

RICARDO ALVES LUZ

**ESTUDO COMPARATIVO DA REGULAÇÃO DA APOPTOSE
MEDIADA POR AGENTES PRÓ-E ANTI-INFLAMATÓRIOS EM
GRANULÓCITOS HUMANOS**



Universidade Federal Fluminense

**Niterói
2007**

RICARDO ALVES LUZ

**ESTUDO COMPARATIVO DA REGULAÇÃO DA APOPTOSE
MEDIADA POR AGENTES PRÓ-E ANTI-INFLAMATÓRIOS
EM GRANULÓCITOS HUMANOS**

**Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia da
Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para
a obtenção do Grau de Mestre. Área de concentração: Patologia
Investigativa**

Orientador: Prof. Dr. Pedro Paulo Xavier Elsas

Niterói
2007

Luz, Ricardo Alves

Estudo comparativo da regulação da apoptose mediada por agentes pró-e anti-inflamatórios em granulócitos humanos / Ricardo Alves Luz. – Niterói, 2007.

152 f.

Dissertação de Mestrado (Patologia Investigativa – Programa de Pós-Graduação em Patologia) – Universidade Federal Fluminense

Orientador: Pedro Paulo Xavier Elsas

Bibliografia: f. 117-147

1. GRANULÓCITOS. 2. APOPTOSE. 3. ATRA. 4. DEXAMETASONA. I. Universidade Federal Fluminense.
II. Título.

RICARDO ALVES LUZ

ESTUDO COMPARATIVO DA REGULAÇÃO DA APOPTOSE MEDIADA POR AGENTES PRÓ-E ANTI-INFLAMATÓRIOS EM GRANULÓCITOS HUMANOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de concentração: Patologia Experimental.

Aprovado em 28 de Fevereiro de 2007.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Doutor José Marcos Cunha (examinador prévio)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Doutor Neio Lúcio Fernandes Boechat
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof^a. Doutora Eliane Pedra Dias
Universidade Federal Fluminense

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo amor, carinho e paciência que sempre demonstraram, e que me ajudou a chegar até aqui.

À minha irmã e cunhado, pelo meu sobrinho.

Aos meus orientadores Pedro Paulo Elsas e Maria Ignez Elsas, por toda a ajuda que me deram, por terem acreditado no meu trabalho, e por, pelos últimos 10 anos, terem me ensinado o amor pela bancada, e mais importante, a como pensar e fazer ciência.

Aos meus professores.

À todos os doadores, por literalmente terem dado o sangue por este trabalho.

À Roseli da Cunha, pela ajuda com a coleta das amostras.

Ao Zilton Vasconcelos, pela ajuda com os experimentos de citometria de fluxo.

À Carla Jones, uma amiga fenomenal, fonte constante de inspiração e apoio imprescindível frente a todas as adversidades, e por sempre me trazer de volta à realidade quando necessário.

RESUMO

A morte celular programada, reconhecida através do quadro morfológico de apoptose, é um mecanismo central de regulação de populações celulares em animais multicelulares, que, no sistema imunológico, permite a resolução dos processos inflamatórios, o controle fino da expansão clonal e a prevenção da autoimunidade. O presente estudo se ocupa dos mecanismos pelos quais a apoptose é modulada por agentes externos, em dois diferentes tipos de granulócitos humanos, neutrófilos e eosinófilos, que compartilham uma origem comum na medula óssea, assim como muitas características morfológicas e funcionais, mas desempenham papéis diferentes na defesa do hospedeiro. Baseamo-nos em estudos experimentais sobre a regulação da apoptose em eosinófilos murinos em desenvolvimento, conduzidos pelo nosso grupo, assim como em estudos laboratoriais sobre a regulação de apoptose em granulócitos humanos, feitos por outros, para elaborar a hipótese de que os efeitos e interações observados em eosinófilos murinos durante o desenvolvimento poderiam ser reproduzidos com os mesmos agentes em neutrófilos humanos maduros, mas não em eosinófilos. Para testar a hipótese, avaliamos inicialmente, morfológicamente e por citometria de fluxo, após coloração com Anexina V e iodeto de propídio, os efeitos de: a) ácido retinóico all-trans (ATRA); b) dexametasona; c) ATRA e dexametasona. Populações de granulócitos purificadas do sangue de doadores sadios foram incubadas por até 20 h em meio de cultura, sem a adição de fatores promotores de sobrevivência, nem de fatores promotores de apoptose, ou na presença de ATRA e dexametasona, isoladamente

ou em associação. Neutrófilos e eosinófilos entraram em apoptose espontaneamente, de forma dependente da densidade, como descrito na literatura. ATRA foi um forte indutor de apoptose em neutrófilos, de forma dose-dependente. Em contraste, a dexametasona protegeu os neutrófilos da apoptose espontânea. Dexametasona também protegeu neutrófilos da apoptose induzida por ATRA. Estes dados confirmam que o estudo foi conduzido em condições comparáveis às de outros estudos, e revelam um efeito pró-apoptótico ainda não descrito para o ATRA em neutrófilos humanos, assim como uma interação inédita entre ATRA e dexametasona nesta linhagem de granulócitos. Em seguida, avaliamos os efeitos da indometacina, que potencia a produção de eosinófilos murinos em cultura. A indometacina revelou-se uma forte indutora de apoptose em neutrófilos humanos, na ausência de outros fatores exógenos, um efeito igualmente ainda não descrito na literatura. Estas observações indicam que: a) embora neutrófilos humanos possam apresentar respostas ao ATRA e à dexametasona semelhantes às observadas durante o desenvolvimento de eosinófilos murinos, mas distintas das de eosinófilos humanos maduros, esta semelhança não se estende aos efeitos de outros agentes; b) as vias de sinalização iniciadas pelo ATRA e pela dexametasona em neutrófilos humanos maduros apresentam forte interação (*cross-talk*), cujo mecanismo precisa ser estabelecido; c) a indometacina pode apresentar, neste modelo, ações pró-apoptóticas distintas das descritas para outros agentes anti-inflamatórios não-esteroidais, como a aspirina e o salicilato de sódio.

ABSTRACT

Programmed cell death, recognizable through the morphological features of apoptosis, is a central mechanism in the regulation of cell populations in metazoans, which in the immune system makes possible the resolution of inflammatory processes, the fine tuning of clonal expansion and the prevention of autoimmunity. This study is concerned with the mechanisms through which apoptosis is modulated by exogenous agents, in two different classes of human granulocytes (neutrophils and eosinophils), that share a common origin in the bone-marrow, as well as many morphological and functional features, but carry out different roles in host defense. We have drawn from experimental studies on the regulation of apoptosis in developing murine eosinophils, carried out by our research team, along with laboratory observations on the regulation of apoptosis in mature human granulocytes, done by other groups, to build the hypothesis that effects and interactions observed with murine developing eosinophils could be duplicated with the same agents on mature human neutrophils, but not eosinophils. To test this hypothesis, we have initially evaluated, by morphology and by flow cytometry following staining with Annexin V and propidium iodide, the effects of: a) all-trans Retinoic Acid (ATRA); b) dexamethasone; c) ATRA and dexamethasone. Purified granulocyte populations from the blood of healthy donors were incubated up to 20 h in medium, without survival-promoting or apoptosis-promoting factors, or in the presence of ATRA and dexamethasone, alone or in association. Neutrophils and eosinophils underwent spontaneous apoptosis which dependent on the culture density, as reported in previous studies. ATRA strongly induced apoptosis in neutrophils, dose-dependently. By contrast, dexamethasone protected neutrophils

from spontaneous apoptosis. Dexamethasone further protected neutrophils from apoptosis induced by ATRA. These findings confirm that the study was carried out in conditions comparable to those of previous studies, and document a proapoptotic effect of ATRA hitherto undescribed in human neutrophils, as well as a novel interaction between ATRA and dexamethasone in this granulocyte lineage. Subsequently, we evaluated the effects of indomethacin, which enhances eosinophil production in murine-bone marrow culture. Indomethacin strongly induced apoptosis in human neutrophils, in the absence of exogenous agents, an observation that is also novel. These findings indicate that: a) although human neutrophils can present responses to ATRA and dexamethasone similar to those in developing murine eosinophils, but distinct from those of mature human eosinophils, this similarity does not extend to the effects of other agents; b) the signaling cascades initiated by ATRA and dexamethasone in mature human neutrophils present strong interactions (cross-talk), the mechanism of which needs to be established; c) indomethacin can present, in this setting, proapoptotic effects distinct from those reported for other nonsteroidal anti-inflammatory drugs, such as aspirin and sodium salicylate.

LISTA DE FIGURAS

Tabela 1 – Lista de doadores.....	70
Figura 1 – Efeito da densidade celular sobre a taxa de apoptose espontânea de neutrófilos.....	78
Figura 2 – Efeito da densidade celular sobre a taxa de apoptose espontânea de eosinófilos.....	79
Figura 3 – Efeito do tempo de cultura sobre a taxa de apoptose em neutrófilos.....	81
Figura 4 – Efeito do tempo de cultura sobre a taxa de apoptose em eosinófilos.....	82
Figura 5 – Impacto da variabilidade entre doadores sobre as taxas de apoptose em neutrófilos.....	84
Figura 6 – Avaliação da apoptose espontânea em neutrófilos por citometria de fluxo.....	85
Figura 7 – Relação dose-resposta para dexametasona na apoptose de neutrófilos em cultura (20h).....	87
Figura 8 – Cinética de atuação da dexametasona na apoptose de neutrófilos em cultura (20h).....	88
Figura 9 – Impacto da variabilidade entre doadores sobre a resposta anti-apoptótica à dexametasona em neutrófilos.....	90
Figura 10 – Relação dose-resposta para ATRA na apoptose de neutrófilos em cultura (20h).....	93
Figura 11 – Impacto da variabilidade entre doadores sobre a resposta apoptótica ao ATRA em neutrófilos.....	95
Figura 12 – Regulação pela dexametasona da apoptose induzida pelo ATRA.....	97-98
Figura 13 – Relação dose-resposta para indometacina na apoptose de neutrófilos em cultura (20h).....	101
Figura 14 – Impacto da variabilidade entre doadores sobre a resposta apoptótica à indometacina em neutrófilos.....	102

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AMPc – adenosina monofosfato cíclica
- Apaf 1 – fator ativador de apoptose 1
- ATP – adenosina trifosfato
- ATRA – ácido retinóico all-trans
- Bad – promotor de morte associado ao Bcl-2
- Bax – proteína X associada ao BCL-2
- Bcl-2 – leucemia linfoblástica crônica de célula B / linfoma 2
- Bcl-xL –
- Bid – agonista do receptor de morte que interage com o domínio 3 de homologia com o Bcl-2
- C3 – fator 3 do complemento
- C5 – fator 5 do complemento
- C5a – fator 5 ativado do complemento
- CAD – DNase ativada por caspases
- CBP – proteína ligadora de cre
- CD – cluster de diferenciação
- CDK – cinase dependente de ciclina
- cIAP – inibidor de apoptose ligado à proteína C
- citC – citocromo C
- COX – ciclo-oxigenase
- DD – domínio de morte
- DED – domínio efetor de morte
- DNA – ácido desoxirribonucléico
- ERK 1 /2 - cinase extracelular regulada por sinal
- FADD – proteína do domínio de morte associada ao FAS
- FAS – membro 6 da superfamília do receptor do fator de necrose tumoral

- fMLP – formil- metionil- leucil- fenilalanina
- G-CSF – fator estimulador de colônias granulocíticas
- GM-CSF – fator estimulador de colônias granulocíticas e macrófágicas
- GR α – receptor de glicocorticóide alfa
- GR β – receptor de glicocorticóide beta
- H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
- HL-60 – linhagem celular mielóide humana
- IAP – inibidor da apoptose
- iCAD – inibidor da DNase ativada por caspases
- IFN- γ – interferon gama
- I- κ B – inibidor do NF- κ B
- I κ K – cinase do inibidor do NF- κ B
- IL-1 – interleucina 1
- IL-1 β R – receptor da interleucina 1 beta
- IL-2 – interleucina 2
- IL-8 – interleucina 8
- IL-10 – interleucina 10
- IL-15 – interleucina 15
- IL-17 – interleucina 17
- IL-23 – interleucina 23
- iNOS – sintase de óxido nítrico indutível
- IRAK – cinase associada ao receptor de interleucina 1
- LPS – lipopolissacarídeo
- LtB₄ – leucotrieno B4
- Mcl 1 – célula mielóide leucêmica 1
- ML 1 – leucemia mieloblástica 1
- MyD 88 – proteína 88 de diferenciação mielóide
- NF- κ B – fator nuclear Kappa B
- NK – célula “natural killer”
- NO – óxido nítrico

- p38 MAPK – p38 proteína cinase ativada por mitógeno
- p66(Shc) – proteína p66 contendo homologia à proteína Src
- PAF – fator ativador de plaquetas
- PAR – receptor ativado por proteases
- PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas
- PgE₂ – prostaglandina E2
- PgJ₂ – prostaglandina J2
- PI3K – fosfatidilinositol-3 cinase
- PKA – proteína cinase A
- PKC – proteína cinase C
- PPAR – receptor ativado por proliferador de peroxissomas
- RAR – receptor de ácido retinóico
- RXR – receptor de retinóide X
- TdT – deoxinucleotidil terminal transferase
- TGF-β – fator de crescimento transformante do tipo beta
- TLR4 – receptor semelhante ao TOLL do tipo 4
- TNF – fator de necrose tumoral
- TNFR1 – receptor 1 do fator de necrose tumoral
- TRADD – proteína do domínio de morte associada ao receptor do fator de necrose tumoral
- TRAF2 – fator 2 associado ao receptor do fator de necrose tumoral
- TUNEL – reação de marcação do tipo nickend com deoxiuridina trifosfato biotinilada mediada por deoxinucleotidil terminal transferase
- XIAP – inibidor de apoptose ligado à proteína X

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Morte Celular Programada e Apoptose.....	15
1.2 Apoptose no Contexto da Infecção e Imunidade.....	16
1.3 Apoptose em Granulócitos: um Processo Regulado Durante a Ativação Celular e o Desenvolvimento.....	17
1.4 Definição do Problema e da Estratégia de Abordagem.....	25
OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo Geral.....	27
2.2 Objetivos Específicos.....	27
REVISÃO DA LITERATURA.....	28
3.1 Apoptose: Processos e Mecanismos Essenciais.....	28
3.2 Apoptose: Fases, vias e Controles de Ativação de Caspases.....	36
3.3 Granulócitos: homeostase e Mecanismos de Interação com o Microambiente..	44
3.4 Peculiaridades do Processo de Apoptose em Granulócitos.....	50
3.5 Moduladores Farmacológicos da Apoptose.....	55
3.5.1 Inibidores da tradução e da transcrição.....	55
3.5.2 Agentes que elevam os níveis intracelulares de AMPc.....	56
3.5.3 Prostanóides.....	56
3.5.4 Inibidores da Cdk.....	57
3.5.5 Glicocorticóides.....	58
3.5.6 Retinóides.....	60
3.5.7 Agentes anestésicos, psicotrópicos e outros moduladores da função de membranas excitáveis.....	61
3.6 Importância da Apoptose de Granulócitos em Medicina.....	62
JUSTIFICATIVA.....	66
HIPÓTESE.....	67
MATERIAL E MÉTODOS.....	68
6.1 Doadores.....	68
6.1.1 Critérios de exclusão.....	70
6.2 Obtenção de Sangue Total e Purificação de Granulócitos.....	70
6.3 Obtenção de Soro Autólogo.....	72

6.4	Estabelecimento de Cultura de Granulócitos.....	72
6.5	Observação Morfológica de Apoptose.....	73
6.6	Determinação da Apoptose por Citometria de Fluxo.....	74
6.7	Métodos Estatísticos.....	75
	RESULTADOS.....	76
7.1	Efeito da Densidade de Cultura Sobre a Taxa de Apoptose em Granulócitos Humanos.....	76
7.2	Efeito do Tempo de Cultura Sobre a Taxa de Apoptose em Granulócitos Humanos.....	80
7.3	Impacto da Variabilidade Entre Doadores Sobre a Taxa de Apoptose em Granulócitos Humanos.....	82
7.4	Efeito da Dexametasona Sobre a Apoptose em Neutrófilos.....	86
7.5	Efeito do Ácido Retinóico All-Trans (ATRA) sobre a apoptose em neutrófilos...91	
7.6	Interação Entre a Dexametasona e o ATRA na Indução de Apoptose em Neutrófilos.....	96
7.7	Efeito da Indometacina Sobre a Apoptose em Neutrófilos.....	99
	DISCUSÃO.....	103
	CONCLUSÕES.....	115
	BIBLIOGRAFIA.....	117

INTRODUÇÃO

1.1 Morte Celular Programada e Apoptose

A morte celular programada é essencial para a regulação das populações celulares adultas (Clarke e Clarke, 1996). *Apoptose* (Kerr *et al.*, 1972) é o padrão de alterações morfológicas característico da morte celular programada. A apoptose é a evidência visível e quantificável do processo subjacente, de morte celular programada.

Apoptose é um processo observado tanto *in vitro* como *in vivo* (Gottlieb e Kitsis, 2001; Majno, 2004), e é importante em uma grande quantidade de processos diretamente relevantes para a Patologia Investigativa, incluindo a regeneração dos tecidos, o crescimento dos tumores malignos, a regulação do tamanho das populações celulares especializadas, a atrofia das estruturas privadas de estimulação trófica por hormônios e neurotransmissores, a regressão fisiológica de estruturas como o timo no curso do desenvolvimento e envelhecimento, e muitos

outros (Mcconkey *et al.*, 1996; Wickremasinghe e Hoffbrand, 1999; Majno, 2004; Perl *et al.*, 2005).

1.2 Apoptose no Contexto da Infecção e Imunidade

Se nos limitarmos a examinar os aspectos da apoptose diretamente vinculados à imunidade e à relação entre parasito e hospedeiro, a importância deste processo se revela extraordinária (Wallach, 1996; Mouliau e Berrih-Aknin, 1998; Scaffidi *et al.*, 1999; Krammer, 2000; Trapani *et al.*, 2000; Zimmermann e Green, 2001; Savill *et al.*, 2002; Opferman e Korsmeyer, 2003; Trambas e Griffiths, 2003; Proskuryakov *et al.*, 2005; Peng, 2006b). Podemos citar como exemplos a eliminação de células potencialmente auto-reativas no curso da ontogenia, a regulação do tamanho das populações linfocitárias no curso da resposta imune normal, e a eliminação por apoptose de células infectadas por diferentes patógenos.

Da mesma forma que o processo de multiplicação dos patógenos, a vida útil dos leucócitos, que fazem frente a esses patógenos como parte de respostas imunes inatas e adquiridas, é determinada de forma precisa pelo processo de morte celular programada (Lee *et al.*, 1993; Mollinedo *et al.*, 1999; Ward *et al.*, 1999b; Kobayashi *et al.*, 2003; Simon, 2003; Maiani *et al.*, 2004b; Peng, 2006a; Riley, 2006; Christopher e Link, 2007).

1.3 Apoptose em Granulócitos: um Processo Regulado Durante a Ativação Celular e o Desenvolvimento

Neutrófilos, eosinófilos e basófilos, coletivamente conhecidos como granulócitos, devido aos seus grânulos citoplasmáticos especializados, participam, de muitas maneiras diferentes, das defesas antibacterianas, da imunidade aos parasitas e das reações alérgicas (Sampson, 2000; Witko-Sarsat *et al.*, 2000; Gibbs, 2005; Elsas, 2006; Falcone *et al.*, 2006; Riley, 2006; Rothenberg e Hogan, 2006; Christopher e Link, 2007; Lehrer, 2007).

Em processos inflamatórios iniciados por diferentes estímulos, estes três tipos de células, estreitamente relacionados pela morfologia, pelo comportamento e pela origem em progenitores da medula óssea, se acumulam, em proporções variáveis, nos tecidos, e, à medida em que o processo inflamatório se continua ou termina, são eliminados por apoptose de forma silenciosa e eficaz (Savill *et al.*, 1989; Haslett *et al.*, 1991), de forma a permitir, seja a renovação das populações celulares infiltrantes, seja a sua eliminação completa.

O encontro dos granulócitos com microorganismos no sangue ou nos tecidos, ou com produtos de origem microbiana, ou com citocinas indicativas de dano celular, como o Fator de Necrose Tumoral, a Interleucina-1 ou a Interleucina-8, modifica de forma substancial a longevidade média destas células, estendendo sua vida útil nos tecidos de forma a poderem contribuir de forma eficiente para a eliminação dos patógenos (Colotta *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1993; Hachiya *et al.*, 1995; Fossati *et al.*, 1998; Salamone *et al.*, 2001; Turina *et al.*, 2005; Kilpatrick *et al.*, 2006).

Por outro lado, existem evidências de que certos mediadores da inflamação, seja em função da sua natureza, seja em função da sua concentração, ou ainda em função da sua interação com outros fatores, encurtam a vida útil dos granulócitos, promovendo a sua morte por apoptose e eliminação através de mecanismos seguros. Nesta categoria se encontram, por exemplo, o Fator de Necrose Tumoral e o óxido nítrico (NO) (Murray *et al.*, 1997; Taylor *et al.*, 2001; Maianski *et al.*, 2003; Secco *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2004; Sulowska *et al.*, 2005; Cowburn *et al.*, 2006).

Esta plasticidade do processo de apoptose em granulócitos reflete a diversidade de contextos em que a célula madura pode se encontrar. Ela demonstra que sinais oriundos do microambiente inflamatório podem ser interpretados pela célula como indicativos de uma fase inicial da inflamação (onde prevalece o agressor e não os mecanismos de defesa), ou, alternativamente, de uma fase tardia do mesmo processo (onde os sinais da presença do agressor são poucos ou ausentes, e predominam as evidências da ativação de sistemas microbicidas). Ou seja, o processo de apoptose pode ser controlado de formas diferentes durante a evolução da resposta inflamatória, de modo a reter no sítio, em forma atuante, as células quando elas ainda são necessárias, e a permitir a sua eliminação, sem riscos para o hospedeiro, quando o trabalho necessário já foi feito.

Uma regulação tão complexa não pode, evidentemente, ser compreendida sem sabermos como os diferentes sinais que atuam sobre o granulócito são interpretados pela célula, de forma a instruir uma resposta celular de sobrevivência ou apoptose. Ou seja, o entendimento da apoptose em granulócitos começa com o entendimento do processo de apoptose em si, mas só se tornará verdadeiramente

útil a partir do momento em que soubermos como este processo responde de forma integrativa aos mensageiros intracelulares liberados pelos mais diversos receptores.

Embora a enumeração dos receptores existentes num determinado tipo celular já nos permita avaliar superficialmente a grande diversidade de sinais aos quais ele pode responder, ela ainda nos dá uma idéia insuficiente de como estes sinais podem atuar, visto que existe um grande potencial para interação colateral entre estes sinais (*cross-talk*), resultando em respostas celulares que integram informações originárias em diversas fontes numa resposta flexível, graduada e adaptada ao contexto em que se encontra a célula a cada momento.

