nitric oxide production and nuclear factor kappa B activation in rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*, v. 66, n. 3, p. 439-445, 2003.

UCHIDA, K.; MISHIMA, S.; OHTA, S.; YUKIOKA, T. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates lung injury in rats after gut ischemia-reperfusion. *The Journal of Trauma*, v. 63, n. 3, p. 603-607, 2007.

VOS, I. H.; JOLLES, J. A.; RABELINK, T. J. The role of nitric oxide in renal transplantation. *Seminars in Nephrology*, v. 24, n. 4, p. 379-388, 2004.

XIE, Q.; NATHAN, C. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 56, n. 5, p. 576-582, 1994.

YOSHIKAWA, K.; KURIYAMA, K. Characterization of cerebellar guanylate cyclase using N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Presence of two different types of guanylate cyclase in soluble and particulate fractions. *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects*, v. 628, n. 4, p. 377-387, 1980.

ZHANG, R.; LESLIE, B.; BOUDREAUX, J. P.; FREY, D.; REISIN, E. Hypertension after kidney transplantation: impact, pathogenesis and therapy. *The American Journal of the Medical Sciences*, v. 325, n. 4, p. 202-208, 2003.

**ANEXOS**

**ANEXO A**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP

**Parecer nº. ETIC 415/05**

**Interessada: Profa. Dra. Luci Maria Sant'Ana Dusse  
Depto. de Análises Clínicas e Toxicologia  
Faculdade de Farmacia - UFMG**

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou no dia 29 de março de 2005, depois de atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Transplante renal: inter-relação dos processos da coagulação, fibrinolítico e inflamatório"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
p/ **Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia**  
**Presidente do COEP/UFMG**

## ANEXO B



CL.CEP.4606

Belo Horizonte, 26 de setembro de 2006.

De : CEP/ HSFA  
Para: Luci Maria Sant'ana Dusse  
Dr. Olindo de Assis Martins Filho  
Natália Castro de Carvalho Shachnik

Ref. : CARTA DE LIBERAÇÃO PARA O INÍCIO DA PESQUISA - "Transplante renal: Inter-relação dos processos da coagulação, fibrinolíticos e inflamatório" Registrado na CONEP Nº 13459.

Prezados Srs,

O CEP dos HSFA, após análise do projeto acima citado, e sendo atendido as adequações solicitadas, aprova sem restrições e pendências em reunião no dia 26 de setembro de 2006 , sendo liberado para início das atividades.

Atenciosamente,

  
Dr<sup>a</sup>. Edna Mariléia Meireles Leite  
Presidente  
Comitê de ética em Pesquisa/HSFA

Rua Itamaracá, 535  
Bairro Concórdia  
31110-500  
PARQ: (31) 3422-1033  
FAX: (31) 3444-1153  
hsfa@hospitalaosfrancisco.com.br

## ANEXO C



Universidade Federal de Minas Gerais  
Hospital das Clínicas  
Diretoria Geral

UFMG

Belo Horizonte, 27 de novembro de 2006.

Processo no. 124/06

Título: ***“Transplante renal: inter-relação dos processos da coagulação, fibrinolítico e inflamatório”.***

Sr(a) Pesquisador(a)

Reportando-nos ao projeto de pesquisa em referência, e, considerando sua concordância com o parecer da Comissão de Avaliação Econômico-financeira de Projetos de Pesquisa-CAEF/HC, a aprovação do COEP/UFMG em 25/03/2005, esta Diretoria aprova seu desenvolvimento no âmbito institucional.

Solicitamos enviar à DEPE relatório parcial ou final, após um ano.

Atenciosamente,

  
PROF. HENRIQUE VITOR LEITE  
Diretor da DEPE/HC-UFMG

Senhor(a) Pesquisador(a)  
Profa. Luci Maria Sant'Ana Dusse  
Depto. Análises Clínicas e Toxicológicas  
Faculdade de Farmácia

**ANEXO D****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(Para o grupo-controle)

**PROJETO DE PESQUISA  
TRANSPLANTE RENAL: INTER-RELAÇÃO DOS PROCESSOS DA COAGULAÇÃO,  
FIBRINOLÍTICO E INFLAMATÓRIO.**

Prezado(a) Senhor(a),

Uma melhor compreensão da coagulação do sangue e da inflamação em pacientes submetidos ao transplante renal é muito importante para entendermos as complicações que podem ocorrer após o transplante. Considerando a dificuldade atual de monitoração dos pacientes transplantados, que depende de biópsia renal (com todos os riscos associados a este procedimento) e avaliação histológica (de resultado questionável, uma vez que a biópsia é feita em um único ponto), a determinação de marcadores não invasivos torna-se altamente desejável.