Como exemplo de como esta integração de sinais pode ser importante, basta lembrar o fenômeno da migração de leucócitos para dentro dos tecidos. Esta era outrora explicada por um fenômeno estereotipado de “quimiotaxia”, semelhante ao observado em organismos unicelulares (Florey, 1962). Hoje, com o acúmulo de informação possibilitado pelos avanços técnicos, e com uma análise mais aprofundada, o mesmo fenômeno é considerado extraordinariamente complexo, justamente por envolver múltiplas interações no espaço e no tempo, tanto entre a célula e o seu ambiente (Bochner, 2000), como entre diferentes receptores na mesma célula (Foxman *et al.*, 1999; Tarlowe *et al.*, 2003).

Na passagem dos leucócitos para o sítio inflamatório ocorre não apenas a migração em resposta a um gradiente químico, mas o rearranjo do esqueleto celular, a exposição de novos receptores, a facilitação das respostas a determinado sinal

atrator no momento em que são estimulados os receptores para outro, e a ativação de proteínas envolvidas na aderência ao endotélio, entre muitos outros aspectos (Babior, 1992; Resnick e Weller, 1993; Crockett-Torabi *et al.*, 1995; Lindbom e Werr, 2002; Zhelev e Alteraifi, 2002; Simon e Green, 2005; Chin e Parkos, 2006; Lee *et al.*, 2006; Pallister *et al.*, 2006).

A plena medida da interdependência entre diferentes respostas celulares só pode ser dada pelo fato de que defeitos simultâneos nos processos de aderência e migração celular, fagocitose e destruição intracelular de bactérias, podem ser observados em indivíduos portadores de mutações isoladas que afetam a função de determinadas estruturas de superfície, como as integrinas CD18, levando a uma síndrome de deficiência na adesão leucocitária. (Kishimoto *et al.*, 1987; Kishimoto e Rothlein, 1994; Malech e Hickstein, 2007).

Embora a integração de sinais possa ocorrer pela interação direta entre dois receptores de membrana para ligantes diferentes, especialmente quando receptores possuem atividades enzimáticas próprias ou associadas, como é o caso de receptores com atividade de tirosina-cinase, dos quais o receptor do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas, ou PDGF, é o representante clássico (Campbell *et al.*, 1997; Heldin, 1997; Foxman *et al.*, 1999; Ronnstrand e Heldin, 2001; Tarlowe *et al.*, 2003; Walrand *et al.*, 2004), a integração se faz, freqüentemente, *dentro da célula*, através das diferentes vias de transdução de sinal que mobilizam. Tal mecanismo é poderoso e abrangente, tendo em vista a capacidade de certas vias, como as do NF- κ B, regularem um grande número de processos de sinalização dentro da célula, através das atividades enzimáticas a elas associadas (Stutzin e

Hoffmann, 2006). Para visualizarmos de que maneira a ativação do NF- κ B pode influenciar a maneira pela qual um granulócito responde a sinais no seu ambiente, basta lembrarmos que esta via é ativada por estímulos como o Fator de Necrose Tumoral, a Interleucina-1, os Toll-like receptors, e muitos outros que promovem a ativação da célula, facilitam sua resposta migratória, estendem sua vida útil e iniciam sua ativação respiratória (Malinin *et al.*, 1997; Kanamori *et al.*, 2002).

Ainda que possamos ter uma noção da plasticidade que o sistema adquire através da integração intracelular de sinais gerados em diferentes receptores, esta noção ainda é incompleta, se não acrescentarmos a ela uma outra dimensão, aquela conferida por fatores ligados ao desenvolvimento. O padrão de resposta de uma determinada célula a um determinado estímulo depende não somente da presença ou ausência de um determinado receptor funcional, e da sua interação com sinais originários de outros receptores, mas também da fase do desenvolvimento em que a célula se encontra, e da linhagem específica a que ela se filia. Esta complexidade é bem exemplificada pelos estudos de regulação da apoptose em granulócitos.

Os três tipos de granulócitos sofrem *migração* do sangue para os tecidos (Bochner, 2000), mas são incapazes de *recirculação*, ou seja, ao contrário dos linfócitos, não podem retornar ao sangue através da linfa. Assim, seu desaparecimento dos tecidos tem como base a sua eliminação física, e não a sua reentrada na circulação, o que explica a importância central do processo de morte celular programada neste fenômeno (Ward *et al.*, 1999b).

Devido à raridade dos basófilos, tanto no sangue como nos infiltrados inflamatórios (Gibbs, 2005; Falcone *et al.*, 2006), a maioria dos estudos se concentra

em neutrófilos e eosinófilos. A diferença na cinética de eliminação destes dois tipos celulares tão próximos, a partir de um mesmo sítio inflamatório no qual ambos estão representados (Sampson, 2000), ilustra a importância dos aspectos ligados à *linhagem* na regulação fina da morte celular programada.

Por outro lado, estudos do nosso laboratório (Elsas *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2004; Elsas, 2006) têm ilustrado a importância da apoptose na regulação da eosinopoiese em cultura de medula óssea, e trazido evidências de mecanismos linhagem-específicos e estágio-específicos de regulação da apoptose durante o desenvolvimento hematopoiético.

A apoptose durante o desenvolvimento eosinofílico ocorre em níveis basais na presença de IL-5, antes mesmo que a diferenciação terminal possa ser demonstrada, e pode ser grandemente potenciada pela presença de determinados agentes, entre eles a Prostaglandina E2 (PgE2), e o óxido nítrico (NO). Nesses estudos, foi possível igualmente demonstrar que as ações potencializadoras da PgE2 eram mediadas pela produção de NO, a partir da NO sintase induzida (iNOS) (Jones *et al.*, 2004).

Por outro lado, foi possível mostrar que a dexametasona regulava igualmente a apoptose em eosinófilos imaturos, mas, *no sentido contrário* do que tinha sido observado em eosinófilos obtidos do sangue periférico humano (Gaspar Elsas, 2000; Jones *et al.*, 2004; Maximiano *et al.*, 2005). Ou seja, a dexametasona tem efeitos estágio-específicos: protege os estágios imaturos da linhagem eosinofílica murina contra a apoptose induzida por prostaglandina E2, mas induz apoptose em

eosinófilos humanos maduros. Como resultado, mais eosinófilos eram produzidos em culturas de medula óssea expostas à dexametasona do que nas culturas controle. Estas observações são relevantes para células humanas: estudos em curso no nosso laboratório (Daniella Cox Moore, observações não-publicadas) indicam que a dexametasona potencia e acelera a diferenciação de eosinófilos a partir do sangue de cordão umbilical humano (Mahmudi-Azer *et al.*, 2000), confirmando observações preliminares de outros grupos (Sehmi *et al.*, 2003).

Os efeitos da dexametasona também são, no entanto, linhagem-específicos: os glicocorticóides potenciam fortemente a produção de neutrófilos pela medula óssea murina (Maruyama *et al.*, 1999), um efeito que pode contribuir para a patogênese das úlceras de estresse. Assim, os glicocorticóides têm efeitos: a) *discordantes* se comparamos duas fases distintas da maturação da linhagem eosinofílica; b) *concordantes*, se comparamos neutrófilos e eosinófilos em diferentes fases de desenvolvimento.

O padrão observado pode ser resumido através da seguinte fórmula: a resposta à dexametasona em eosinófilos imaturos murinos se parece mais com o padrão de neutrófilos maduros humanos (Cox, 1995; Liles *et al.*, 1995; Meagher *et al.*, 1996; Ottonello *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 2004) do que com o padrão de eosinófilos humanos maduros (Elsas, 2006).

O caso da dexametasona é ainda mais interessante porque este agente revelou-se capaz de bloquear os efeitos de outro agente pró-apoptótico, o ATRA, em eosinófilos em desenvolvimento. O ATRA é um potente indutor da diferenciação

neutrofílica em vários modelos experimentais de granulopoiese (Lawson e Berliner, 1999), contudo, o mesmo agente tem efeito contrário na linhagem eosinofílica, visto que inibe a produção de eosinófilos (Upham *et al.*, 2002).

Estudos recentes, conduzidos em nosso laboratório, demonstraram que os efeitos hematopoiéticos do ATRA eram relacionados com o fenômeno da apoptose (manuscrito em preparação). A inibição da eosinopoiese murina pelo ATRA se faz através de indução de apoptose em células que já estão comprometidas com a linhagem eosinofílica, e que já chegaram a acumular grânulos contendo peroxidase de eosinófilo no seu citoplasma. Esta indução de apoptose, contudo, parece ocorrer por mecanismo distinto do utilizado pela PgE2, visto que não é afetado por inibidores da iNOS, e está presente na medula óssea de animais deficientes em iNOS.

Por outro lado, em cultura de medula óssea murina, os efeitos da dexametasona sobre a resposta ao ATRA resultam numa proteção dos eosinófilos em desenvolvimento frente aos efeitos inibitórios do ATRA, com potenciação da eosinopoiese (manuscrito em preparação).

Estas observações sugerem, por um lado, que a sinalização desencadeada pelo ATRA em granulócitos é linhagem-específica, com efeitos radicalmente distintos entre dois tipos de granulócitos (neutrófilos e eosinófilos) estudados em estágios comparáveis do desenvolvimento, visto se tratar de células hematopoiéticas.

Por outro lado, elas indicam também que as vias de sinalização utilizadas pelo ATRA nestes dois tipos celulares, numa mesma fase do desenvolvimento,

interagem de formas distintas com as vias de sinalização utilizadas pela dexametasona. Em eosinófilos, os processos são antagônicos, e a dexametasona bloqueia a ação do ATRA. Em neutrófilos, os processos são paralelos, e a dexametasona leva ao mesmo resultado final que o ATRA. A evidência disponível reforça a idéia de que os efeitos do ATRA, em combinação com a dexametasona, são também linhagem-específicos.

No entanto, ainda não está claro se podemos falar, no caso do ATRA, de efeitos estágio-específicos sobre a apoptose. Apesar da extensa literatura sobre ATRA em hematologia, não encontramos referências que estudassem sistematicamente a indução de apoptose por ATRA em granulócitos maduros, e, conseqüentemente, nada encontramos sobre a sua possível interação com dexametasona neste sistema.

1.4 Definição do Problema e da Estratégia de Abordagem

A partir do exposto acima, podemos apresentar da seguinte forma o problema de interesse no presente estudo:

- *Até que ponto existem padrões de resposta apoptótica linhagem-específicos e estágio-específicos, que possam guiar a nossa exploração das vias de transdução de sinal envolvidas na regulação do processo de morte celular programada em granulócitos?*

Colocado de outra forma:

• *Os estudos realizados em eosinófilos murinos em desenvolvimento têm valor preditivo para as respostas de neutrófilos maduros humanos frente a agentes indutores ou inibidores da apoptose?*

Resolvemos, no presente estudo, utilizar a estratégia de estudar sistematicamente as respostas apoptóticas de granulócitos maduros, do sangue periférico humano, que pode ser obtido sem maiores dificuldades, de voluntários saudáveis. Esta estratégia tem a vantagem de poder contar com uma extensa literatura prévia sobre granulócitos de ambos os tipos em sangue periférico, com a qual podemos comparar os nossos resultados.

Para testar a viabilidade desta estratégia, começamos avaliando os efeitos da dexametasona e do ATRA sobre neutrófilos e eosinófilos purificados do sangue humano. Nossa expectativa foi de que os resultados confirmassem a existência de padrões consistentes de resposta apoptótica, que pudessem ser correlacionados com a linhagem celular e o estágio de desenvolvimento estudados.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a resposta apoptótica de neutrófilos e eosinófilos humanos *in vitro* a um painel de agentes que sabidamente modulam a apoptose em eosinófilos imaturos de camundongo, procurando definir padrões de resposta linhagem e/ou estágio-específicos

2.2 Objetivos Específicos

Testar os efeitos do ATRA e da dexametasona, sozinhos ou combinados, cujo padrão de resposta em eosinófilos murinos já é conhecido.

REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Apoptose: Processos e Mecanismos Essenciais

A apoptose é a consequência visível de um complexo conjunto de mudanças bioquímicas na célula. Apesar do grande conhecimento acumulado sobre as várias moléculas e reações envolvidas, a descrição mais apropriada da apoptose ainda é baseada nas alterações morfológicas, visto que nenhum marcador bioquímico identificado é inteiramente específico (Hacker, 2000; Majno, 2004).

As principais características morfológicas da apoptose incluem a cariopicnose e cariorréxis, com perda de volume celular, vacuolização e fragmentação da célula (Hacker, 2000). Ambas estão associadas à fragmentação do DNA, à exteriorização de fosfatidilserina e à proteólise de vários substratos intracelulares por proteases especializadas (caspases) (Zimmermann *et al.*, 2001; Zimmermann e Green, 2001), processos que podem igualmente ser evidenciados por métodos microscópicos, como a imunofluorescência, sozinha ou complementada pela citometria de fluxo.

As principais mudanças morfológicas descritas na apoptose se passam rapidamente (numa escala de tempo de até uma hora), e incluem: a) a *redução do volume celular*, com um aumento na densidade do conteúdo da célula, arredondamento do corpo celular e retração dos contatos com as células vizinhas, às custas de vacuolização extensa do citoplasma, seguida de fusão dos vacúolos com a membrana celular, bombeamento de cátions e água para fora da célula, com uso de ATP, e ligação cruzada entre proteínas, em grande escala, pela ação de transglutaminases; b) a *condensação da cromatina*, que se torna muito densa (*cariopicnose*), separando-se em massas fortemente coradas, homogêneas, muitas vezes em forma de crescente colado à face interna da membrana nuclear, seguindo-se a fragmentação em massas distintas (*cariorexísis*); c) o *brotamento de corpos apoptóticos* na superfície celular, gerando estruturas envoltas por membrana, contendo proporções variáveis de material citoplasmático e nuclear, através de emissão e retração repetida de processos celulares curtos com um conteúdo denso. O resultado final destes processos é a condensação e fragmentação do conteúdo celular numa forma facilmente fagocitável, e cujo DNA não pode mais ser utilizado (Hacker, 2000; Majno, 2004; Samejima e Earnshaw, 2005).

Os diferentes *processos* listados acima ocorrem rapidamente, numa escala de tempo de até 1 hora. Contudo, alguns são perceptíveis mais precocemente. É o caso das mudanças na superfície celular (Martin *et al.*, 1995; Sheriff *et al.*, 2004), especialmente a repetida projeção e retração de processos, que já foi assimilada, com base em imagens de micro cinematografia, a uma dança da morte (Majno, 2004). Em contrapartida, alterações nucleares são perceptíveis um pouco mais

tardamente, e o padrão característico de degradação do DNA (em degraus de escada) pode só ser encontrado ainda mais tardiamente, ou mesmo estar ausente (Taylor *et al.*, 2001). A redução de volume celular se inicia rapidamente, e continua por toda a duração do fenômeno, com a compactação e desmonte atingindo o seu máximo na cariorrexis e na fratura em corpos apoptóticos.

A rapidez do processo global, e a eliminação do produto final por fagocitose, explicam porque, apesar da importância da morte celular programada, o aspecto morfológico de apoptose é relativamente raro na maioria dos cortes histológicos, exceto em circunstâncias nas quais uma taxa elevada de morte apoptótica facilita a sua detecção (como exemplo, podemos citar os *corpos tingíveis* nos centros germinativos dos linfonodos, resultantes da morte em larga escala de linfócitos B, e os *corpúsculos de Councilman*, característicos da febre amarela e de hepatite viral) (Sepiashvili, 2001).

Outra razão pela qual a apoptose não costuma chamar a atenção é o fato de não ser, via de regra, acompanhada de inflamação. Isto se explica pelo fato da membrana celular manter sua integridade durante todo o processo, evitando o vazamento indiscriminado do citossol para o meio extracelular, e pelo fato da célula exteriorizar na sua membrana sítios de ligação reconhecidos por receptores nas células fagocitárias (Giles *et al.*, 2000; Proskuryakov *et al.*, 2005). A fagocitose de células e corpos apoptóticos se faz por células residentes nos tecidos, especialmente macrófagos, e não por leucócitos infiltrantes (por exemplo, neutrófilos não costumam se acumular na vizinhança de células apoptóticas). Além disto, muitas observações indicam que a fagocitose de células apoptóticas leva os

fagócitos a secretarem citocinas com ações anti-inflamatórias e imunossupressoras, como o TGF- β (Savill *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1999; Caramori e Adcock, 2005; Riley, 2006).

Contudo, isto não deve ser entendido como uma norma absoluta: a apoptose pode, em certas circunstâncias, ser seguida de inflamação, e pode mesmo ser um estímulo potente para a reação inflamatória (Restifo, 2000): a) a apoptose induzida por certos patógenos é pró-inflamatória e imunogênica, havendo quem propusesse tratar-se de um fenômeno à parte, intitulado *piroptose* (Cookson e Brennan, 2001; Fink e Cookson, 2005); b) células apoptóticas que não são rapidamente fagocitadas, por qualquer razão, estão sujeitas a evoluir para uma necrose secundária, onde há perda de conteúdo citossólico para o exterior, e um grande potencial inflamatório e imunogênico (Sauter *et al.*, 2000; Savill *et al.*, 2002).

Isto deve servir para nos acautelar contra as generalizações, que tendem a separar, de um lado, um processo apoptótico, ou de morte celular programada, que nunca teria conseqüências inflamatórias, e, do outro lado, um processo necrótico, sempre visto como morte celular imprevisível, não-programada, que sempre teria conseqüências inflamatórias. Por exemplo, a morte celular que ocorre no curso da expansão clonal em linfócitos T é considerada um mecanismo fisiológico de regulação, finamente regulado, mas há evidências de que esta morte celular programada apresenta a morfologia característica de necrose, e é caspase-independente (Jaattela e Tschopp, 2003). Curiosamente, esta morte celular programada de morfologia necrótica apresenta, da mesma forma que a

apresentação mais freqüente de apoptose, mecanismos de eliminação eficiente das células mortas por fagocitose, e tende a minimizar a reação inflamatória.

A apoptose, nos seus traços mais fundamentais, é um processo altamente controlado de autodigestão celular. As moléculas efetoras críticas pertencem a uma família de cisteína-proteinases que clivam seus substratos nas ligações peptídicas contendo resíduos de aspartato, razão pela qual foram coletivamente designadas *caspases* (contração de cisteína-aspartato proteases) (Chang e Yang, 2000; Lavrik *et al.*, 2005).

Em cada célula suscetível de sofrer apoptose (o que corresponde, nos metazoários, a praticamente todas as células nucleadas) (Weil *et al.*, 1996), as caspases existem constitutivamente, mas se encontram numa forma de precursor inativo (zimogênio), que pode ser ativada por proteólise. As formas precursoras inativas são suscetíveis de clivagem por outras caspases em posições críticas para a sua ativação. Assim, as diferentes caspases podem servir de ativadoras para outras caspases. Como cada caspase apresenta um certo grau de especificidade na escolha de substratos, o resultado final é uma ativação em cascata, em vez de uma digestão indiscriminada (Chang e Yang, 2000; Lavrik *et al.*, 2005).

A seqüência de ativação fisiológica envolve alguns pontos de entrada na cascata, caracterizados pela ativação de caspases ditas *iniciadoras*, e alguns pontos nos quais a ativação da cascata leva irreversivelmente à morte celular, que envolvem a ativação das caspases ditas *efetoras*, das quais a caspase 3 é uma das mais importantes (Chang e Yang, 2000; Lavrik *et al.*, 2005). As caspases efetoras

degradam diretamente uma variedade de substratos não-pertencentes à família das caspases. Estes incluem lamina (a proteína do arcabouço nuclear), componentes do citoesqueleto como gelsolina, actina e fodrina, e enzimas de reparação do DNA. Todas estas mudanças regressivas favorecem o desmonte da célula e da organização nuclear, permitindo a redução do volume celular que é tão característica da apoptose.

Além de inativar proteínas por degradação, as caspases efetoras também ativam outras enzimas não-caspases: é o caso da endonuclease CAD (da sigla para Caspase-Activated DNase, ou *DNase ativada por caspase*), cuja ativação resulta da inativação da proteína regulatória iCAD (da sigla para *inhibitor of CAD*) (Enari *et al.*, 1998). Esta endonuclease apresenta um padrão característico de ataque ao DNA cromossomial, concentrado nas regiões internucleossomais, resultando em fragmentos de tamanho variável, mas com tamanho aproximadamente proporcional a um número inteiro de nucleossomas (ou seja, contendo um ou mais trechos de DNA de aproximadamente 200 pares de bases).

O padrão inconfundível de degradação do DNA pela CAD fornece a base para um dos métodos preferidos de detecção da apoptose, conhecido pela sigla TUNEL (abreviatura de terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated deoxyuridine triphosphate nick end labeling reaction). Neste método, a enzima terminal desoxinucleotidil transferase (TdT) é utilizada para incorporar ao DNA nucleotídeos biotinilados, que podem ser detectados por métodos citoquímicos à base da reação com avidina, seguida de diferentes métodos de revelação. A incorporação do marcador no DNA se faz seletivamente nos pontos em que a

molécula foi cortada pela ação da endonuclease, e, portanto, a marcação é tanto mais intensa quanto maior o grau de degradação internucleossomal.

Apesar do papel central das caspases no processo apoptótico, a evidência acumulada indica que a apoptose também pode ocorrer de forma caspase-independente, ou seja, que mecanismos redundantes asseguram que algumas células possam chegar ao mesmo resultado final – compactação, desmonte do citoesqueleto, destruição dos cromossomos, degradação do DNA, fragmentação do núcleo e exteriorização de ligantes para receptores em fagócitos – mesmo quando as caspases são bloqueadas. Esses sistemas proteolíticos redundantes incluem várias serina-proteases e as proteases do sistema de proteassomas (Sepiashvili, 2001). Vários estudos têm ainda evidenciado atividades pró-apoptóticas para outras proteínas da célula, que só são detectáveis quando as caspases estão inibidas, indicando a possibilidade de vias efetoras alternativas (Modjtahedi *et al.*, 2006).

A apoptose pode ter evoluído sob pressões seletivas que envolvem tanto a regulação de populações celulares em organismos multicelulares na ausência de infecção (isto é, pressões ligadas ao processo de desenvolvimento) quanto a eliminação de células infectadas por vírus (ou seja, pressões ligadas aos fenômenos da infecção e da imunidade). Esta suposição é consistente com o alto grau de conservação dos mecanismos bioquímicos fundamentais da apoptose, e com o fato de que a mesma família de proteínas efetoras desempenha papéis na imunidade em organismos multicelulares muito distintos (Medzhitov e Janeway, 1998; Vaux e Korsmeyer, 1999).

Em alguns casos de infecção, como nas viroses, o mesmo processo celular básico pode ser iniciado por diferentes mecanismos (Moss *et al.*, 1999; Krzyzowska *et al.*, 2000; Best e Bloom, 2004; Polster *et al.*, 2004; Wowk e Trapani, 2004; Clarke *et al.*, 2005; White, 2006).

Células infectadas por vírus podem entrar em apoptose como um mecanismo de defesa do organismo que impeça a propagação da infecção, ao abortar os processos de síntese e montagem dos componentes do vírion; mais adiante, o mesmo processo celular pode ser iniciado de fora para dentro da célula, pela atuação dos componentes secretados pelas células NK, que coordenam boa parte da imunidade inata às infecções virais; finalmente, o mesmo processo pode ser iniciado de fora para dentro, desta vez como parte da resposta imune adaptativa, por linfócitos T citotóxicos que reconhecem peptídeos apresentados na superfície da célula infectada, em associação com moléculas de Classe I do Complexo Principal de Histocompatibilidade (Trapani *et al.*, 2000; Trambas e Griffiths, 2003).

A importância do processo de apoptose para o sucesso da defesa antiviral é bem evidenciada pela diversidade de mecanismos pelos quais diferentes classes de vírus procuram escapar a esta estratégia de defesa do hospedeiro, bloqueando os mecanismos intracelulares de apoptose, ou até mesmo tirando proveito da apoptose para servir às suas próprias estratégias de escape (Krzyzowska *et al.*, 2000; Gougeon, 2003; Polster *et al.*, 2004; White, 2006).

No contexto das infecções bacterianas, consideravelmente menos é sabido sobre o processo de apoptose induzido pelo patógeno, embora algumas bactérias patogênicas contenham fatores de virulência associados ao desencadeamento do processo apoptótico (Chen e Zychlinsky, 1994; Moss *et al.*, 1999; Weinrauch e Zychlinsky, 1999; Gao e Abu Kwaik, 2000; Gao e Kwaik, 2000; Deleo, 2004; Barry e Beaman, 2006). No entanto, a importância da apoptose como mecanismo de controle, no caso das células de defesa que nos permitem resistir às infecções bacterianas, é indiscutível.

3.2 Apoptose: Fases, Vias e Controles de Ativação de Caspases

A chave do entendimento de como a apoptose é regulada reside no processo de ativação das caspases. Como a maquinaria enzimática necessária para que ocorra apoptose, incluindo as caspases, é produzida constitutivamente (Weil *et al.*, 1996; Chang e Yang, 2000; Lavrik *et al.*, 2005), a necessidade de expressão gênica e de síntese de novas proteínas para que ocorra apoptose, observada na resposta apoptótica a uma variedade de estímulos reflete, provavelmente, requerimentos de regulação, e não de atividade efetora (Sepiashvili, 2001).

Embora algumas caspases sejam ativadas por outras, as que se encontram no topo da cascata são ativadas por estímulos provenientes do meio externo ou interno, através da atuação de elementos adaptadores (Vaux, 2001; Lavrik *et al.*, 2005). Tais proteínas adaptadoras ligam os elementos da cascata de caspases com os dois compartimentos estruturais da célula que funcionam como emissores de sinais críticos na iniciação da apoptose: a) a *membrana celular*, onde estão

localizados receptores capazes de transduzir sinais pró- e anti-apoptóticos (Wallach, 1996; Ashkenazi e Dixit, 1998; Akgul e Edwards, 2003), e b) o espaço entre a membrana externa e a membrana interna das mitocôndrias, onde se encontram armazenados, numa forma latente, fatores pró-apoptóticos potentes (Hengartner, 2000; Peachman *et al.*, 2001; Bouchier-Hayes *et al.*, 2005; Lakhani *et al.*, 2006; Skulachev, 2006).

Por outro lado, o processo de apoptose é conectado com uma grande parte dos processos essenciais ao bom funcionamento da célula, como a síntese de proteínas, o reparo de DNA e a divisão celular (O'Connor *et al.*, 2000). Estes processos se passam em outros locais da célula, e, portanto, devem se comunicar com os dois compartimentos mencionados acima .

A apoptose é, por exemplo, acessível à regulação por proteínas de choque térmico, e, portanto reflete o nível de estresse a que está submetida à célula (Beere e Green, 2001); da mesma forma, a apoptose é regulada através da ubiquitinação de algumas das proteínas regulatórias mais importantes, permitindo aos sistemas que respondem a mudanças na síntese de proteínas da célula, no contexto da infecção, estresse e exposição a citocinas inflamatórias, modularem a apoptose (Yang e Yu, 2003). A apoptose é desencadeada por processos que causam estresse bioquímico no retículo endoplasmático (Xu *et al.*, 2005; Szegezdi *et al.*, 2006), assim como por processos que causam dano ao DNA cromossomal (Rich *et al.*, 2000).

As vias e as moléculas que asseguram a comunicação entre estes diversos sítios subcelulares, influenciando a apoptose, ainda estão sendo definidas (Le Bras

et al., 2006). Sabemos que a proteína p53, muito importante como supressor tumoral, tem, entre muitos efeitos, retardar a divisão celular, permitindo à célula realizar os reparos necessários no DNA, ou entrar em apoptose, caso o reparo se revele impraticável (Rich *et al.*, 2000; Roos e Kaina, 2006). Portanto, p53 atua como uma destas vias de comunicação, podendo levar a desfechos distintos, dependendo do contexto (viabilidade ou inviabilidade do reparo das lesões no material genético).

Outro elemento celular importante que atua coordenando expressão gênica e apoptose é o NF-kB (Hoffmann e Baltimore, 2006). NF-kB é ativado em seguida a uma grande variedade de agressões à célula, incluindo a exposição aos metabólitos reativos de oxigênio que são produzidos por leucócitos, radiação ultravioleta, infecção viral e bacteriana, e citocinas inflamatórias, como IL-1 e TNF. Este fator de transcrição, presente no citoplasma em forma de complexo pré-formado com um inibidor, I - kB, pode ser liberado para atuar no núcleo, induzindo a expressão de um grande número de genes-alvo, se I - kB for fosforilado (no caso, por um complexo enzimático denominado IKK, sigla de I - kB cinase) (Castro-Alcaraz *et al.*, 2002) e direcionado para degradação em proteassomas, através de ubiquitinação. NF-kB atua, em princípio, como um fator de sobrevivência, e, portanto, se opõe à indução de apoptose (Duckett, 2002). Contudo, o desfecho final vai depender do predomínio de NF-kB sobre os fatores pró-apoptóticos (Bannerman *et al.*, 2002).

Os receptores da superfície celular que dão início à cascata de ativação de caspases são conhecidos pelo rótulo de *receptores de morte*, embora em princípio eles possam servir a muitos processos, além de induzir morte celular em circunstâncias específicas.

Estudos imunológicos evidenciaram pela primeira vez um dos mecanismos celulares de iniciação da apoptose, quando foi observado que um tipo específico de doença linfoproliferativa em camundongos estava associada à propensão a desenvolver manifestações auto-imunes, sendo ambas as características explicadas pela ausência, nos animais afetados, da sinalização fisiológica através do receptor CD95 (Fas) e do seu ligante (Watanabe-Fukunaga *et al.*, 1992). Hoje, a importância do par CD95-CD95L na indução de apoptose em muitos tipos celulares está plenamente estabelecida, e este par representa o protótipo dos chamados *Receptores de Morte*, (Tibbetts *et al.*, 2003), discutidos na seção 2.1.

No caso de CD95 (Fas), que permanece sendo um dos receptores de morte mais estudados, a associação do mesmo ao seu ligante, na face externa da membrana celular, cria condições para o recrutamento, na face interna da mesma membrana, de uma proteína adaptadora, denominada FADD (sigla de Fas-associated Death Domain Protein). A associação se faz pela interação de domínios homólogos em CD95 e FADD (os chamados Domínios de Morte, ou DD, sigla de Death Domains). Através desta associação inicial, o receptor se torna capaz de recrutar caspase-8. Este recrutamento se faz, igualmente, através de uma interação dependente de domínios homólogos – no caso, os chamados *Domínios Efetores de Morte* (DED, sigla de Death Effector Domains) (Wallach, 1996; Tibbetts *et al.*, 2003). O recrutamento de caspase-8 para o receptor leva à sua ativação.

FADD foi descrito, inicialmente, como um adaptador indispensável à iniciação da ativação das caspases pela agregação de CD95. Contudo, alguns

estudos demonstram que FADD atua como um importante regulador da ativação de NF- κ B por estímulos extracelulares, como o LPS e a IL-1 β (Bannerman *et al.*, 2002; Duckett, 2002). Conseqüentemente, a ativação de FADD determina, em parte, a eficiência com a qual estes estímulos promoverão a sobrevivência celular, impedindo a apoptose.

Situação semelhante se observa com o receptor de tipo 1 para o TNF (TNFR1). O receptor é uma proteína da mesma família gênica que o CD95, e o seu mecanismo de ativação é muito semelhante, pois envolve a trimerização do receptor por um ligante trimérico (Wallach, 1996; Tibbetts *et al.*, 2003). O TNFR1 recruta, além de FADD, a proteína adaptadora TRADD (sigla de TNF receptor-associated death domain protein). TRADD leva à ativação de NF- κ B, enquanto FADD induz apoptose. O balanço destas atividades contraditórias define o desfecho da estimulação do receptor (Duckett, 2002).

A ativação das caspases pode ocorrer em conseqüência de processos que envolvem apenas a estimulação de receptores, ou, alternativamente, como resultado de perturbações inicialmente restritas à mitocôndria; contudo, na maior parte das células que sofrem apoptose, as duas vias contribuem para a evolução do processo.

Em muitos casos, receptores de superfície celular dão início à cascata de caspases, mas a morte celular só acontece depois que as mitocôndrias são recrutadas, amplificando consideravelmente o processo (Skulachev, 1999; Desagher e Martinou, 2000). A lesão das mitocôndrias aumenta a permeabilidade das suas membranas, com uma dissipação do potencial transmembrana da mitocôndria. A

perda de integridade da membrana externa da mitocôndria leva à passagem de citocromo C para o citossol (Crompton, 2000). O citocromo C é um potente ativador de caspases, e participa da formação de um complexo macromolecular conhecido como Apoptossoma (Vaux, 2001; Lavrik *et al.*, 2005).

A dependência em relação às mitocôndrias permite, inclusive, distinguir dois tipos de morte induzida por CD95. Nas células que sofrem apoptose do tipo 1, a contribuição da mitocôndria é dispensável, ou seja, a mitocôndria apenas amplifica um sinal de membrana que já é suficiente; em contraste, nas células que sofrem apoptose do tipo 2, as mitocôndrias são necessárias, mostrando que o sinal de membrana é necessário mas não suficiente. Os dois tipos de apoptose induzida por Fas podem ser distinguidos pela eficiência da ativação de caspase 8 (Scaffidi *et al.*, 1998).

A evidência existente permite distinguir 3 fases na ativação de caspases, como se segue (Sepiashvili, 2001):

Uma fase de *iniciação*, ou *pré-mitochondrial*, causada por vários agentes lesivos, como aqueles que danificam o DNA (Rich *et al.*, 2000) ou por interações ligante-receptor, como TNF/TNFR1, ou CD95L/CD95;

Uma fase *efetora* ou *mitochondrial*, caracterizada pelo dano às membranas interna e externa da mitocôndria, depleção de ATP e dissipação da diferença de potencial entre a mitocôndria e o exterior (Skulachev, 2006);

Uma fase de *degradação*, ou *pós-mitocondrial*, durante a qual fatores apoptogênicos liberados do espaço inter-membranar da mitocôndria ativam nucleases e proteases, incluindo as caspases efetoras.

A caspase 3 desempenha um papel de caspase efetora, ou seja, é essencial para a fase pós-mitocondrial. Contudo, existe igualmente evidência de que a caspase 3, uma vez ativada, também clive e ative as caspases situadas mais alto na cascata, gerando alças amplificadoras. É possível, no entanto, que a contribuição da caspase 3 aos eventos na fase mitocondrial sejam maiores do que o sugerido pela idéia de alça amplificadora, visto que camundongos geneticamente modificados, deficientes em caspase 3 e 7, são extremamente resistentes à indução de apoptose por mecanismos mitocondriais (Lakhani *et al.*, 2006).

O papel central da mitocôndria na regulação da apoptose é também devido aos reguladores negativos que atuam diretamente sobre os mecanismos mitocondriais de apoptose. O produto do oncogene *bcl-2*, que promove a sobrevivência de alguns tipos de células cancerosas, é uma proteína transmembrana, encontrada na membrana mitocondrial, na membrana nuclear e no retículo endoplasmático, onde também se localiza uma proteína, denominada *bax*, cujo gene pertence à mesma família que o de *bcl-2*. Enquanto *bcl-2* impede a apoptose, *bax* promove apoptose. A sensibilidade à inibição por *bcl-2* e proteínas similares define a fase mitocondrial da apoptose (Hinds e Day, 2005; Letai, 2005).

O mecanismo destas ações anti- ou pró-apoptóticas parece envolver a inserção destes produtos na membrana externa da mitocôndria, e a regulação da

permeabilidade desta membrana, permitindo ou não que fatores pró-apoptóticos, como o citocromo C, passem para o citossol. As proporções relativas de *bcl-2* e *bax* presentes na célula são um fator decisivo para determinar se uma célula entrará ou não em apoptose (a situação é, na realidade, mais complexa, pois existem outros membros da mesma família de proteínas, como *bid*, *bad*, e *bcl-xL*, que também influenciam o resultado final, atuando aparentemente no mesmo sítio e por mecanismo similar) (Crompton, 2000; Desagher e Martinou, 2000; Hinds e Day, 2005).

O citocromo C, normalmente restrito ao espaço entre as membranas mitocondriais, quando liberado no citoplasma, reage com co-fatores aí presentes de forma constitutiva, e dá início à ativação da cascata de caspases, com a nucleação de um apoptossoma. O principal co-fator é a proteína *Apaf-1* (sigla de Apoptosis activating factor-1) (Hinds e Day, 2005), que se associa individualmente com moléculas de citocromo C, e, em seguida, com consumo de energia metabólica, participa da nucleação de uma estrutura hexamérica, composta de seis pares *Apaf-1/citC* interligados, a qual pode em seguida recrutar caspase 9 do citossol, formando uma estrutura enzimaticamente ativa, o apoptossoma (Hengartner, 2000; Hinds e Day, 2005).

Como estes co-fatores são também reconhecidos por *bcl-2*, e demais membros anti-apoptóticos da mesma família, o seqüestro de co-fatores citossólicos representa um mecanismo secundário de inibição da fase pós-mitocondrial. O processo pode ser, ainda nesta fase, também inibido pela ação de proteínas

inibidoras da apoptose (IAPs, sigla de inhibitors of apoptosis), como *cIAP*, *xIAP*, e outras.

O exposto acima, mesmo que em linhas esquemáticas, deve tornar claras algumas das características mais importantes do processo de apoptose: a) a sua complexidade, com múltiplos alvos de regulação; b) a sua integração com vias de sinalização envolvidas na resposta (não-apoptótica) a outros estímulos; c) a sua *sensibilidade* tanto a estímulos positivos (agentes que induzem apoptose) como a estímulos negativos (agentes que previnem a apoptose, através de reforçar troficamente a produção de inibidores da ativação de caspases); e d) a sua flexibilidade, permitindo respostas graduadas em função da intensidade de estimulação em cada via.

3.3 Granulócitos: Homeostase e Mecanismos de Interação com o Microambiente

Em condições normais (*steady-state*), os números de granulócitos presentes na circulação e nos tecidos são precisamente regulados (Hogan e Rothenberg, 2006; Rothenberg e Hogan, 2006; Christopher e Link, 2007). Tanto neutrófilos como eosinófilos são células cuja longevidade é estreitamente controlada por mecanismos genéticos, de tal forma que, em condições normais, elas entram em apoptose espontaneamente (Iwai *et al.*, 1994; Akgul *et al.*, 2001). O nível de expressão de *bcl-2* em neutrófilos é muito baixo, o que poderia contribuir para a sua tendência a entrar espontaneamente em apoptose (Iwai *et al.*, 1994).

A superfície de um granulócito responde a uma extraordinária variedade de sinais, originários em muitas classes distintas de receptores, e transmitindo informação através de muitas vias intracelulares diferentes. No caso dos neutrófilos, que são os mais abundantes e os mais estudados, as diferentes classes de receptores já descritas incluem:

- a) *Toll-like receptors*, sensíveis à presença de produtos microbianos, como o LPS de bactérias Gram-negativas, e componentes de superfície de bactérias Gram-positivas (Nagase *et al.*, 2003; Parker *et al.*, 2005);
- b) *integrinas* (Lindbom e Werr, 2002; Tachimoto *et al.*, 2002; Zen e Parkos, 2003; Mayadas e Cullere, 2005), essenciais para a migração rumo aos tecidos infectados, assim como para a atividade microbicida das células, selectinas e moléculas de adesão celular (Kishimoto e Rothlein, 1994; Smith, 2000; Medan *et al.*, 2002; Zen e Parkos, 2003);
- c) receptores para *fragmentos citofílicos derivados de C3*, envolvidos na imuno-aderência e na opsonização de microorganismos (Ehrengruber *et al.*, 1994; Zwirner *et al.*, 1999; Rooijackers *et al.*, 2005);
- d) receptores para *fatores solúveis derivados de C3 e C5*, especialmente C5a, envolvidos na quimiotaxia (Ehrengruber *et al.*, 1994; Jagels *et al.*, 1995; Allendorf *et al.*, 2005; Cecic *et al.*, 2006; Discipio *et al.*, 2006);
- e) receptores para mediadores lipídicos derivados de fosfolipídios de membrana, como o *Fator Ativador de Plaquetas*, ou PAF, o *Leucotrieno B4* (LTB₄) e *prostanóides* (Lorant *et al.*, 1991; Wheeldon e Vardey, 1993; Kanamori *et al.*, 1997; Tager e Luster, 2003; Kato *et al.*, 2004; Gaudreault *et al.*, 2005);

- f) receptores para *bradicinina*, derivada da ativação dos sistemas plasmáticos de fase fluida, como resultado da ação de proteases microbianas, venenos ou enzimas liberadas por células inflamatórias, como mastócitos, basófilos ou os próprios neutrófilos (Rajasekariah *et al.*, 1998; Paegelow *et al.*, 2002);
- g) receptores para peptídeos quimiotáticos, como o *formil-metionil-leucil-fenilalanina* (f-met-leu-phe, fmlp), que respondem a fragmentos derivados de proteínas bacterianas nascentes ou degradadas parcialmente (Fulop *et al.*, 2004; Durr *et al.*, 2006; Fulda e Debatin, 2006; Selvatici *et al.*, 2006);
- h) receptores para citocinas inflamatórias, como o *Fator de Necrose Tumoral* (TNF) e a *Interleucina-1* (IL-1), que atuam não somente promovendo a migração celular como ativando uma série de outras funções celulares importantes na defesa (Borish *et al.*, 1990; Ferrante, 1992; Akgul e Edwards, 2003; Walmsley *et al.*, 2004; Van Leeuwen *et al.*, 2005; Cowburn *et al.*, 2006; Kato *et al.*, 2006);
- i) receptores ativados por proteases (Protease-activated receptors, PARs), que respondem ao ambiente proteolítico em que estas células freqüentemente estão imersas, nos focos de inflamação em que tanto os microorganismos como as células de defesa funcionam como fontes de proteases (Howells *et al.*, 1997; Ossovskaya e Bunnett, 2004; Bunnett, 2006);
- j) receptores para citocinas anti-inflamatórias, como a *Interleucina-10* (IL-10) e o *Fator de Crescimento Transformante do tipo beta* (TGF- β) (Reibman *et al.*, 1991; Laichalk *et al.*, 1996; Ghio *et al.*, 2003; Dang *et al.*, 2006);

k) receptores intracelulares e nucleares (Wang *et al.*, 2004) para hormônios glicocorticóides (Gordon *et al.*, 1979; Birgens *et al.*, 1984; Spik *et al.*, 1994; Levy, 1996), hormônios tireoidianos (Balazs *et al.*, 1992; Kiss *et al.*, 1997), vitamina D (Takahashi *et al.*, 2002), retinóides (Mehta, 2002; Walkley *et al.*, 2002) incluindo o ácido retinóico all-trans (all-trans retinoic acid, ou, abreviadamente, ATRA), e os ligantes da família dos receptores ativados por proliferadores de peroxissomas, ou PPARs (Ueki *et al.*, 2004; Standiford *et al.*, 2005).

Esta lista de receptores específicos não esgota as possibilidades de interação altamente seletiva do neutrófilo com seu microambiente. Devemos lembrar que o neutrófilo é igualmente responsivo a mediadores que se encontram na fase fluida, e com os quais eles interagem de formas sofisticadas, aumentando a sua atividade microbicida. Como exemplo, basta citar as colectinas, além da lisozima e da lactoferrina (Savill *et al.*, 1989), três componentes da fase fluida cuja atuação sinergiza com a dos neutrófilos.

Neutrófilos têm uma meia-vida muito curta na circulação (8-20h); contudo, esta pode ser estendida grandemente se entrarem num sítio inflamatório ou entrarem em contato com agentes infecciosos (Akgul *et al.*, 2001). Em condições normais, apenas uma pequena fração dos neutrófilos existentes no organismo se encontra na circulação, e a grande maioria constitui uma reserva de rápida mobilização na medula óssea. Os neutrófilos só entram nos tecidos num contexto inflamatório, e na dependência de CD18 (Kishimoto *et al.*, 1987; Babior, 1992; Kishimoto e Rothlein, 1994; Bochner, 2000; Chin e Parkos, 2006). Não havendo

passagem para sítios inflamatórios, os neutrófilos são direcionados para o baço, fígado e medula óssea, onde sofrem apoptose e são eliminados por células fagocíticas residentes (Christopher e Link, 2007).

Parte do efeito de extensão da sobrevivência observado após a passagem para sítios de inflamação é atribuído às interações envolvendo proteínas de adesão, especialmente integrinas (Roos e Kaina, 2006); contudo, grande parte é atribuída aos efeitos do microambiente no sítio inflamado, incluindo hipóxia, produtos microbianos, citocinas e outros mediadores da inflamação (Colotta *et al.*, 1992; Hannah *et al.*, 1995; Akgul *et al.*, 2001; Mecklenburgh *et al.*, 2002; Simon, 2003; Francois *et al.*, 2005; Sabroe *et al.*, 2005). Todos estes fatores estão ausentes se não houver infecção, ou inflamação de origem não-infecciosa; conseqüentemente, a presença de neutrófilos num tecido costuma ser indicativa de inflamação, ao contrário do que ocorre com eosinófilos, que podem estar presentes normalmente nos tecidos, especialmente no trato digestivo e outras superfícies expostas ao meio ambiente (Rothenberg *et al.*, 2001).

A apoptose em neutrófilos e sua remoção por macrófagos residentes no tecido são processos estreitamente coordenados (Walker *et al.*, 2005). O mesmo ocorre com eosinófilos (Simon, 2001).