Neste estudo, serão realizados exames de laboratório utilizando sangue dos pacientes transplantados, com o objetivo de estudar as alterações da coagulação do sangue e detectar a ocorrência de inflamação.

Para obter a conclusão da pesquisa, será necessário comparar os resultados dos exames dos pacientes transplantados com os resultados de indivíduos normais (grupo-controle).

Para isto, será necessário colher 15 mL do seu sangue, utilizando agulhas e tubos descartáveis, para que não haja risco de contaminação. A coleta de sangue será realizada por um profissional com grande experiência, porém, toda coleta pode causar uma leve dor no local e, em alguns casos, formar um pequeno hematoma (mancha roxa). Um outro risco associado ao procedimento de coleta de sangue, embora raro, é a ocorrência de lipotímia. Nesse caso, o profissional farmacêutico adotará as medidas pertinentes, para as quais está habilitado.

O sangue colhido será utilizado apenas para esta pesquisa, seu nome nunca será revelado e os resultados dos exames serão utilizados apenas para os fins propostos no protocolo de pesquisa conforme a Resolução CNS 196/96.

Nenhum exame ou procedimento realizado em função exclusivamente da pesquisa será cobrado. Tais despesas serão de responsabilidade do patrocinador da pesquisa.

Caso queira participar desta pesquisa, você deve ler atentamente este Termo de Consentimento e autorizar a coleta do seu sangue, através da sua assinatura.

Você tem a liberdade de se recusar a participar desta pesquisa e/ou responder a qualquer pergunta que considere constrangedora ou de retirar seu consentimento a qualquer momento.

Qualquer dúvida que houver poderá ser esclarecida com o Dr. Geraldo Majella (Hosp. São Francisco/ Fone 2126-1517), Prof. Luci Dusse (Faculdade de Farmácia/UFMG/ Fone 3499-6880) ou com a farmacêutica Natália (Fone 3499-6900 / 9158-2870) a qualquer hora.

Desde já, agradecemos sua colaboração.

---

Profª Luci Maria Sant'Ana Dusse

---

Farmacêutica Natália Castro de Carvalho Schachnik

---

### **Autorização**

Após ter lido o “Termo de consentimento Livre e Esclarecido” e solucionado todas as minhas duvidas com relacao a pesquisa intitulada “Transplante Renal: Inter-relação dos processos da coagulação, fibrinolítico e inflamatório”, concordo em participar e autorizo a coleta do meu sangue para fazer os testes laboratoriais previstos na pesquisa.

---

Nome do participante

Belo Horizonte, de de 2006.

---

Assinatura

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(Para o grupo de pacientes transplantados renais)

**PROJETO DE PESQUISA  
TRANSPLANTE RENAL: INTER-RELAÇÃO DOS PROCESSOS DA COAGULAÇÃO,  
FIBRINOLÍTICO E INFLAMATÓRIO.**

Prezado(a) Senhor(a),

Uma melhor compreensão da coagulação do sangue e da inflamação em pacientes submetidos ao transplante renal é muito importante para entendermos as complicações que podem ocorrer após o transplante. Considerando a dificuldade atual de monitoração dos pacientes transplantados, que depende de biópsia renal (com todos os riscos associados a este procedimento) e avaliação histológica (de resultado questionável, uma vez que a biópsia é feita em um único ponto), a determinação de marcadores não invasivos torna-se altamente desejável.

Neste estudo, serão realizados exames de laboratório utilizando sangue dos pacientes transplantados, com o objetivo de estudar as alterações da coagulação do sangue e detectar a ocorrência de inflamação.

Para isto, será necessário colher 10 mL de sangue de cada paciente, utilizando agulhas e tubos descartáveis. Assim, não há nenhum risco de contaminação para o paciente. A coleta de sangue será realizada por um profissional com grande experiência, porém, toda coleta pode causar uma leve dor no local e, em alguns casos, formar um pequeno hematoma (mancha roxa). Um outro risco associado ao procedimento de coleta de sangue, embora raro, é a ocorrência de lipotímia. Nesse caso, o profissional farmacêutico adotará as medidas pertinentes, para as quais está habilitado.

O sangue colhido será utilizado apenas para esta pesquisa, seu nome nunca será revelado e os resultados dos exames serão utilizados apenas para os fins propostos no protocolo de pesquisa conforme a Resolução CNS 196/96.