Interessantemente, enquanto produtos liberados por patógenos costumam retardar a apoptose em granulócitos, a ingestão dos patógenos propriamente ditos costuma ter efeito contrário, promovendo a apoptose (Kobayashi e Deleo, 2003). Parte deste efeito pode ser devido ao surto respiratório que se segue à fagocitose, o

qual gera intermediários reativos de oxigênio que aceleram a apoptose espontânea em neutrófilos (Coxon *et al.*, 1996). A relação entre intermediários reativos de oxigênio e apoptose, contudo, é complexa, pois eles inibem as caspases, que são altamente sensíveis ao potencial redox do microambiente (Fadeel *et al.*, 1998).

Como a apoptose de neutrófilos é acompanhada pela perda de expressão de proteínas de superfície (CD31, CD50, CD66acde, CD66b, CD63 e CD87) e receptores (CD15, CD16, CD32, CD35, CD88, CD120b), e como os neutrófilos apoptóticos são incapazes de respostas fisiológicas, como a migração, geração de um surto respiratório ou desgranulação (Akgul *et al.*, 2001; Nusbaum *et al.*, 2004; Nusbaum *et al.*, 2005), o resultado desta interação entre programa genético e estímulo ambiental é que a atividade funcional é rapidamente seguida de inativação permanente da célula.

É possível que tal aceleração do processo de apoptose seja um mecanismo de proteção para o organismo, visto que uma célula desativada não pode ser seqüestrada para servir às estratégias de sobrevivência do parasito (Gao e Abu Kwaik, 2000). Assim, a morte celular programada do neutrófilo pode impedir que microorganismos ingeridos pelos granulócitos tenham tempo de atuar sobre o mesmo, subvertendo os seus mecanismos microbicidas através de processos dependentes de regulação gênica e síntese protéica.

É importante compreender, neste contexto, que a morte celular não termina a atividade microbicida do neutrófilo, pois este, após entrar em morte celular programada com a ativação do surto respiratório, pode ainda exteriorizar parte do

seu conteúdo nuclear e granular, formando as chamadas armadilhas extracelulares do neutrófilo (Fuchs *et al.*, 2007), que asseguram a captura e imobilização de microorganismos, mesmo que o neutrófilo já tenha morrido.

A resolução da inflamação parece depender da indução de apoptose nos granulócitos infiltrantes, seguida da sua ingestão por macrófagos. Uma remoção inadequada das células apoptóticas pode permitir sua necrose secundária, causando dano tecidual e amplificando e/ou cronificando a inflamação (Walsh *et al.*, 2003; Walker *et al.*, 2005). O estudo dos mecanismos intracelulares de apoptose em granulócitos, portanto, é de grande importância prática pelo seu potencial em fornecer novas estratégias de tratamento da inflamação, de especial interesse em patologias crônicas, como a asma e a artrite reumatóide.

3.4 Peculiaridades do Processo de Apoptose em Granulócitos

Neutrófilos exprimem CD95 na sua superfície (Iwai *et al.*, 1994; Watson *et al.*, 1999), e podem entrar em apoptose se este for agregado por reagentes específicos, incluindo CD95L, que suscitou a hipótese de que interações CD95-CD95L entre neutrófilos em sítios de inflamação contribuíssem para a regulação dos números de células presentes. Contudo, relatos iniciais da expressão de CD95L em neutrófilos não foram confirmados por estudos mais recentes. Estudos bioquímicos sugeriram que a apoptose espontânea em neutrófilos envolvia ativação de caspase-8, sugerindo um envolvimento de CD95, mesmo na ausência de CD95L, graças à sua redistribuição em balsas lipídicas (*lipid rafts*) nas fases iniciais do processo (Scheel-Toellner *et al.*, 2004). Contudo, camundongos deficientes em CD95 ou CD95L não

apresentam números anormalmente elevados de neutrófilos; assim, a significação fisiológica desta via em neutrófilos ainda não foi estabelecida (Akgul *et al.*, 2001).

Por outro lado, o papel das mitocôndrias na apoptose em granulócitos é tão importante que, esta é a única função conhecida da mitocôndria nestas células, já que a função respiratória da organela foi perdida (Watson *et al.*, 1999; Peachman *et al.*, 2001; Maianski *et al.*, 2002; Maianski *et al.*, 2004a), fazendo com que, até algum tempo atrás, a própria existência de mitocôndrias em granulócitos fosse uma questão controvertida (Borregaard e Herlin, 1982).

A apoptose em neutrófilos é dependente da densidade celular, e este efeito não está relacionado com a aderência mediada por integrinas $\beta 2$ (Hannah *et al.*, 1998).

É igualmente dependente da temperatura: a baixa da temperatura a 15°C impede a progressão da apoptose em neutrófilos, mesmo quando esta foi adequadamente iniciada (Pryde *et al.*, 2000).

Parece depender, igualmente, da geração de oxidantes, especialmente H_2O_2 , nas fases iniciadoras (Vissers e Hampton, 2004).

O processo é estritamente dependente da via mitocondrial, e envolve as caspases 8, 9 e 3 (Watson *et al.*, 1999; Alvarado-Kristensson *et al.*, 2004). Contudo, em camundongos deficientes para caspase-1, a apoptose de neutrófilos é diminuída, e a intensidade da resposta inflamatória pulmonar ao LPS é aumentada (Rowe *et al.*,

2002). Como esperado, os fatores de crescimento hematopoiéticos em geral, e o G-CSF em especial, inibem a apoptose em neutrófilos; no caso do G-CSF, ocorre inibição da ativação de caspase 3 pela via mitocondrial (Marianski *et al.*, 2002).

Um dos elementos de controle de maior importância para a apoptose em neutrófilos é a proteína anti-apoptótica Mcl-1 (sigla de *myeloid cell leukemia 1*), um membro da família do bcl-2 (Akgul *et al.*, 2001); o aumento de Mcl-1 é um dos mecanismos pelos quais produtos microbianos aumentam a sobrevivência de neutrófilos (Francois *et al.*, 2005). A degradação de Mcl-1 é, por outro lado, uma das maneiras pelas quais os proteassomas podem participar do processo de apoptose (Derouet *et al.*, 2004; Vlahakis e Badley, 2006).

Em geral, mediadores da inflamação tendem a prolongar a vida útil dos neutrófilos. Isto inclui as citocinas IL-1, IL-2, TNF, IL-15, IFN- γ , G-CSF, e GM-CSF (Brach *et al.*, 1992). A IL-8 pode também antagonizar a apoptose de neutrófilos mediada pelos receptores CD95 e TNF-R1 (Akgul *et al.*, 2001; Akgul e Edwards, 2003).

Produtos microbianos, e em especial, aqueles que ativam Toll-like receptors, costumam prolongar a vida útil dos neutrófilos (Akgul *et al.*, 2001). Neste caso, o mecanismo deve envolver tanto a estimulação direta (TLR-4 > MyD88 > IRAK) como a indireta (IL-1 β R > MyD88 > IRAK; TNF-R1 > TRADD > TRAF2), ambas resultando na ativação de NF- κ B. Contudo, ao inibir a apoptose em neutrófilos, o LPS pode aumentar a frequência com que entram em necrose primária (Turina *et al.*, 2005).

Agentes que atuam através de NF- κ B têm importantes efeitos sobre a apoptose em neutrófilos humanos (Ward *et al.*, 1999a; Akgul *et al.*, 2001; Castro-Alcaraz *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2003); é o caso da gliotoxina (Ward *et al.*, 1999a). Em neutrófilos, I - κ B foi encontrado no núcleo, em condições basais, sugerindo que funcione como uma salvaguarda adicional, para atenuar a indução de genes-alvo pelo NF- κ B, e, portanto assegurar que a sobrevivência só será aumentada na presença de forte translocação nuclear de NF- κ B (Vancurova *et al.*, 2001). Peptídeos quiméricos capazes de translocação através da membrana foram utilizados para suprimir a ativação de NF- κ B, ao aumentar os níveis intracelulares de I- κ B, com importantes efeitos anti-inflamatórios (Blackwell *et al.*, 2004). O efeito anti-apoptótico da hipóxia sobre o neutrófilo é mediado por NF- κ B (Walmsley *et al.*, 2005).

Outro elemento importante na extensão da sobrevivência de neutrófilos é a p38-MAP cinase (Alvarado-Kristensson *et al.*, 2004), que se associa às caspases 3 e 8, inativando, por fosforilação, estes elementos críticos da cascata apoptótica. Contudo, foi relatado que a p38 MAP cinase é menos importante do que a ERK1/2 na extensão da longevidade dos neutrófilos em resposta ao TNF (Kilpatrick *et al.*, 2006). Tanto MAP cinase como ERK podem desempenhar papéis importantes na apoptose espontânea, na apoptose induzida pela fagocitose e induzida por TNF ou por cicloheximida (ver abaixo), visto que são clivadas precocemente durante estes dois processos, por enzimas distintas das caspases às quais se associam (Suzuki *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2003).

Existe igualmente evidência implicando a PI3K e Akt na sobrevivência de neutrófilos (Webb *et al.*, 2000; Lindemans e Coffey, 2004). Em camundongos

geneticamente deficientes em PI3K γ , a apoptose de neutrófilos se encontra acelerada *in vivo* (Yang *et al.*, 2003). A interação (cross-talk) entre PI3K e as demais vias de sinalização mencionadas acima é muito importante, sendo essencial para o efeito anti-apoptótico do Interferon- α (Wang *et al.*, 2003).

Outro agente que tanto pode induzir apoptose (Murray *et al.*, 1997; Salamone *et al.*, 2001; Salamone *et al.*, 2004) como inibi-la (Walmsley *et al.*, 2004) é o TNF. O contexto celular tem grande influência sobre a resposta ao TNF (Ward *et al.*, 1999b; Salamone *et al.*, 2004; Cowburn *et al.*, 2006). É de especial interesse que, em condições específicas, TNF sinergize com uma ampla variedade de estímulos farmacológicos, inflamatórios e citocinas (incluindo complexos imunes, zimosan, éster de forbol, C5a, f-MLP, GM-CSF e IL-1, todos eles dotados de potentes ações anti-apoptóticas quando analisados isoladamente) para promover apoptose acelerada em neutrófilos. Esta aceleração envolve: a) as caspases 3, 8 e 9; b) a participação de Mac-1 (CD11b, CD18); c) a dissipação do potencial transmembrana da mitocôndria, e d) a perda de expressão de Mcl-1 (Salamone *et al.*, 2004). Curiosamente, a morte celular induzida em neutrófilos por TNF sozinho parece ser uma combinação de processos caspase-dependentes e caspase-independentes (Maianski *et al.*, 2003). A passagem do neutrófilo para os tecidos parece estar associada a uma inibição na expressão de receptores para TNF, e, presumivelmente, a uma perda da sensibilidade à indução de apoptose por esta citocina (Seely *et al.*, 1998).

Como ocorre em muitos outros contextos, os efeitos do NO sobre a apoptose em granulócitos são complexos (Taylor *et al.*, 2003), pois dependem da sua

concentração, assim como da cinética de sua liberação e da presença de outros agentes no sistema. Peroxinitrito induz apoptose em neutrófilos humanos (Taylor *et al.*, 2004).

3.5 Moduladores Farmacológicos da Apoptose

A apoptose em neutrófilos oferece um amplo campo para a modulação farmacológica (Ward *et al.*, 1999b). Destacamos, entre os mais relevantes para o nosso estudo, os seguintes efeitos:

3.5.1 Inibidores da tradução e da transcrição

A cicloheximida e a actinomicina D costumam acelerar a apoptose de neutrófilos *in vitro*. Em contrapartida, as citocinas e os glicocorticóides, que sabidamente induzem a expressão de uma variedade de genes-alvo, costumam retardar o processo de apoptose em neutrófilos (Akgul *et al.*, 2001). A capacidade da dexametasona inibir a apoptose em neutrófilos é abolida pela cicloheximida, mostrando que a síntese de proteínas é necessária (Sendo *et al.*, 1997). Ou seja, o comportamento do neutrófilo é o oposto do observado em muitos outros tipos celulares, onde a *indução de apoptose* depende de nova síntese protéica e expressão gênica (Sepiashvili, 2001); deve-se, no entanto, lembrar que, para vários tipos celulares, um efeito marcante dos receptores para glicocorticóides é a repressão gênica (Webster e Cidlowski, 1999).

3.5.2 Agentes que elevam os níveis intracelulares de AMPc

Agentes que elevam os níveis intracelulares de AMPc, incluindo análogos de PgE2, inibem a apoptose espontânea de neutrófilos (Rossi *et al.*, 1995). Este efeito parece depender de uma via independente de PKA (Martin *et al.*, 2001). Interessantemente, a elevação de AMPc intracelular, que protege contra a apoptose, também inibe a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos (Rossi *et al.*, 1998). A inibição da apoptose pelo AMPc em neutrófilos passa pela estabilização de Mcl-1 (Kato *et al.*, 2006).

3.5.3 Prostanóides

A administração de 15-deoxy- δ^{12-14} PGJ2, um produto da ciclo-oxigenase, a camundongos nos quais a síntese dos demais prostanóides tinha sido bloqueada sistemicamente pelo tratamento com inibidores da COX-2, resultou num aumento da apoptose em neutrófilos e macrófagos, com resolução acelerada de inflamação pleural (Gilroy *et al.*, 2003). Os autores interpretaram os resultados como evidência de que a COX-2 gera metabólitos com ações anti-inflamatórias *in vivo*. Os dados sugerem que, em qualquer hipótese, produtos da ciclo-oxigenase podem promover apoptose em neutrófilos, e, portanto, inibidores de ciclo-oxigenase poderiam prolongar a sobrevivência de neutrófilos durante a inflamação.

Contudo, foi relatado que, em concentrações terapêuticas (1-3 mM), aspirina e o seu metabólito, salicilato de sódio, mas não a indometacina ou o ibuprofeno, impediram os efeitos anti-apoptóticos do LPS, que prolonga a sobrevivência de neutrófilos através de mecanismos dependentes de NF- κ B (Negrotto *et al.*, 2006).

Em concentrações ainda mais elevadas (10 mM) estes dois agentes induziram apoptose por si sós. Os autores interpretaram a falta de efeito da indometacina a 10^{-4} M como evidência de que o mecanismo de ação da aspirina e do salicilato de sódio, neste caso, era independente de inibição da ciclo-oxigenase, e sugeria um alvo alternativo, como a ativação de NF-kB. No caso do salicilato de sódio, seu efeito pró-apoptótico foi atribuído à rápida indução da degradação de Mcl-1, não pelo sistema proteassomal, onde esta proteína é normalmente digerida, mas por caspases (Derouet *et al.*, 2006). Ambos agentes antagonizaram os efeitos anti-apoptóticos da IL-1 β e do pH baixo. Contudo, foram ineficazes contra o GM-CSF, cujo efeito de extensão da sobrevivência é independente de NF-kB.

3.5.4 Inibidores da CDK

Embora os neutrófilos sejam células terminalmente diferenciadas, e, em princípio, incapazes de entrar em ciclo, eles contêm cinases dependentes de ciclina (CDKs, sigla para cyclin-dependent cinases) funcionalmente ativas, como também é o caso de neurônios terminalmente diferenciados, igualmente pós-mitóticos. Os inibidores de CDKs, como a Roscovitina, induzem apoptose dependente de caspases em neutrófilos, e sobrepujam os poderosos sinais anti-apoptóticos induzidos por GM-CSF, possivelmente através da inibição da expressão de Mcl-1 (Rossi *et al.*, 2006).

3.5.5 Glicocorticóides

A indução de apoptose em timócitos por glicocorticóides foi um dos primeiros modelos utilizados no estudo do fenômeno, e continua sendo um dos mais bem conhecidos (Wyllie *et al.*, 1980). Contudo, em neutrófilos os glicocorticóides são potentes inibidores da apoptose (Cox, 1995; Liles *et al.*, 1995; Meagher *et al.*, 1996; Strickland *et al.*, 2001). Estresse fisiológico e psicológico de várias formas suprime a apoptose espontânea em neutrófilos *ex vivo*, e há sugestões de um mecanismo envolvendo hormônios glicocorticóides (Sendo *et al.*, 1997). Contudo, uma demonstração direta ainda está faltando, o que é importante, visto que num contexto de estresse cirúrgico os efeitos anti-apoptóticos do plasma puderam ser atribuídos, pelo menos em parte, à IL-8 (Suzuki *et al.*, 2006). Os mesmos glicocorticóides que impedem a apoptose em neutrófilos promovem a eliminação de neutrófilos apoptóticos por células fagocíticas, sem liberação de mediadores inflamatórios (Liu *et al.*, 1999).

Em contrapartida, os glicocorticóides são fortes indutores de apoptose em eosinófilos (Meagher *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2002).

O mecanismo bioquímico pelo qual os glicocorticóides inibem a apoptose em neutrófilos ainda não está claro. Um estudo predisse uma baixa capacidade de resposta dos neutrófilos aos glicocorticóides, tendo em vista que o número de receptores detectados nestas células seria em número menor que o encontrado em linfócitos e outras classes de leucócitos (Miller *et al.*, 1998). Esse estudo tentou demonstrar uma relação direta entre a sensibilidade à apoptose induzida por glicocorticóides e os números de receptores presentes em cada tipo celular. Um

outro estudo (Strickland *et al.*, 2001) tentou explicar a resistência dos neutrófilos à indução de apoptose por dexametasona com base nos níveis elevados de expressão da molécula GR β , que é uma cadeia do receptor de glicocorticóide incapaz de ligar o esteróide, e, portanto, de responder diretamente ao ligante, mas capaz de interagir com GR α para modular sua transcrição. O estudo sugeriu que uma expressão aumentada de GR β poderia explicar a resistência dos neutrófilos aos esteróides.

Contudo, mecanismos baseados na escassez de receptores (Miller *et al.*, 1998) ou na expressão elevada de um receptor insensível ao hormônio (Strickland *et al.*, 2001)(isto é, com um mecanismo de ação dominante-negativo), não explicam facilmente como a presença do hormônio pode induzir na célula efeitos opostos aos observados em outras células, em vez de não induzir efeito algum. A evidência existente indica que os neutrófilos, como os demais tipos de granulócitos, respondem ativamente à estimulação por glicocorticóides, do ponto de vista da secreção de mediadores inflamatórios (Caramori e Adcock, 2005). A evidência disponível contraria a visão de que os neutrófilos são essencialmente *resistentes* aos glicocorticóides, e apóia o conceito de que eles são sensíveis, mas respondem de forma distinta da prevista.

3.5.6 Retinóides

Existe uma grande massa de evidências indicando que os retinóides exercem uma função importante durante a mielopoiese, e influenciam a probabilidade de engajamento na linhagem neutrofílica, tanto em progenitores da medula óssea normal, como em linhagens celulares mielóides e em camundongos geneticamente modificados (Breitman *et al.*, 1980; Breitman, 1990; Martin *et al.*, 1990; Stevens *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1994; Jing *et al.*, 1994; Grande *et al.*, 1995; Paul *et al.*, 1995; Terui *et al.*, 1995; Carpentier *et al.*, 1998; Lawson e Berliner, 1999; Mehta, 2002). Na linhagem HL-60, o ácido retinóico induz diferenciação neutrofílica, geralmente na dependência de co-fatores, como a di-hidroxi-Vitamina D3 (Mills *et al.*, 1998; Lawson e Berliner, 1999). Em culturas da linhagem HL-60 estabelecidas em alta densidade, na presença de ATRA, ocorre indução de apoptose. A apoptose não era decorrência direta da diferenciação neutrofílica induzida pelo ATRA, e dependia da presença de co-fatores solúveis, presentes em meio condicionado a altas densidades, que podiam ser removidos por ultrafiltração (Carpentier *et al.*, 1998), não podendo ser atribuída diretamente ao ATRA. Experimentos com transferência de genes por vetor retroviral, restaurando a expressão do receptor RAR- α em células HL-60 deficientes neste receptor, sugerem que a indução de diferenciação neutrofílica e a indução de apoptose pelo ácido retinóico envolvem mecanismos distintos (Mehta *et al.*, 1996). Estudos subseqüentes apoiaram a idéia de que a diferenciação neutrofílica é induzida através de receptores de ácido retinóico (RARs), enquanto a apoptose depende da ativação do Receptor de Retinóide X (RXR) (Agarwal e Mehta, 1997). A ativação do RAR em células HL-60 se correlaciona com a ativação do fator de transcrição AML-2, o qual foi implicado na diferenciação hematopoiética (Le *et al.*, 1999). Outro efeito do ATRA em células HL-60 é induzir a expressão de CD38, um

marcador precoce de diferenciação mielóide (Drach *et al.*, 1993), através da estimulação do RAR α (Drach *et al.*, 1994). Na linhagem HL-60, a diferenciação em presença de ATRA é parcial, e se passa melhor na ausência de soro, devido à captura de ATRA por proteínas do soro. Os efeitos do ATRA são potenciados por um inibidor da PKC, sugerindo que a sinalização por ATRA interage negativamente com a PKC (e, possivelmente, com NF- κ B, que é ativado via PKC), atenuando os efeitos do retinóide (Stevens *et al.*, 1990). Na linhagem leucêmica (leucemia mieloblástica) ML-1, o ATRA, um potente regulador da expressão gênica, sinergiza com GM-CSF na indução de uma série de genes associados com a diferenciação neutrofílica (Shimizu *et al.*, 2006). Relatos da literatura mencionam, de forma genérica, que o ATRA pode induzir morte celular em neutrófilos (Mehta, 2002). Contudo, não encontramos estudos originais na literatura, demonstrando um efeito pró-apoptótico de retinóides sobre neutrófilos humanos maduros. Por outro lado fenretinide, um retinóide sintético, que vem sendo usado cada vez mais na prevenção química do câncer, tem importantes efeitos pró-apoptóticos, em vários tipos celulares, especialmente células transformadas e pré-cancerosas ou cancerosas (Hail *et al.*, 2006).

3.5.7 Agentes anestésicos, psicotrópicos e outros moduladores da função de membranas excitáveis

Os benzodiazepínicos inibem a apoptose espontânea em neutrófilos (Goto *et al.*, 2003). O mesmo foi observado com alguns anestésicos inaláveis (Tyther *et al.*, 2003). Já os peptídeos opióides promovem a apoptose em neutrófilos (Sulowska *et al.*, 2002).

3.6 Importância da Apoptose de Granulócitos em Medicina

Existem muitos problemas em medicina que, em anos recentes, se mostraram relacionados, de uma maneira ou outra, com o fenômeno da apoptose (Gougeon, 2003; Fadeel e Orrenius, 2005; Gerl e Vaux, 2005; Mahoney e Rosen, 2005; Hotchkiss e Nicholson, 2006; Peng, 2006b). A apoptose em granulócitos foi implicada numa série de problemas clinicamente relevantes, com destaque para:

- Diferenças fisiológicas entre os sexos. As mulheres têm uma longevidade maior, em média, que os homens, e uma vantagem do ponto de vista da sobrevivência, que é em grande parte devida a fatores constitucionais, incluindo a propensão à apoptose (Tower, 2006). A apoptose em granulócitos é diferente entre os dois sexos, com um aumento da vida útil dos neutrófilos nas mulheres, apesar de um aumento na produção de metabólitos reativos de oxigênio, o que tenderia a diminuir a longevidade dos neutrófilos. Na gravidez a longevidade dos neutrófilos é aumentada ainda mais, por mecanismos envolvendo estradiol e progesterona (Molloy *et al.*, 2003).
- Diferenças fisiológicas com a idade. Um dos produtos gênicos mais claramente implicados no controle da velocidade de envelhecimento, a proteína Redox p66(Shc)shc, tem influência importante no processo de apoptose (Migliaccio *et al.*, 2006). Os neutrófilos de indivíduos idosos são pouco sensíveis aos efeitos anti-apoptóticos do GM-CSF e outras citocinas, o que poderia ter um impacto sobre a sua resistência às infecções (Fulop *et al.*, 2004). Diferenças na sensibilidade à indução de apoptose pela agregação de CD95 foram evidenciadas em indivíduos idosos, suscitando especulações de que estas mudanças contribuíssem para a desregulação do sistema imune com a idade (Gupta, 2005; Hsu *et al.*, 2005).

- Efeitos imunológicos da dieta, nutrientes e metabólitos. A glutamina retarda a apoptose em neutrófilos (Pithon-Curi *et al.*, 2003), e a ausência de glutamina do meio sensibiliza as células à apoptose espontânea (provavelmente uma das razões pelas quais o aminoácido é considerado um dos suplementos mais importantes dos meios de cultura usados em Imunologia) (Mates *et al.*, 2006). A glicose, pelo contrário, é um importante co-fator apoptótico (Moley e Mueckler, 2000; Allen *et al.*, 2005), suscitando especulações de que isto poderia contribuir para o comprometimento imunológico do hospedeiro na diabetes. Possivelmente, glicose em concentrações elevadas contribui para induzir apoptose em neutrófilos (Allen *et al.*, 2005). Contudo, não se deve imaginar que o único efeito da glicose no sistema é promover apoptose: a interferência com o transporte microssomal de glicose também induz apoptose em neutrófilos (Leuzzi *et al.*, 2003).

- Efeitos imunológicos da cirurgia e do trauma. A apoptose tem sido implicada como um dos processos básicos envolvidos no reparo das feridas (Rai *et al.*, 2005). Contudo, a apoptose de neutrófilos é inibida em pacientes submetidos à cirurgia (Suzuki *et al.*, 2006). O mecanismo parece envolver IL-8 produzida em resposta à cirurgia, como parte da reação de fase aguda. Ainda no contexto de cirurgia, salina hipertônica em concentrações clinicamente relevantes acelera a apoptose de neutrófilos (Biffl *et al.*, 2003; Turina *et al.*, 2006).

- Neutropenia e agranulocitose, induzidas ou não por medicamentos. A capacidade de um medicamento induzir apoptose foi considerada preditiva para o risco de causar agranulocitose, em condições específicas (Iverson *et al.*, 2002). Em pacientes tratados com um análogo da talidomida, o desenvolvimento de neutropenia foi devido a uma maior eliminação de neutrófilos *in vivo*, mas não a um aumento da apoptose espontânea observável *in vitro* (Mccarthy *et al.*, 2006).

- Neutrofilia e granulopoiese. *In vitro*, a exposição de progenitores CD34+ da medula óssea humana a inibidores de caspase potencia a mielopoiese. Em contrapartida, esta é reduzida pelo tratamento com um anticorpo agonista anti-CD95 (Alenzi *et al.*, 2005). Ambas observações são compatíveis com um papel para a apoptose na regulação da granulopoiese humana, embora não tenham demonstrado que esses mecanismos são relevantes *in vivo*, e embora dados de modelos animais tornem pouco provável que a regulação dos números de granulócitos produzidos dependa de CD95. A fagocitose de neutrófilos apoptóticos reforça a granulopoiese *in vivo*, através da secreção de IL-17 e IL-23 (Stark *et al.*, 2005). A idéia de que apoptose e granulopoiese são processos coordenados é igualmente sustentada por estudos com cepas isogênicas de camundongos, submetidas à seleção para um fenótipo de alta responsividade a estímulos inflamatórios agudos (Ribeiro *et al.*, 2003). A grande neutrofilia observada em pacientes com deficiência de CD18 foi inicialmente atribuída à retenção dos neutrófilos no interior dos vasos. Contudo, em animais deficientes em CD18+, o mecanismo de neutrofilia parece estar estreitamente ligada a um defeito na apoptose de neutrófilos.

- Endotoxemia. Os efeitos do LPS sobre a apoptose em neutrófilos são complexos, pois pode impedir a apoptose mas promover necrose primária, em certas condições (Turina *et al.*, 2005). Tais efeitos, no entanto, não são encontrados em todos os estudos (Lee *et al.*, 1993). Por outro lado, em ratos sofrendo endotoxemia, a apoptose de neutrófilos, presumivelmente induzida pela endotoxina, é um mecanismo patogénico importante, e a eliminação das células se faz majoritariamente através da ingestão por células de Kupffer no fígado (Shi *et al.*, 2001). Em contraste, em pacientes sépticos, foi evidenciada uma importante

diminuição da taxa de apoptose, se comparada a controles sadios (Taneja *et al.*, 2004).

JUSTIFICATIVA

É importante analisar a regulação da apoptose em neutrófilos e eosinófilos, visto suas implicações para a patogênese das inflamações crônicas e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

HIPÓTESE

Existem padrões de resposta apoptótica linhagem-específicos e estágio-específicos, que possam guiar a nossa exploração das vias de transdução de sinal envolvidas na regulação do processo de morte celular programada em granulócitos?

MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Doadores

O estudo foi conduzido com granulócitos purificados do sangue periférico de doadores adultos presumivelmente saudáveis, de ambos os sexos, recrutados dentre o pessoal do laboratório, após a obtenção de um termo de consentimento informado.

As características dos doadores utilizados nos diferentes experimentos estão discriminadas na Tabela 1, onde se podem ver, em cada caso, o sexo, a idade, a presença de uma história positiva para episódios alérgicos e o relato de uso de medicação no período que antecedeu a coleta. Pode-se ver que números comparáveis de experimentos foram conduzidos com amostras de doadores do sexo masculino (n=13) e do sexo feminino (n=16). A idade dos doadores foi de $35,6 \pm 12$ anos (média \pm desvpad) com mediana em 30 anos. Apenas 6 dos 29 experimentos

foram conduzidos com células de doadores que tivessem história positiva para episódios alérgicos.

Tabela 1 - Lista de doadores utilizados.

Experimento	Sexo do doador	Idade do doador	História de alergia	Relato de Medicação
1	F	45	N	N
2	M	29	N	N
3	M	29	S	N
4	F	28	S	N
5	F	28	N	N
6	M	34	N	N
7	M	29	N	N
8	M	50	N	S ¹
9	M	29	N	N
10	F	29	N	N
11	M	24	S	N
12	M	50	N	S ¹
13	F	45	N	S ²
14	F	50	N	N
15	F	43	N	N
16	F	22	N	N
17	F	29	N	N
18	F	45	N	S ²
19	M	30	N	N
20	F	46	N	S ²
21	M	24	S	N
22	M	30	N	N
23	F	21	S	N
24	F	46	N	S ²
25	F	54	N	N
26	F	26	N	N
27	F	49	N	N
28	M	16	S	N
29	M	50	N	S ¹

Lista dos doadores por experimento, com sexo, idade, existência de histórico alérgico e uso de medicamentos, onde: ¹Medicação anti-hipertensiva de uso contínuo: inibidor de Enzima Conversora de Angiotensina; bloqueador beta-adrenérgico; diurético. ²Medicação de uso contínuo: inibidor da Cicloxigenase (aspirina).

6.1.1 Critérios de exclusão

O uso de medicação crônica foi um critério para a exclusão do paciente do estudo.

6.2 Obtenção de Sangue Total e Purificação de Granulócitos

O procedimento de coleta de sangue e isolamento de granulócitos utilizou passos seqüenciais cujo objetivo é eliminar células contaminantes (monócitos, linfócitos e hemáceas). Esse método é baseado na descrição original (Boyum, 1968), com modificações mais recentes (Boyum, 1974; Clark e Klebanoff, 1979; Borregaard *et al.*, 1983).

1. Após obtenção de assinatura do termo de consentimento esclarecido, 40 mL de sangue são retirados em seringa contendo heparina livre de conservantes na concentração de 20 U/mL de volume final).

2. O sangue é misturado a 10mL de solução 3% de dextrana (500.000 peso molecular; Sigma) em salina estéril, homogeneizado, e distribuído em tubos cônicos plásticos de 15 mL, sendo incubado em seguida à temperatura ambiente, por 20 minutos.

3. O plasma rico em leucócitos (concentrado leucocitário, ou “buffy coat”) é aspirado com uma pipeta Pasteur, e centrifugado a 250 xg por 10 minutos a 5°C (Sanyo, modelo Mistral 3000i), para obtenção de sedimento celular (“pellet”).

4. O sedimento é imediatamente ressuspendido em NaCl (VETEC) 0,9% estéril, no mesmo volume inicial.

5. Dispensam-se 3 mL de Lymphoprep (Sigma) no fundo de um tubo cônico de 15 mL; a suspensão celular é depositada suavemente no topo da solução separadora, com o cuidado de preservar uma interface bem definida.

6. Os tubos são centrifugados por 45 minutos, a 400 xg a 20°C, sem o uso de frenagem para minimizar as perturbações do gradiente.

7. A camada superior (salina), assim como o anel intermediário rico em células mononucleares, são aspirados e descartados, deixando apenas o precipitado rico em granulócitos e hemácias.

8. A remoção dos hemáceas residuais é feita por lise hipotônica, adicionando-se 20 mL de NaCl 0,2% gelado e estéril ao sedimento por 30 segundos, sob agitação, seguindo-se a adição de 20 mL de solução de NaCl 1,6%, também gelada e estéril, restaurando com isso a isotonicidade da suspensão.

9. Os tubos são centrifugados por 6 minutos a 250 xg a 5°C, descartando-se em seguida o sobrenadante, e repetindo-se as etapa de lise e lavagem quantas vezes for necessário para a completa remoção das hemácias, determinado pelo desaparecimento da cor vermelha do precipitado celular.

10. As células são ressuspendidas em 3 mL de Solução Salina Balanceada de Hank (HBSS) livre de Ca^{+2} e Mg^{+2} (Hyclone).

11. A concentração celular é determinada mediante contagem direta com solução de Turk (na diluição 1:10) em câmara de Neubauer, e ajustada à concentração desejada com meio de cultura RPMI 1640 (HyClone) e soro autólogo fresco na concentração final de 10% e mantida em banho de gelo até a hora da suspensão ser utilizada.

A etapa de sedimentação em dextrana remove a maioria das hemácias. O gradiente de Lymphoprep promove, em seguida, uma boa separação entre os granulócitos, por um lado, e os linfócitos e monócitos, pelo outro, por serem estes últimos células menos densas. As hemácias residuais são então retiradas por lise osmótica, uma vez que as mesmas são mais sensíveis a esta técnica que os granulócitos.

6.3 Obtenção de Soro Autólogo

Concomitante à coleta de sangue para purificação de granulócitos, uma alíquota de 10 mL também é coletada em seringa não heparinizada, e imediatamente transferido para um tubo Vacutainer (BD) de preparo de soro, onde a amostra é homogeneizada 5 vezes, e então centrifugada a 300 xg por 15 minutos à temperatura ambiente, permitindo a separação do soro, que fica isolado acima do gel.

6.4 Estabelecimento de Cultura de Granulócitos

Uma vez ajustada a concentração celular a $4,0 \times 10^6$ células/mL, 200 μ L da suspensão são plaqueados, em triplicata, na presença ou ausência de agentes farmacológicos (dexametasona – Sigma diluída em meio de cultura; ácido retinóico all-trans – Sigma diluído em etanol PA; e indometacina – Sigma diluída em meio de cultura), em placa de cultura de 96 poços, que é então incubada por diferentes intervalos de tempo (de 0h a 20h de incubação), em estufa de CO₂ a 5% e 37°C

(Heto, modelo CellHouse 165). Tanto neutrófilos como eosinófilos sobrevivem pelos tempos indicados, nessas condições experimentais.

6.5 Observação Morfológica de Apoptose

Findo o tempo de cultura:

1. As células são gentilmente ressuspensas, evitando-se a formação de bolhas.
2. Uma alíquota de 10 μ L é utilizada para determinação de viabilidade com o corante Azul de Trypan em microscopia ótica direta em microscópio Olympus BX-50.
3. O volume restante no poço é coletado com o uso de uma micropipeta, e as células são citocentrifugadas a 25 xg por 6 minutos (Shandon, modelo Cytospin 3).
4. Após a centrifugação, as lâminas são imediatamente fixadas por 1 minuto em metanol gelado (Merck), e deixadas a secar naturalmente.
5. Depois de secas, as lâminas são coradas com o corante rápido Panótico (Laborclin) por 30 segundos na solução N°2, e 1 minuto na solução N°3.
6. A determinação de apoptose se dá pela observação, ou não, de alterações morfológicas características do fenômeno de apoptose (Gay *et al.*, 1985; Huang *et al.*, 2002), sendo contadas 300 células por lâmina, em triplicata, para cada ponto experimental, em microscópio Olympus BX-50, com aumento de 1000x em imersão. Dados para neutrófilos e eosinófilos

apoptóticos são registrados separadamente, graças a um contador de células multicanal.

7. A foto-documentação é realizada em aumento de 1000x, em microscópio Leica DMLS acoplado à câmera digital DC-300F, e as imagens capturadas com o auxílio do programa IM50 rodando em plataforma Windows XP.

6.6 Determinação de Apoptose por Citometria de Fluxo

Uma outra forma utilizada para a determinação de apoptose, é a observação da exteriorização de fosfatidilserina por citometria de fluxo, através do uso de um sistema de detecção de apoptose TACS Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit (R&D). Para tanto:

1. Ao término do tempo de cultura, 1×10^6 células são centrifugadas por 5 min, a 500 xg, a 25°C.
2. O sobrenadante é descartado, e as células são ressuspensas em 100µL de Tampão de Ligação 1x.
3. A suspensão celular é então incubada por 15 minutos, na ausência ou na presença de 1 µL de anexina V (25 µg/mL) marcada com FITC, à temperatura ambiente e protegido da luz.
4. Terminada a incubação, a suspensão celular é mantida em gelo até o momento da leitura.
5. No momento da leitura, adiciona-se, ou não, 10µL de iodeto de propídio 50µg/mL, de forma a se obter quatro tubos diferentes para cada ponto experimental (o branco, sem adição de anexina e iodeto de propídio; um

tubo apenas com anexina; um tubo apenas com iodeto de propídio; e um tubo com anexina e iodeto de propídio).

6. A leitura é feita em citômetro Becton-Dickinson modelo FACSCALIBUR, e são analisadas com o auxílio do programa WinMDI 2.5 em plataforma Windows XP.

6.7 Métodos Estatísticos

Os dados foram analisados com o auxílio do programa SPSS 15.0 rodando em plataforma Windows XP. Foi utilizado o teste T (two-tailed) por se tratarem de comparações entre apenas dois grupos.

RESULTADOS

7.1 Efeito da Densidade Celular sobre a Taxa de Apoptose Espontânea em Granulócitos Humanos

Os experimentos iniciais procuraram definir as condições mais apropriadas para o estudo, tendo em vista que era necessário trabalhar em condições nas quais tanto efeitos pró-apoptóticos como anti-apoptóticos pudessem ser evidenciados (ou seja, nas quais a taxa de apoptose, na ausência de fatores externos, fosse intermediária, e efeitos potenciadores ou inibidores pudessem ser facilmente detectados).

Estudos anteriores (Hannah *et al.*, 1998) indicaram que a densidade das culturas era um dos determinantes mais importantes das taxas de apoptose observadas com neutrófilos humanos *in vitro*. Para confirmar se esta dependência também podia ser detectada nas nossas condições experimentais, e, em caso positivo, para verificar se ela se aplicava também à taxa de apoptose em eosinófilos presentes nas mesmas culturas, granulócitos purificados de dois doadores foram

cultivados por 20h, a 1×10^6 e 4×10^6 células/ mL (respectivamente a menor e maior densidade de cultura encontrada nos estudos da literatura). Os controles examinados a 0h foram estabelecidos com 4×10^6 células/ mL. A presença de células apoptóticas foi quantificada microscopicamente, como descrito em *Métodos*, realizando-se contagens separadas para neutrófilos e eosinófilos.

A Figura 1 mostra que, após uma incubação de 20h, a frequência de neutrófilos apoptóticos aumentou consideravelmente nas duas densidades de cultura, confirmando a tendência à apoptose espontânea em curto período de cultura, descrita na literatura sobre neutrófilos normais. A taxa de apoptose em 20h nas condições de maior densidade de cultura foram, em média, quase a metade do observado com menor densidade. Isto confirma que a densidade de cultura é um fator importante no resultado, e sugere que as altas densidades de cultura têm um efeito protetor.

Do ponto de vista experimental, as condições em maior densidade celular foram julgadas mais adequadas para realizar o resto do estudo, tendo em vista que as taxas de apoptose observadas não eram tão altas que não pudessem ser aumentadas de forma detectável por um fator pró-apoptótico, nem tão baixas que não pudessem ser reduzidas claramente por um fator anti-apoptótico. Os experimentos subsequentes foram conduzidos com 4×10^6 neutrófilos/mL.

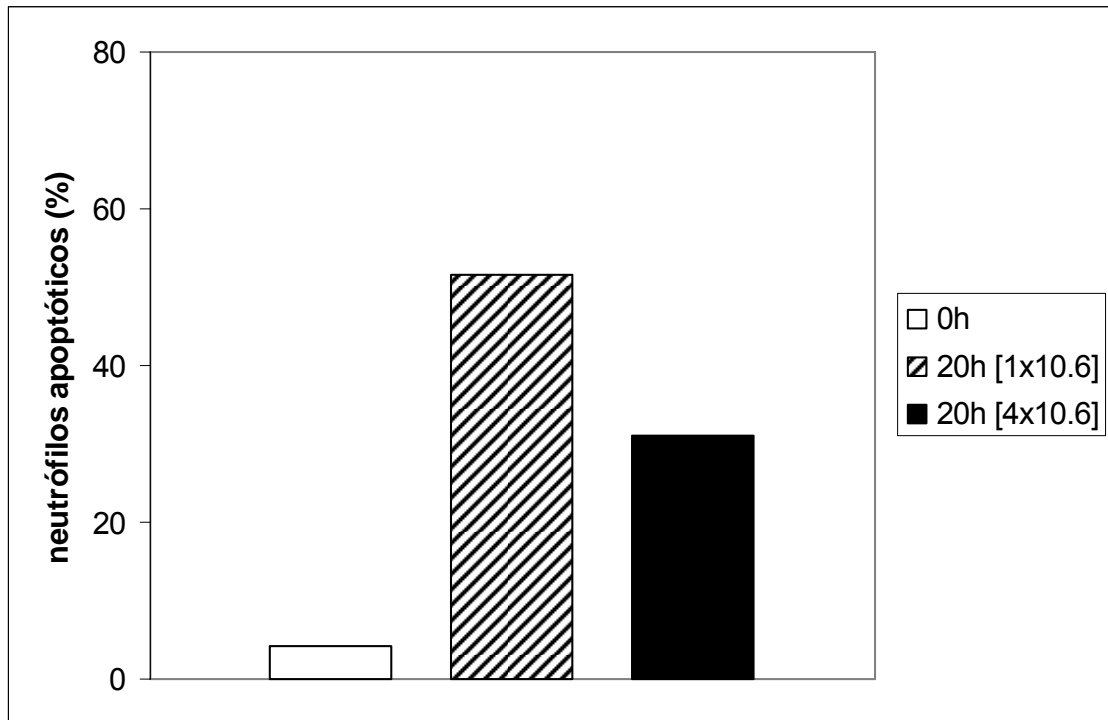


Figura 1 - Efeito da densidade celular sobre a taxa de apoptose espontânea de neutrófilos. O gráfico acima mostra a média \pm erro padrão da média (SEM), onde aplicável, da porcentagem de neutrófilos em apoptose em experimentos de padronização com $n=3$ para o tempo de 0h ($4,1 \pm 1,05\%$), e $n=2$ para 20 h em ambas as concentrações celulares (51,53% e 31,12% para 1×10^6 e 4×10^6 respectivamente). Os experimentos foram realizados conforme descrito na seção de Métodos, e a contagem das lâminas em triplicata foi feita por observação morfológica direta.

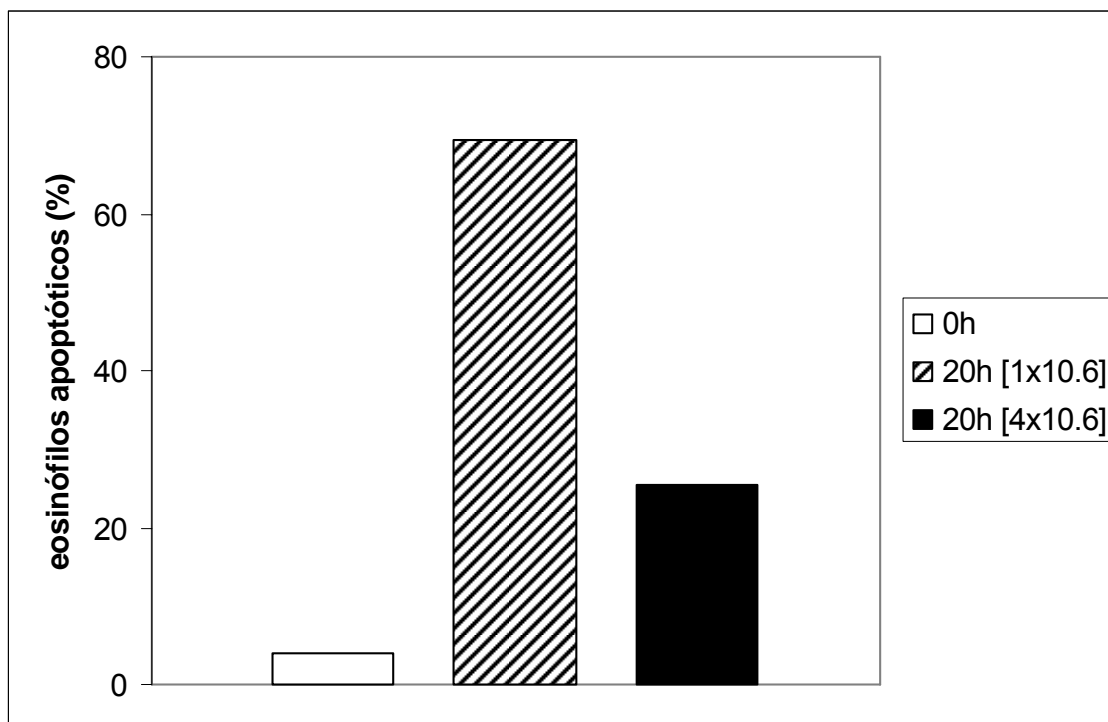


Figura 2 - Efeito da densidade celular sobre a taxa de apoptose espontânea de eosinófilos. O gráfico acima mostra a média da porcentagem de eosinófilos em apoptose em experimentos de padronização com $n=2$ para o tempo de 0h (3,93%), e $n=1$ para 20h em ambas as concentrações celulares (69,5% e 25,4% para 1×10^6 e 4×10^6 respectivamente).