Nenhum exame ou procedimento realizado em função exclusivamente da pesquisa será cobrado. Tais despesas serão de responsabilidade do patrocinador da pesquisa.

Caso queira participar desta pesquisa, você deve ler atentamente este Termo de Consentimento e autorizar a coleta do seu sangue, através da sua assinatura.

Você tem a liberdade de se recusar a participar desta pesquisa e/ou responder a qualquer pergunta que considere constrangedora ou de retirar seu consentimento a qualquer momento, sem que haja prejuízos para o seu tratamento.

Qualquer dúvida que houver poderá ser esclarecida com o Dr. Geraldo Majella (Hosp. São Francisco/ Fone 2126-1517), Prof. Luci Dusse (Faculdade de Farmácia/UFMG/ Fone 3499-6880) ou com a farmacêutica Natália (Fone 3499-6900 / 9158-2870).

Desde já, agradecemos sua colaboração.

---

Prof<sup>a</sup> Luci Maria Sant'Ana Dusse

---

Farmacêutica Natália Castro de Carvalho Schachnik

---

### **Autorização**

Após ter lido o “Termo de consentimento Livre e Esclarecido” e solucionado todas as minhas duvidas com relação a pesquisa intitulada “Transplante Renal: Inter-relação dos processos da coagulação, fibrinolítico e inflamatório”, concordo em participar e autorizo a coleta do meu sangue para fazer os testes laboratoriais previstos na pesquisa.

---

Nome do participante

Belo Horizonte, de de 2006.

---

Assinatura

**ANEXO E****FICHA CLÍNICA – GRUPO CONTROLE**

Projeto: “**Transplante renal: inter-relação dos processos da coagulação, fibrinolítico e inflamatório**”

Número de identificação do participante: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

**1. Identificação:**

Nome: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: M \_\_\_ F \_\_\_

Naturalidade: \_\_\_\_\_

Endereço: Rua (Avenida): \_\_\_\_\_

Nº: \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_

Estado: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

**2. Anamnese:**

a) Apresenta alguma doença crônica? Qual(ais)?

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

b) Há casos de doenças crônicas na família? Quais?

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

---

---

c) Faz uso de medicamento(s)? Qual(ais)?

---

---

---

---

---

**3. Outras informações:**

---

---

---

---

---

---

**RESULTADO DO HEMOGRAMA DOS INDIVÍDUOS DO GRUPO CONTROLE  
(ANEXAR À FICHA CLÍNICA)**

Nome: \_\_\_\_\_

Grupo: \_\_\_\_\_

Data de inclusão no estudo: \_\_\_\_\_

Nº registro: \_\_\_\_\_

Outras observações:	
<b>Data:</b>	
Hm	
Hb/Ht	
Global leuc	
Neutr/bast	
Seg/Eosin	
Mon/Linf	
Plaquetas	

**FICHA CLÍNICA - PACIENTE**

Projeto: “**Transplante renal: inter-relação dos processos da coagulação, fibrinolítico e inflamatório**”

Número de identificação do participante: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

**1. Identificação:**

Nome: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: M \_\_\_ F \_\_\_

Naturalidade: \_\_\_\_\_

Endereço: Rua (Avenida): \_\_\_\_\_

Nº: \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_

Estado: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

**2. Anamnese:**

a) Há quanto tempo tem insuficiência renal?

\_\_\_\_\_

b) Por quanto tempo fez hemodiálise?

\_\_\_\_\_

c) Data do transplante renal:

\_\_\_\_\_

d) Origem do rim transplantado:

\_\_\_\_\_

e) Sintomas clínicos apresentados no momento da coleta de sangue:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

f) Esquema terapêutico utilizado:

---

---

---

---

g) Data de início deste esquema:

---

h) Outros medicamentos utilizados:

---

---

---

---

**3. Resultados dos exames laboratoriais realizados no Laboratório do Hospital: (anexar)**

**4. Outras informações:**

---

---

---

---

---

---

**RESULTADOS DO HEMOGRAMA DE ACOMPANHAMENTO CLÍNICO-LABORATORIAL DOS PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS (ANEXAR À FICHA CLÍNICA)**

Nome: \_\_\_\_\_

Grupo: \_\_\_\_\_

Data de inclusão no estudo: \_\_\_\_\_

Nº registro: \_\_\_\_\_

Outras observações:	
<b>Data:</b>	
Hm	
Hb/Ht	
Global leuc	
Neutr/bast	
Seg/Eosin	
Mon/Linf	
Plaquetas	