A Figura 2 mostra que, após uma incubação de 20 h, a frequência de eosinófilos apoptóticos aumentou consideravelmente nas duas densidades de cultura, confirmando a tendência à apoptose espontânea em curto período de cultura, descrita na literatura sobre eosinófilos normais. Nos experimentos mostrados, o efeito da densidade celular sobre a taxa de apoptose foi mais marcado em eosinófilos que em neutrófilos: A taxa de apoptose em 20h nas condições de maior densidade celular foi menos da metade do observado com menor densidade. Isto confirma que, também para eosinófilos, a densidade celular é um fator importante no resultado, e sugere que as altas densidades de cultura têm um efeito protetor marcado.

7.2 Efeito do Tempo de Cultura sobre a Taxa de Apoptose em Granulócitos Humanos

Os experimentos mostrados nas Figuras 1 e 2 tinham sido realizados com 20 h de cultura, com base na extensa literatura sobre apoptose em granulócitos humanos, onde este intervalo é o mais freqüentemente estudado (a maior parte dos estudos sobre neutrófilos cobre o período de 1 a 24 h de cultura; para eosinófilos, a maioria vai até 48 h). Em experimentos subseqüentes, procuramos analisar mais detalhadamente a relação entre o tempo de cultivo e a taxa de apoptose espontânea em granulócitos humanos, tendo em vista a necessidade de estabelecer um protocolo que permitisse evidenciar o melhor possível a aceleração ou retardo da apoptose induzida por agentes exógenos.

Granulócitos purificados foram cultivados na densidade de 4×10^6 células /mL, por 0, 1, 2, 4 e 20 horas (em triplicata), e a presença de células apoptóticas foi quantificada microscopicamente, como descrito em *Métodos*, realizando-se contagens separadas para neutrófilos e eosinófilos. A Figura 3 mostra a dependência da taxa de apoptose em relação ao tempo de cultura para neutrófilos. Podemos ver o aumento progressivo da freqüência de neutrófilos apoptóticos na cultura, confirmando dados da literatura. Os níveis de apoptose observados com neutrófilos neste experimento foram mais elevados que os encontrados anteriormente para condições comparáveis (Figura 1), ilustrando a importância da variabilidade entre doadores para os resultados.

A Figura 4 ilustra a dependência da taxa de apoptose em relação ao tempo de cultura para eosinófilos. Podemos também ver um aumento progressivo da frequência de eosinófilos apoptóticos na cultura, compatível com os dados da literatura. Os níveis de apoptose observados com eosinófilos neste experimento foram bastante altos, e certamente maiores do que os encontrados anteriormente (Figura 2), reiterando a importância da variabilidade entre doadores quanto aos resultados encontrados.

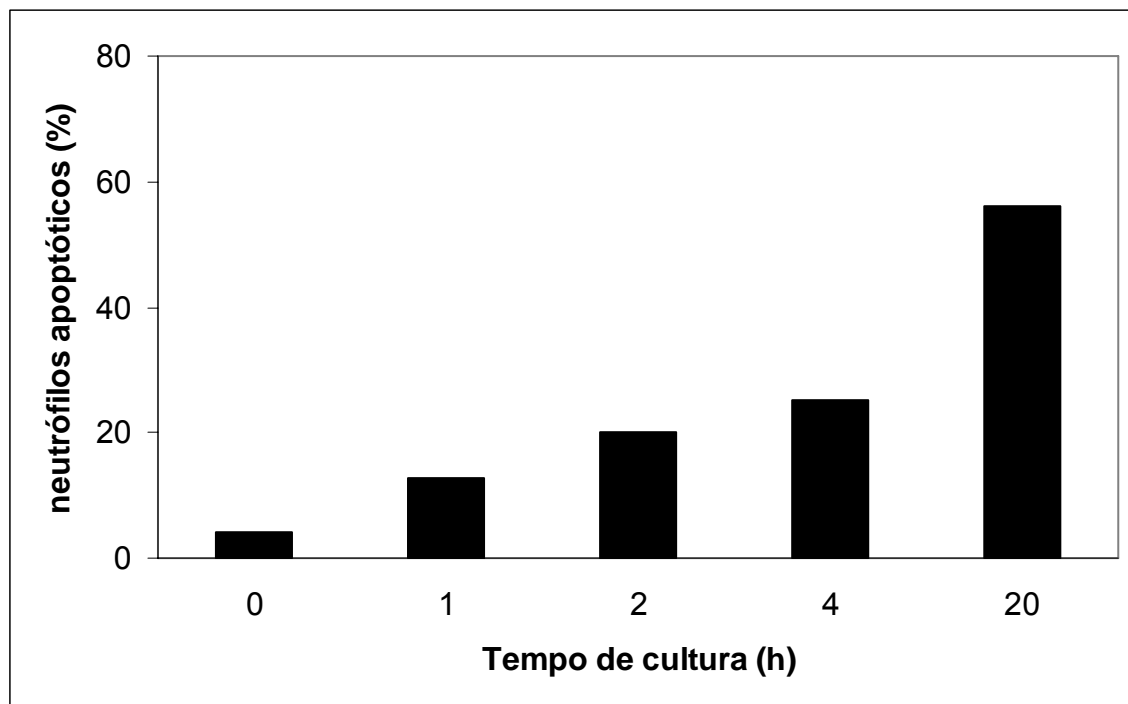


Figura 3 - Efeito do tempo de cultura sobre a taxa de apoptose em neutrófilos.

O gráfico representa a média da porcentagem de neutrófilos apoptóticos obtida através da contagem de triplicatas de um experimento. As médias para os tempos de 0; 1; 2; 4 e 20 horas foram, respectivamente, 4,23%; 12,89%; 19,99%; 25,18% e 56,17%.

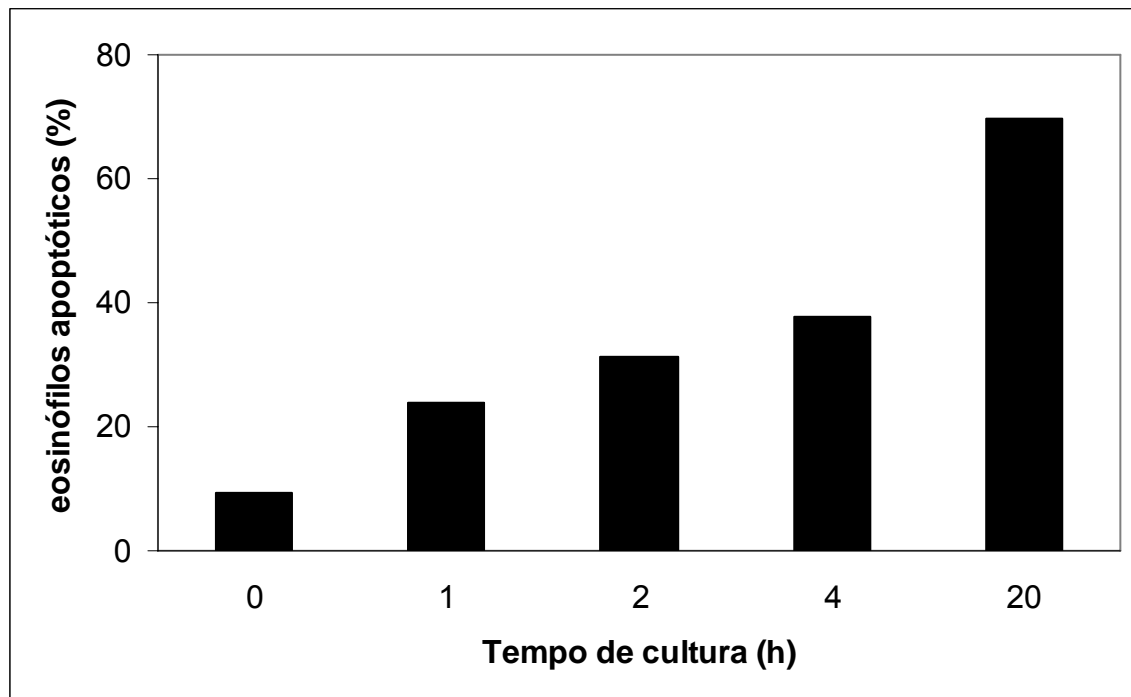


Figura 4 - Efeito do tempo de cultura sobre a taxa de apoptose em eosinófilos.

O gráfico representa a média da porcentagem de eosinófilos apoptóticos obtida através da contagem de triplicatas de um experimento.. As médias para os tempos de 0; 1; 2; 4 e 20 horas foram, respectivamente, 9,45%; 23,93%; 31,23%; 37,89% e 69,67%.

7.3 Impacto da Variabilidade entre Doadores sobre a Taxa de Apoptose em Granulócitos Humanos

Os experimentos subseqüentes buscaram definir a extensão da variabilidade entre doadores, do ponto de vista das taxas de apoptose observadas após 20 h de cultura. Para isto, foi realizada uma série de 12 experimentos, sendo quantificada a apoptose em neutrófilos em 0 h e 20 h. Em 6 destes experimentos, foi possível igualmente obter dados para 2 h.

A Figura 5 mostra os resultados obtidos. Podemos observar que não existe uma variabilidade individual significativa, e que a mesma não representa uma parte importante de cada medida. Isto confirma que a determinação quantitativa de efeitos pró- e anti-apoptóticos neste sistema deve ser obtida com números relativamente pequenos de experimentos.

A morte celular espontânea na população de neutrófilos em 20 h foi acompanhada de sinais clássicos de apoptose, com destaque para: a) cariopícnose; b) cariorrexis; c) condensação da cromatina no interior do envelope nuclear; d) vacuolização do citoplasma; e) perda de volume celular conseqüente à redução do citoplasma e do núcleo. A Figura 5, Painel B, ilustra um grupo de células nas quais estes diferentes sinais podem ser identificados, ao lado de outras células, bem preservadas, na mesma cultura.

As amostras de granulócitos utilizadas nestes experimentos (assim como nos experimentos subseqüentes) , no entanto, não contiveram números de eosinófilos suficientes para permitir o mesmo tipo de análise quantitativa.

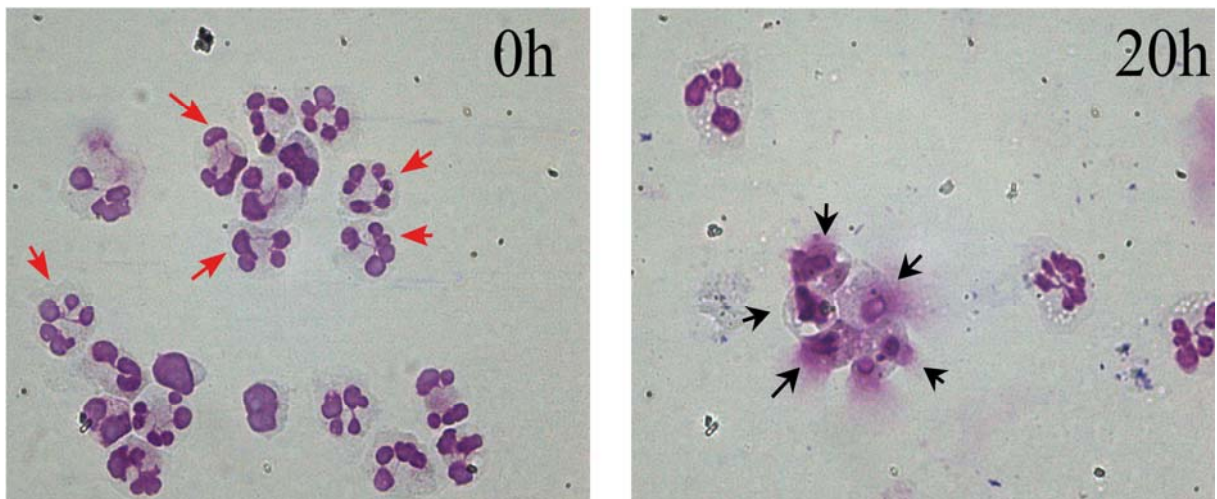
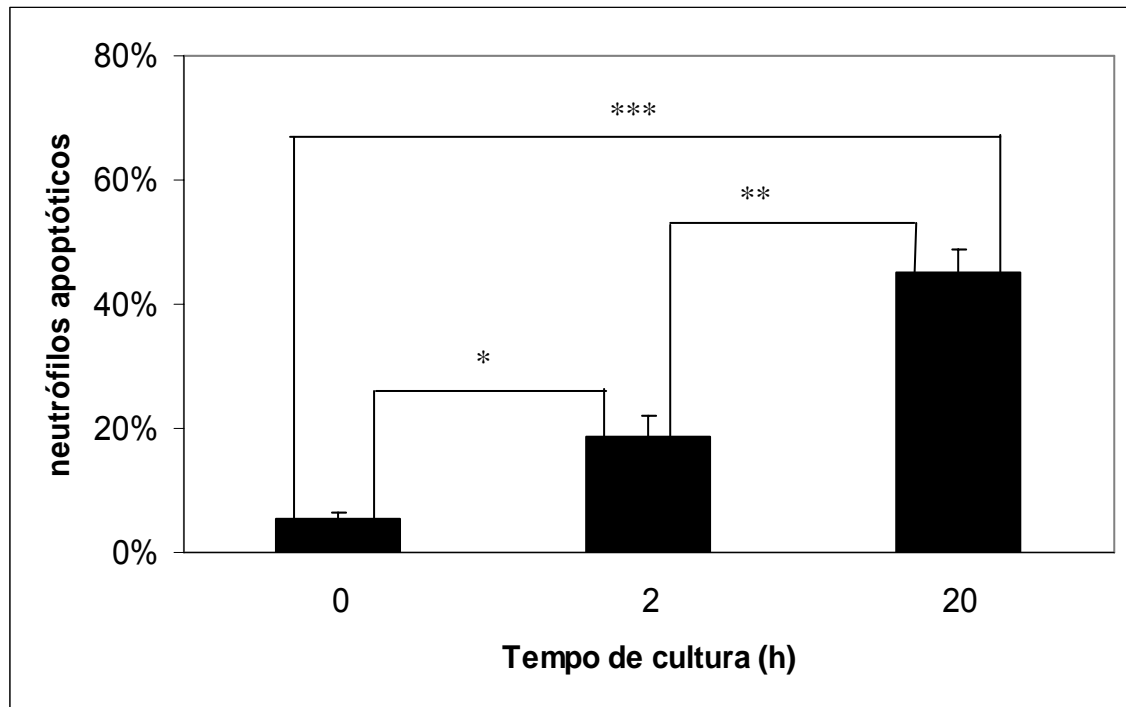


Figura 5 - Impacto da variabilidade entre doadores sobre as taxas de apoptose em neutrófilos. O gráfico representa a média \pm SEM da porcentagem de neutrófilos em apoptose de 6-12 experimentos estabelecidos conforme descrito na seção de Métodos, que foram incubados por 0 ($n=12$); 2 ($n=6$) e 20 ($n=12$) horas, obtendo-se os valores de 5,53%; 18,78% e 44,92%, respectivamente. Foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($*p=0.006$; $**p<0.001$, e $***p<0.001$). As microfotografias representam o descrito no gráfico, onde se vê uma maioria de neutrófilos apoptóticos (setas pretas) no tempo de 20h e uma maioria de neutrófilos normais (setas vermelhas) no tempo de 0h. Aumento de 1000x.

A Figura 6 ilustra o perfil das populações de granulócitos nos tempos 0 e 20h, após marcação com Anexina V e iodeto de propídio (PI). Pode-se ver um aumento marcado na população Anexina V+, PI+, assim como na população Anexina V+, PI-, em 20h, se comparado ao tempo inicial. Pode-se igualmente perceber uma importante população de células marcadas com PI apenas, desde o tempo 0, que também aumenta com o tempo de cultura. Estes dados corroboram a progressão da apoptose (células marcadas com Anexina V, tanto PI+ como PI-) em relação ao tempo de cultura, mas também sugerem a presença de uma proporção importante de células nas culturas que está morta, mas não exteriorizou fosfatidil-serina (células negativas para Anexina V, mas positivas para PI). Esta população pode representar células que sofreram necrose.

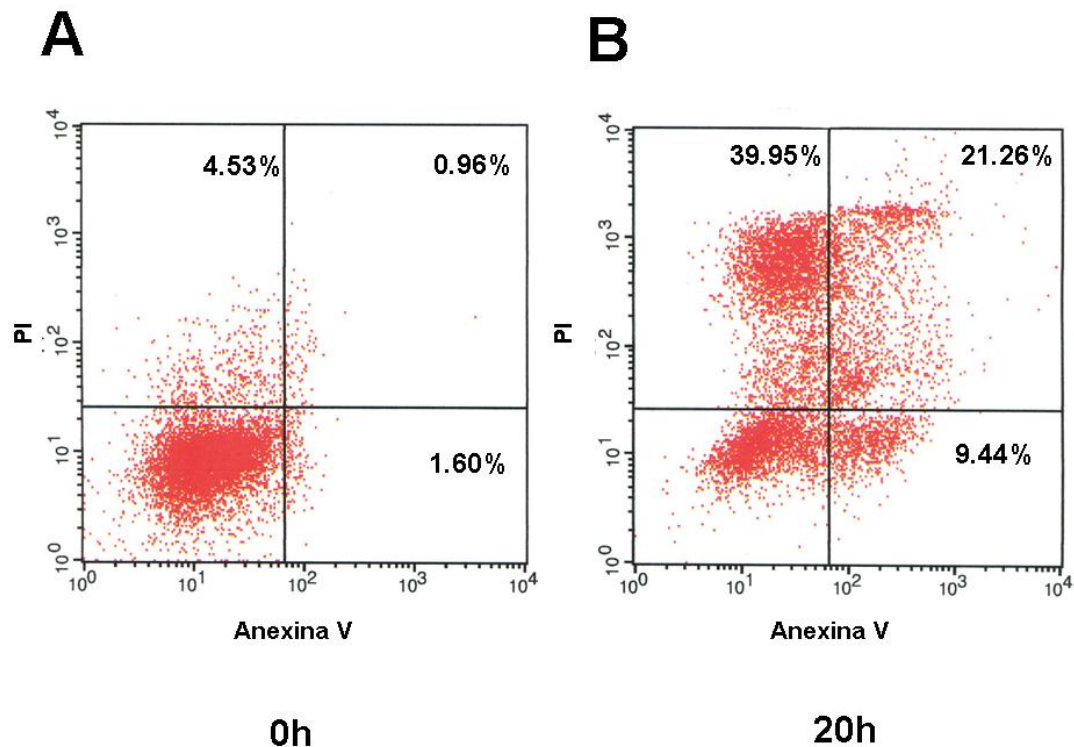


Figura 6 - Avaliação da apoptose espontânea em neutrófilos por citometria de fluxo. Esta figura ilustra um experimento representativo da determinação de apoptose por citometria de fluxo, conforme descrita na seção de Métodos. É possível perceber o aumento do número de células apoptóticas (anexina V⁺) entre os tempos de 0 e 20h (painéis A e B respectivamente).

7.4 Efeito da Dexametasona sobre a Apoptose em Neutrófilos

Verificamos a seguir os efeitos da dexametasona (10^{-9} - 10^{-7} M) sobre a apoptose em neutrófilos. Um experimento inicial procurou estabelecer a relação dose-resposta e a cinética do efeito. Para isto, neutrófilos purificados foram cultivados por 20 horas, na ausência ou presença de dexametasona, seguindo-se a quantificação microscópica do número de células em apoptose.

A figura 7 ilustra a relação dose-resposta observada em experimento-piloto. Pode-se observar que a dexametasona reduz a taxa de apoptose observada em 20 h, de forma dose-dependente, sendo a apoptose em presença da dose mais elevada de dexametasona menos da metade da observada no controle.

A figura 8 ilustra a cinética do efeito da dexametasona em experimento-piloto. Os resultados confirmam que em 20 h a redução na taxa de apoptose é maior do que nos demais tempos estudados. Contudo, uma redução já é visível a partir de 8 h de cultura. Interessantemente, embora em 4 h de cultura a frequência de células apoptóticas já seja bem maior que no tempo 0, neste momento a dexametasona ainda não teve efeito detectável. Os dados sugerem que a dexametasona requer um intervalo de algumas horas para atuar, protegendo as células contra a apoptose.

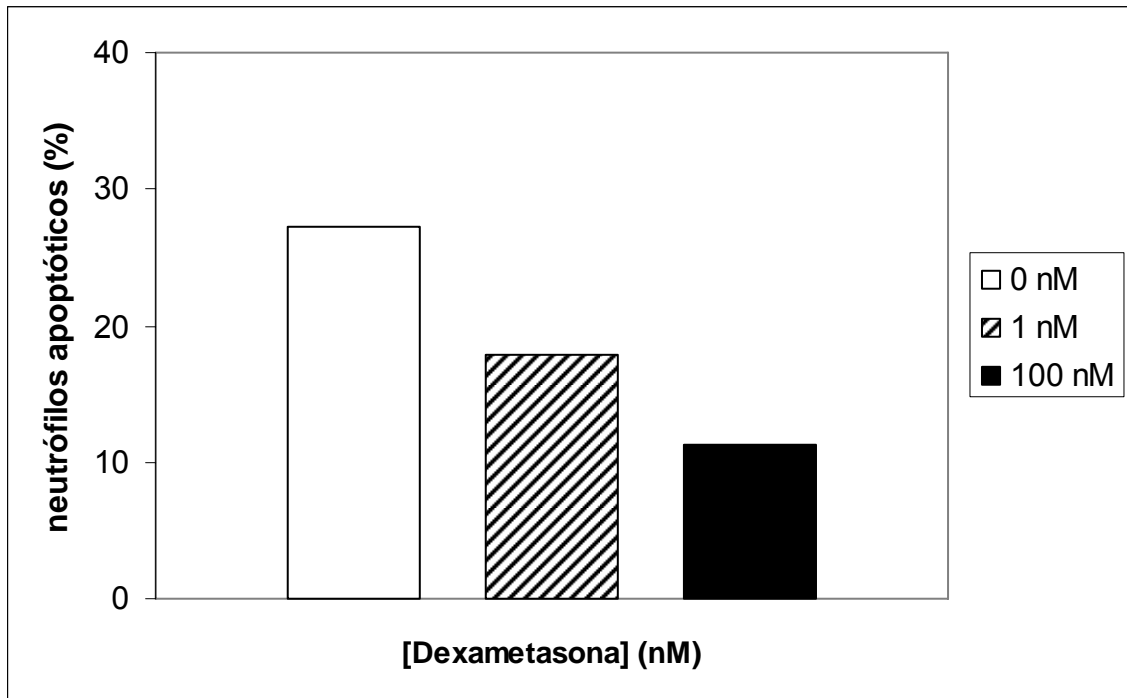


Figura 7 - Relação dose-resposta para dexametasona na apoptose de neutrófilos em cultura(20h). O gráfico mostra a porcentagem de neutrófilos apoptóticos num experimento piloto ($n=1$), onde as células foram incubadas na ausência ou presença de dexametasona (1 e 100 nM) por 20 horas, e os valores obtidos após observação microscópica direta foram de 27,29%; 17,93% e 11,35%, para o controle; 1nM e 100 nM respectivamente.

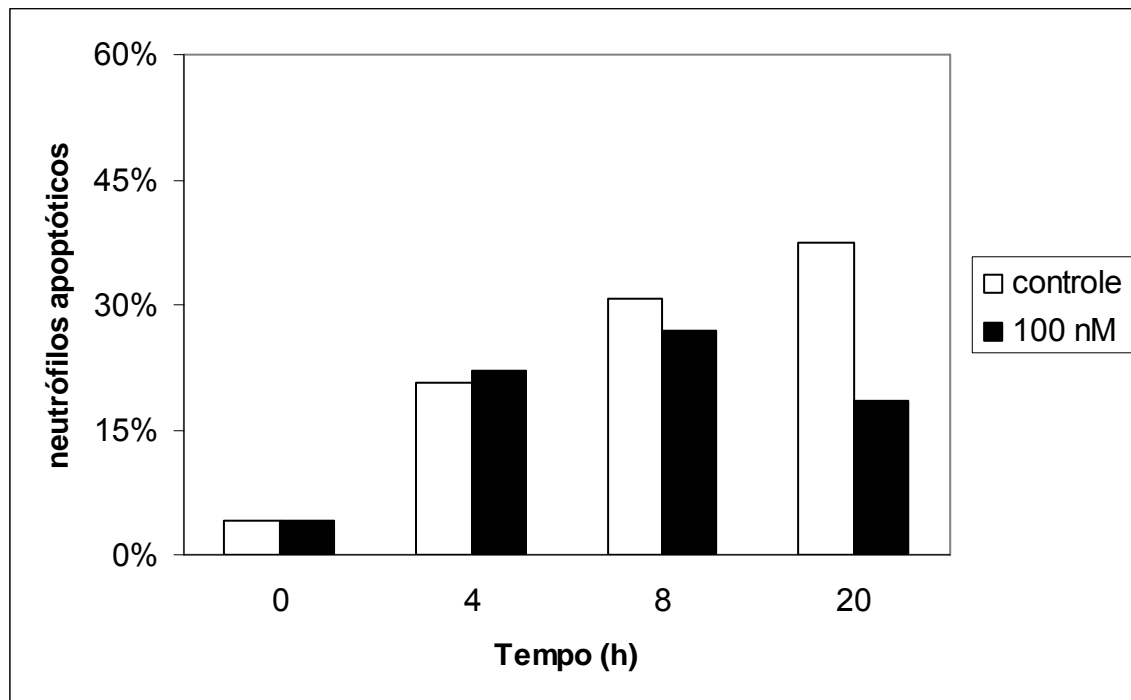


Figura 8 - Cinética de atuação da dexametasona na apoptose de neutrófilos em cultura (20h). O gráfico mostra a porcentagem de neutrófilos apoptóticos, observada em microscopia direta, encontrada em experimento piloto ($n=1$). No experimento, granulócitos purificados foram cultivados, em triplicata, na ausência ou presença de 100 nM de dexametasona, por 0; 4; 8 ou 20 horas. Os valores encontrados foram 4,07% e 4,07% em 0h; 20,71% e 22,16% em 4h; 30,69% e 26,90%; 37,45% e 18,50% em 20h, respectivamente na ausência e presença de dexametasona 100 nM.

Em seguida, procuramos avaliar a ação da dexametasona num grupo maior de doadores, concentrando-nos nas condições ótimas definidas nos experimentos-piloto (20 h, 10^{-7} M).

A Figura 9 resume os dados obtidos para o grupo ampliado ($n=11$ para o controle, $n=5$ para a dexametasona). O efeito da dexametasona foi estatisticamente significativo ($p < 0.05$).

A inibição de apoptose espontânea pela dexametasona é caracterizada por uma preservação muito boa da morfologia típica do neutrófilo normal, mesmo após 20 h de cultura (Figura 9, Painel B).

Estes dados, em conjunto, confirmam relatos da literatura, mostrando que a dexametasona suprime a apoptose em neutrófilos humanos, nesta faixa de concentrações.

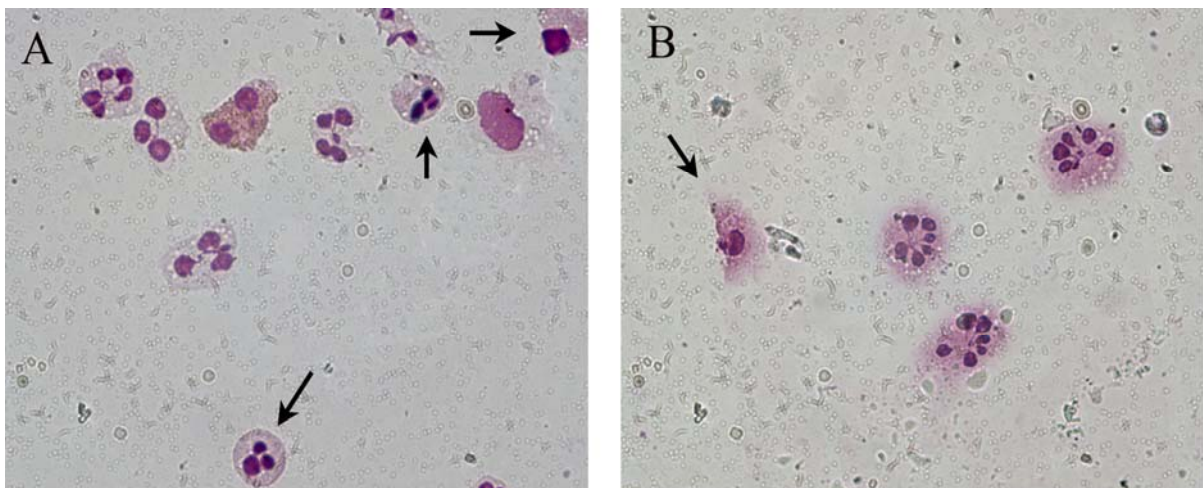
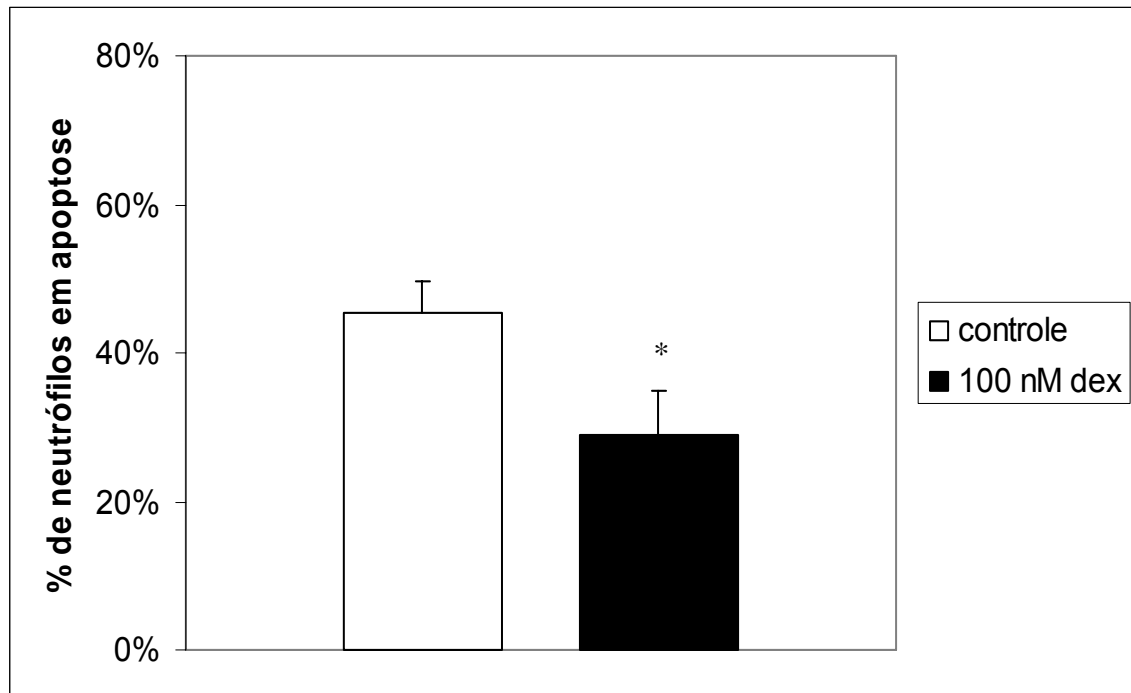


Figura 9 - Impacto da variabilidade entre doadores sobre a resposta anti-apoptótica à dexametasona em neutrófilos. O gráfico mostra a média \pm SEM da porcentagem de neutrófilos apoptóticos presentes em cultura de 20 horas estabelecida na ausência ou presença de 100 nM de dexametasona. Obteve-se um valor de 45,27% de apoptose para o controle ($n=11$), e 29,01% para o tratamento com dexametasona ($n=5$). A diferença entre os dois grupos foi estatisticamente significativa ($*p<0.05$). As micrografias ilustram o representado no gráfico, com o painel A para 20h e o painel B para 20h com dexametasona 100 nM. Aumento de 1000x.

7.5 Efeito do Ácido Retinóico All-Trans (ATRA) sobre a Apoptose em Neutrófilos

O ácido retinóico all-trans (ATRA) desempenha papéis importantes na hematopoiese em diferentes modelos, sendo capaz de promover a diferenciação granulocítica em linhagens celulares leucêmicas (Paul et al., 1995; Mehta, 2002) e de inibir paralelamente o desenvolvimento de eosinófilos a partir da medula óssea humana (Upham *et al.*, 2002). Em estudos anteriores do nosso laboratório, foi possível evidenciar, através da análise global de expressão gênica em Microarray de DNA, que um dos genes mais intensamente afetados pelo tratamento de culturas de medula óssea com dexametasona (a qual, ao contrário do ATRA, potencia a produção de eosinófilos neste sistema) foi o CBP, que codifica um fator de transcrição crítico para a sinalização por ATRA. Estudos subseqüentes demonstraram que ATRA induzia apoptose em eosinófilos imaturos, presentes em cultura de medula óssea murina, e que este efeito era bloqueado pela dexametasona. Com base nestes dados, procuramos analisar no presente trabalho se os efeitos pró-apoptóticos do ATRA podiam ser detectados igualmente em cultura de neutrófilos humanos maduros, isolados do sangue periférico, tendo em vista que estes apresentam o mesmo padrão de resposta à dexametasona que os eosinófilos murinos imaturos, ou seja, inibição da apoptose.

Inicialmente, neutrófilos purificados foram plaqueados na concentração final de 4×10^6 células/mL, em triplicata, na ausência ou presença de ATRA, nas concentrações finais de 1 e 100 nM por 20 horas, e o número de neutrófilos apoptóticos foi observado por microscopia ótica.

A Figura 10 mostra que o ATRA promove apoptose, de forma dose-dependente, em neutrófilos humanos nas duas concentrações utilizadas, após 20 horas de cultura, relativamente ao controle negativo, que se situa na faixa anteriormente definida para apoptose espontânea. Na dose mais alta, a apoptose em presença de ATRA foi quase o dobro da observada no controle (Painel inferior).

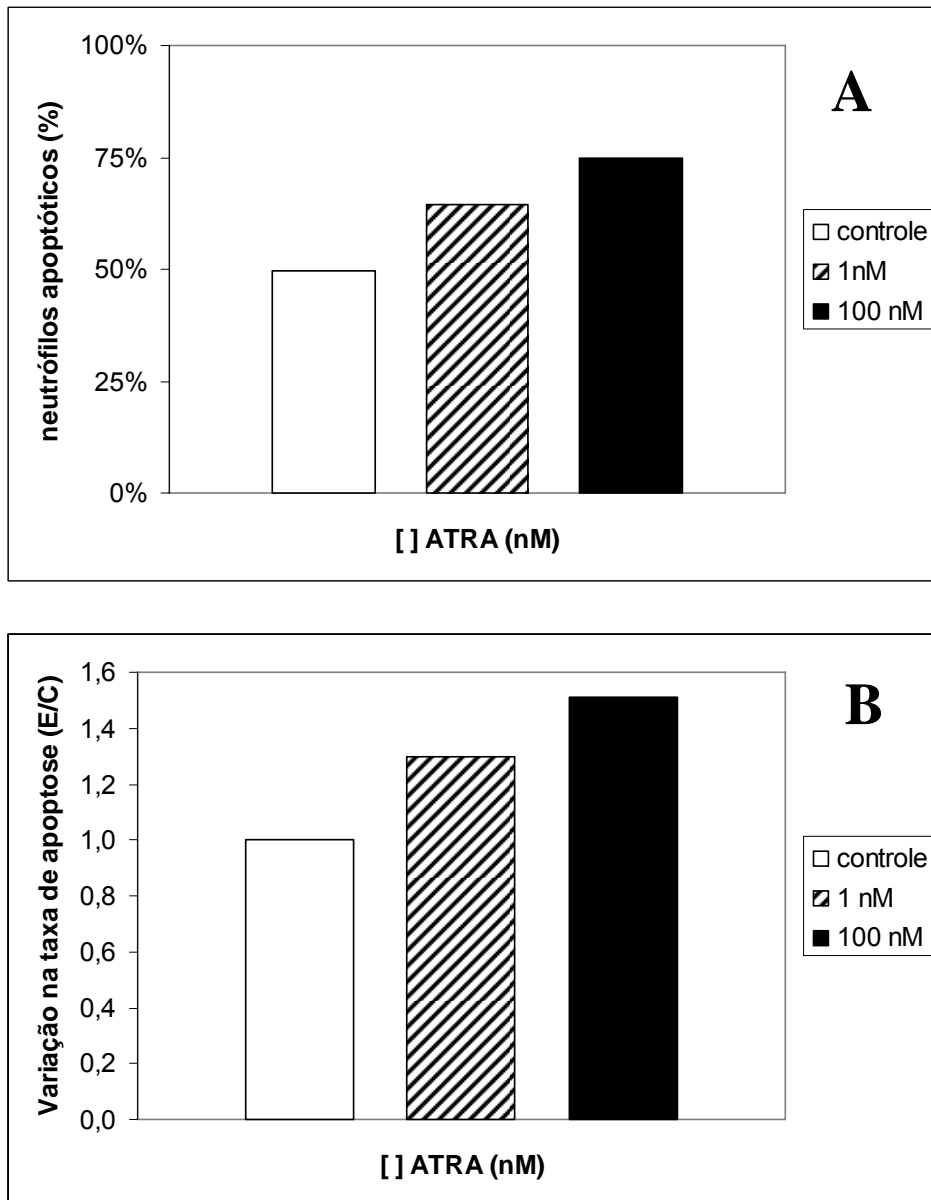


Figura 10 - Relação dose-resposta para ATRA na apoptose de neutrófilos em cultura(20h). O painel superior mostra a porcentagem de neutrófilos apoptóticos, medidos por observação microscópica direta, em experimento piloto, com granulócitos cultivados, na ausência ou presença de ATRA (1 e 100 nM) por 20 horas. Os resultados obtidos foram 49,5%; 64,4% e 74,7%, para o controle; 1 nM e 100 nM respectivamente. O painel inferior é uma representação alternativa para os mesmos dados, que permite visualizar melhor como o tratamento com ATRA 1 e 100 nM aumentou a proporção de neutrófilos apoptóticos em 30 e 51% respectivamente.

Em seguida, procuramos avaliar a ação do ATRA num grupo maior de doadores, concentrando-nos nas condições definidas nos experimentos-piloto (20 h, 10^{-7} M).

A Figura 11 resume os dados obtidos para o grupo ampliado (n=11 para o controle, n=3 para 1 nM de ATRA, n=4 para 100 nM de ATRA). O efeito do ATRA foi estatisticamente significativo ($p<0.001$) para 100 nM de ATRA, e para 1 nM de ATRA ($p<0.04$).

A apoptose induzida por ATRA foi acompanhada de intensa cariopicnose e cariorrexis em neutrófilos, enquanto eosinófilos presentes nas mesmas culturas estavam relativamente bem preservados, mesmo em 20 h de exposição (Figura 11, painel B). A predominância de cariorrexis avançada, mesmo antes da condensação definitiva do núcleo, permite reconhecer com segurança o padrão de morte celular induzida por ATRA em neutrófilos maduros, em comparação com outros agentes testados, como indometacina (Figura 14).

Estes dados, em conjunto, demonstram um efeito inédito do ATRA, ao induzir apoptose em neutrófilos maduros do sangue periférico humano.

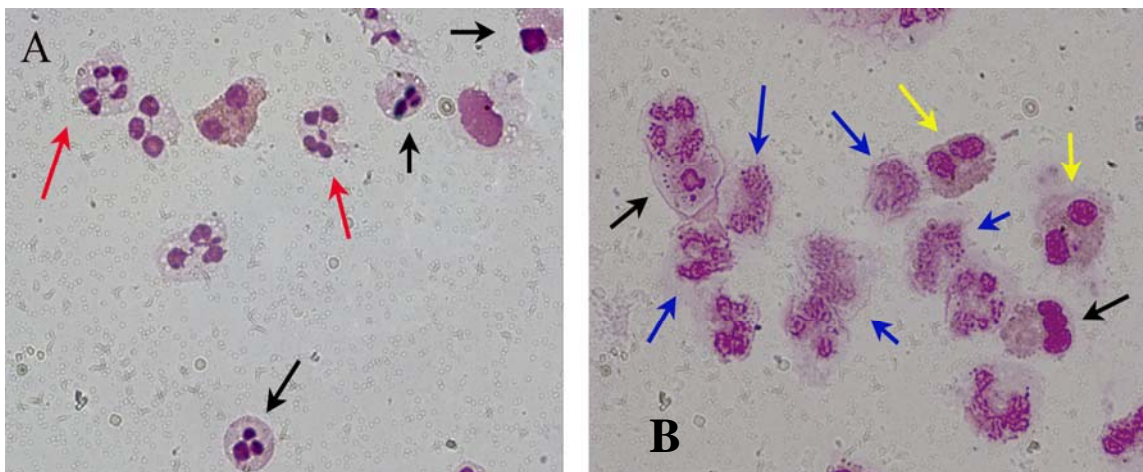
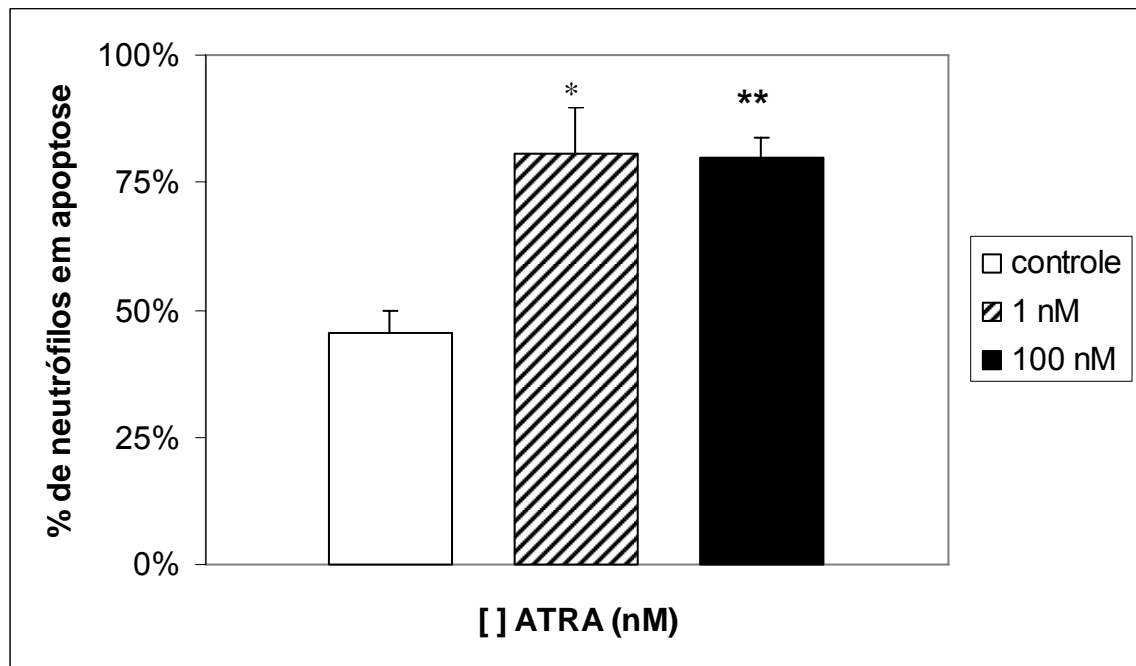


Figura 11 - Impacto da variabilidade entre doadores sobre a resposta apoptótica ao ATRA em neutrófilos. O gráfico representa a média \pm SEM da porcentagem de neutrófilos apoptóticos, obtidos após incubação por 20 horas, na ausência ($n=11$) ou presença de ATRA 1 nM ($n=3$) e 100 nM ($n=4$). Os resultados encontrados foram 45,5%; 87% e 80%, para o controle, 1 e 100 nm de ATRA respectivamente. As diferenças entre os grupos foram significativas ($*p<0.04$ entre o controle e 1 nM, e $**p<0.001$ entre controle e 100 nM). O painel A é de uma cultura de 20h, onde se nota que quase a metade dos neutrófilos são apoptóticos (setas pretas), espalhados entre células com aspecto normal (setas vermelhas). O painel B indica as alterações observadas com o cultivo na presença de ATRA 100 nM pelo mesmo período (aumento 1000x). Note-se a cariocinose (setas pretas), e a cariorrexis avançada (setas azuis), em neutrófilos, na vizinhança de eosinófilos relativamente preservados (setas amarelas).

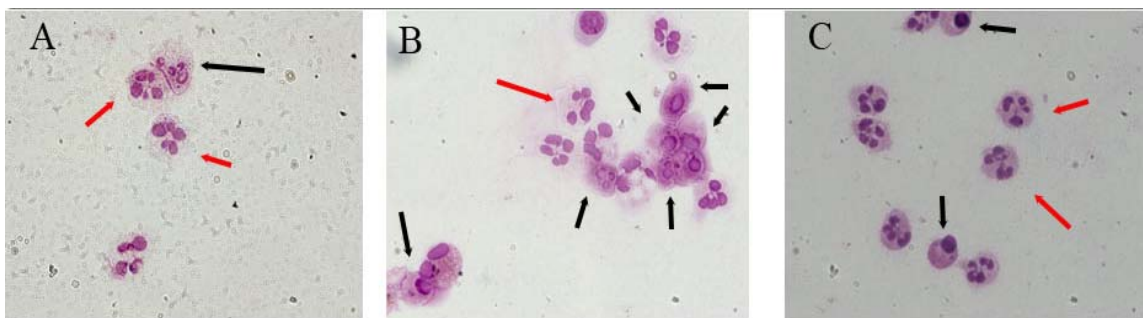
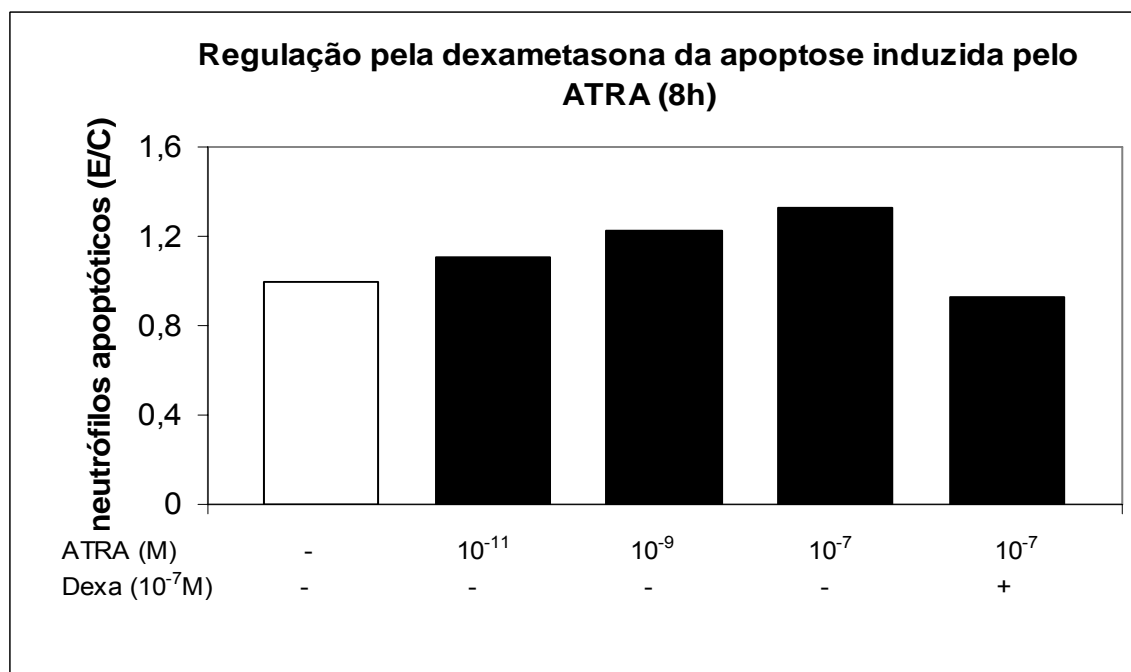
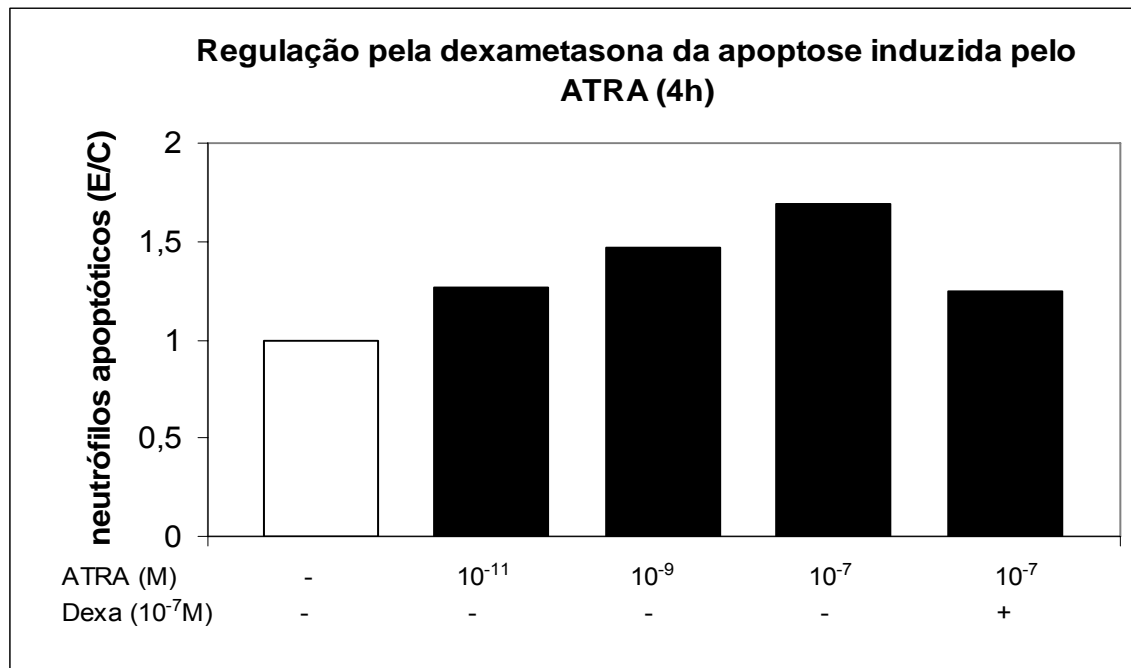
7.6 Interação entre a Dexametasona e o ATRA na Indução de Apoptose em Neutrófilos

Em cultura de medula óssea murina, o ATRA induz apoptose em eosinófilos em desenvolvimento. A dexametasona interage com o ATRA neste sistema, impedindo a indução de apoptose, o que indica a existência de um *cross-talk* entre os dois sistemas de sinalização. Os experimentos descritos a seguir tiveram como objetivo verificar se uma interação semelhante ocorria em neutrófilos humanos, uma vez que o padrão de resposta destes últimos, tanto ao ATRA, como à dexametasona, quando acrescentados individualmente à cultura, é idêntico.

Para testar esta hipótese, um experimento piloto foi realizado, com neutrófilos purificados, incubados por diferentes intervalos de tempo (4; 8 e 20h), em meio de cultura, ou na presença de ATRA (10 pM; 1 nM e 100 nM), ou ainda na presença de ATRA e dexametasona (100nM de ambas as drogas).

Como mostrado na Figura 12, o ATRA induziu apoptose nas três concentrações testadas, de forma tempo-dependente. A dexametasona bloqueou a indução de apoptose na concentração mais elevada de ATRA, para os três tempos de observação.

Estes dados documentam uma interação entre as vias de sinalização induzidas pelo ATRA e pela dexametasona, do mesmo tipo que foi anteriormente encontrado em eosinófilos murinos diferenciando-se em cultura de medula óssea.



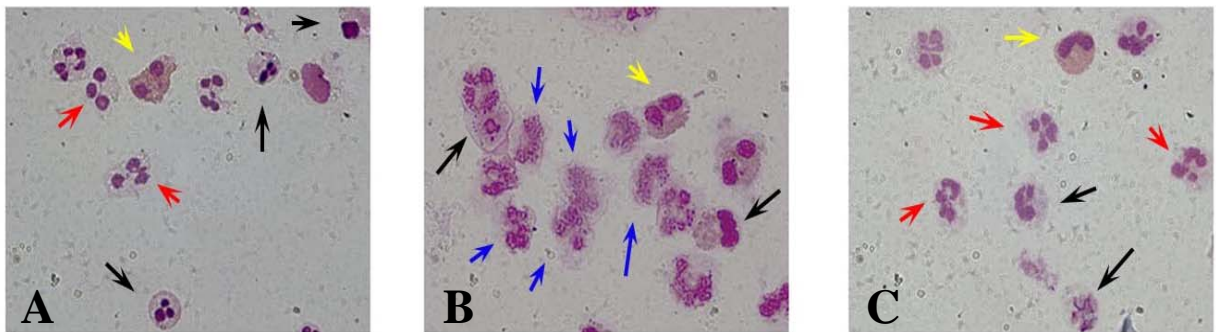
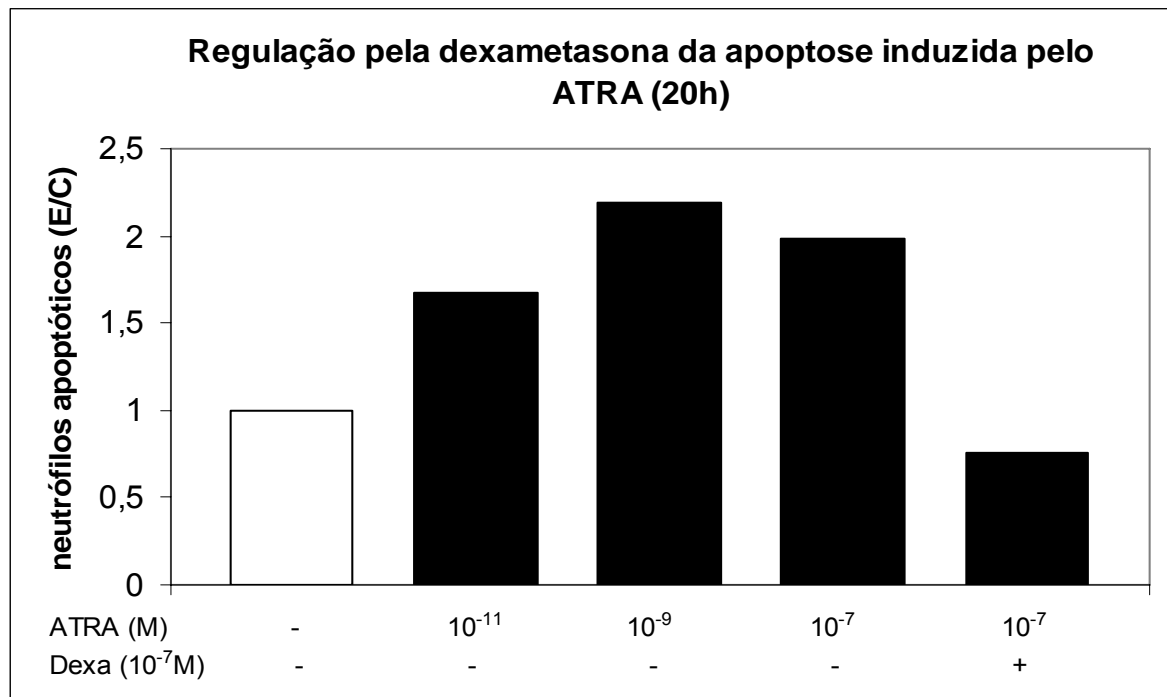


Figura 12 - Regulação pela dexametasona da apoptose induzida pelo ATRA.

Neutrófilos purificados foram incubados por 4, 8 ou 20 horas, em meio, na presença de ATRA (1pM, 1 nM e 100 nM) ou de ATRA (100 nM) e dexametasona (100 nM). A taxa de apoptose foi determinada microscopicamente. O experimento mostra a capacidade da dexametasona em se contrapor à indução de apoptose pelo ATRA já a partir de 4 horas, sendo esse efeito muito mais pronunciado no tempo de 20h. As micrografias exemplificam o demonstrado nos gráficos, com os painéis A representando os controles; os painéis B, a adição de ATRA 100 nM; e os painéis C as culturas estabelecidas com ATRA e dexametasona (ambos na concentração de 100 nM) (aumento 1000x). Neutrófilos apoptóticos, reconhecíveis pela cariopícnose (setas pretas), neutrófilos preservados (setas vermelhas), eosinófilos preservados (setas amarelas) e neutrófilos apoptóticos em cariorrexis avançada (setas azuis) são identificados nos diferentes painéis.

7.7 Efeito da Indometacina sobre a Apoptose em Neutrófilos

A indometacina é um agente anti-inflamatório descrito na literatura como tendo um efeito dose-dependente no processo de ativação neutrofílica (Negrotto *et al.*, 2006), visto que ela tem efeito estimulatório em concentrações mais altas e inibitório nas mais baixas. Outros agentes anti-inflamatórios não esteroidais apresentam ações pró-apoptóticas em doses elevadas, e antagonizam os efeitos de mediadores inflamatórios em promover a sobrevivência de neutrófilos *in vitro* (Northover, 1982). Testar se a indometacina tem efeitos sobre a apoptose em neutrófilos seria importante para definir se os prostanóides desempenham algum papel nos efeitos modulatórios observados com ATRA e dexametasona, tendo em vista que tanto a indometacina como os glicocorticóides inibem a síntese de prostanóides.

Com o intuito de observar se a indometacina tem efeito sobre a apoptose em neutrófilos humanos maduros, cultivamos granulócitos purificados de dois doadores na concentração final de 4×10^6 células/mL, em triplicata, na ausência ou presença de indometacina nas concentrações finais de 1 e 100 μM , por 20h. A faixa de concentrações foi definida com base nos estudos citados, para incluir as que provocam tanto efeitos inibitórios como estimulatórios.

A Figura 13 mostra que a indometacina é um potente indutor de apoptose em neutrófilos, nas duas concentrações testadas (42,45% e 55,78% a mais de neutrófilos apoptóticos com 1 e 100 μM de indometacina respectivamente). O efeito foi observado em 20 h, que é um tempo consideravelmente mais longo do que o utilizado nos estudos citados (45 a 60 minutos).

A Figura 14 ilustra os efeitos da indometacina com um grupo mais amplo de doadores (n=16 no controle e n=5 no tratamento com a droga). A diferença entre os controles e as amostras expostas à indometacina 100 μ M foi altamente significativa ($p < 0.001$).

A morte celular induzida por indometacina em neutrófilos apresentou muitas características morfológicas de apoptose, como a cariopicnose e a cariorrexis, com perda da lobulação característica do núcleo, e formação de massas aglutinadas com aspecto de colar de contas. Contudo, a redução do citoplasma que era esperada não foi observada, e, em muitos casos, o citoplasma se mostrou intensamente corado, acompanhado de um relativo apagamento da coloração do núcleo, sugerindo que o processo de apoptose foi complicado pela ocorrência de necrose, seja primária, seja secundária (Figura 14, Painel B).

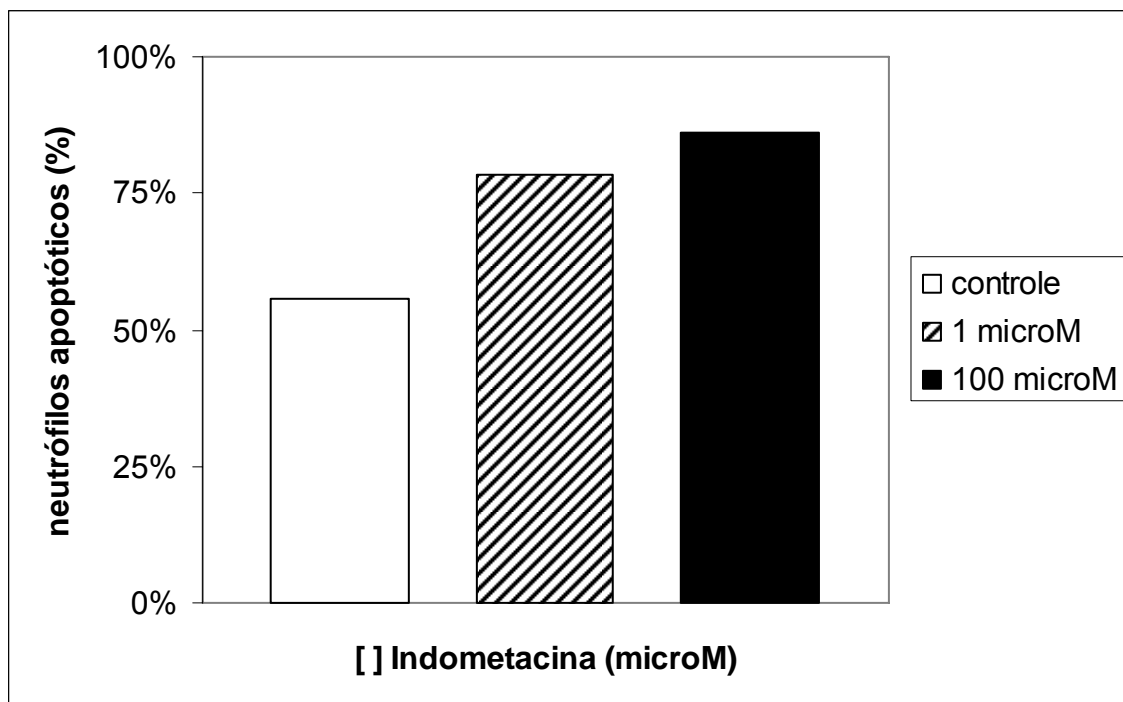


Figura 13 - Relação dose-resposta para indometacina na apoptose de neutrófilos em cultura(20h). O painel A mostra a porcentagem de neutrófilos apoptóticos num experimento piloto ($n=2$), onde as células foram incubadas na ausência ou presença de indometacina (1 e 100 μM) por 20 horas, e os valores obtidos após observação microscópica direta foram de 55,7%; 78,5% e 86,1%, para o controle; 1 μM e 100 μM , respectivamente.

Estes resultados, tomados em conjunto, documentam uma ação pró-apoptótica inédita para a indometacina sobre neutrófilos humanos maduros. Curiosamente, a indometacina, um inibidor da síntese de prostanóides, tem efeitos totalmente opostos aos da dexametasona, o que não sustenta a hipótese de que a inibição da síntese de prostanóides, dentre os muitos efeitos conhecidos da dexametasona, seja o mecanismo pelo qual esta inibe a apoptose espontânea e a apoptose induzida por ATRA neste sistema.

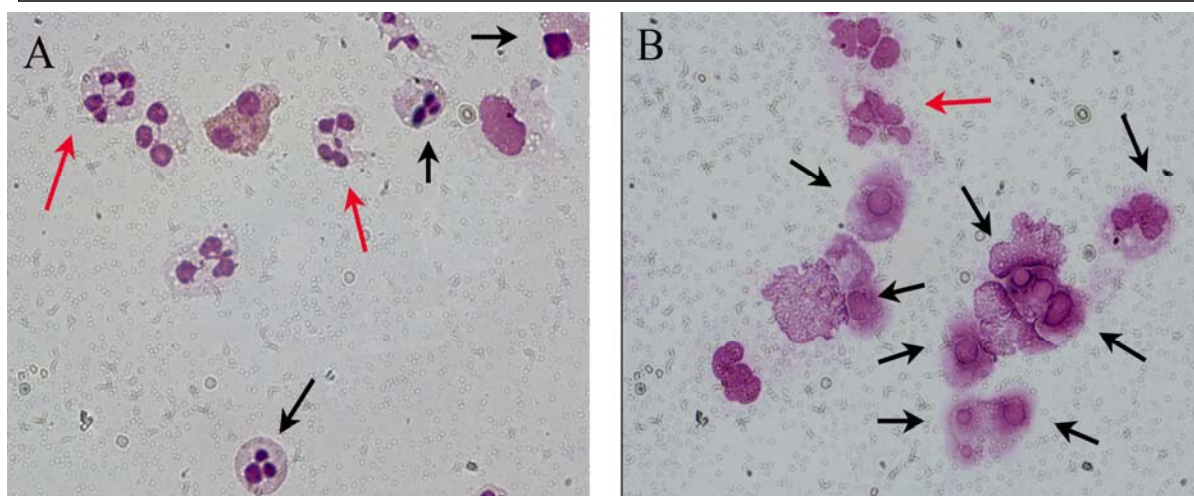
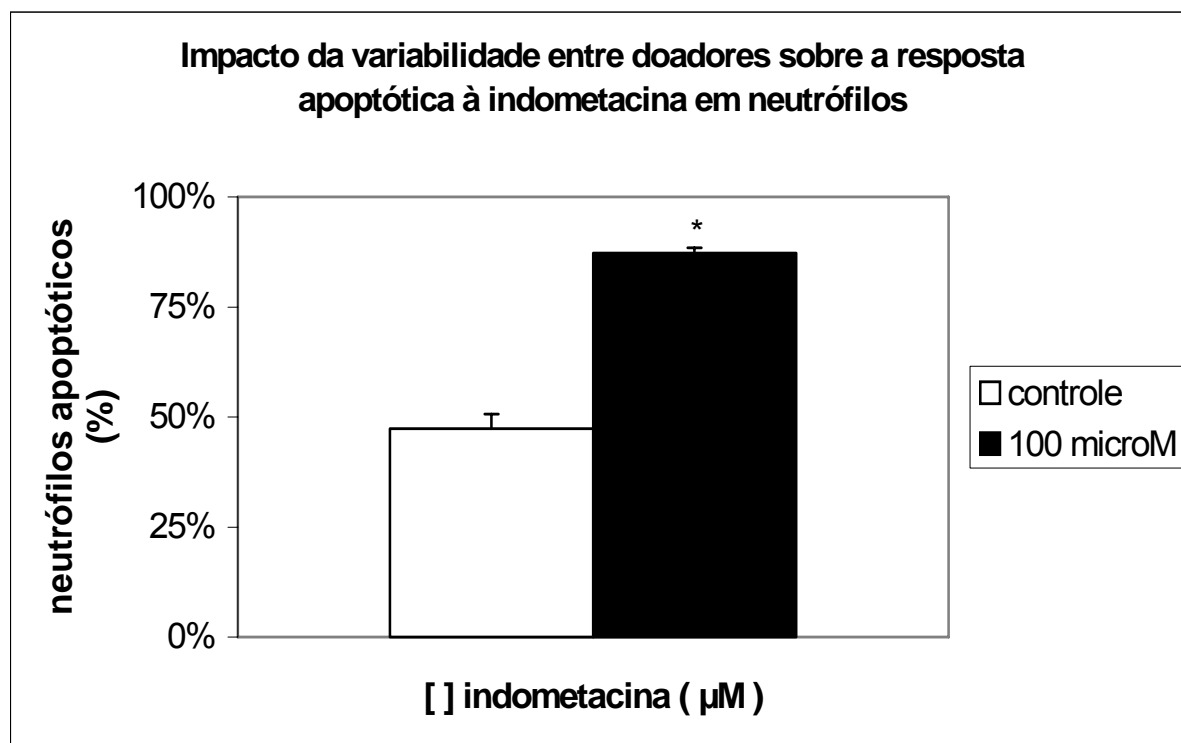


Figura 14 - Impacto da variabilidade entre doadores sobre a resposta apoptótica à indometacina em neutrófilos. O gráfico representa a média \pm SEM da porcentagem de neutrófilos apoptóticos, obtidos após incubação por 20 horas, na ausência ($n=16$) ou presença de indometacina 100 μM ($n=5$). Os resultados encontrados foram $47,37 \pm 3,31\%$ e $87,26 \pm 1,22\%$, para o controle e 100 μM de indometacina respectivamente ($*p < 0.001$). A micrografia do painel A ilustra uma cultura controle de 20h, enquanto o painel B ilustra uma cultura de 20h na presença de indometacina 100 μM (aumento de 1000x), apresentando extensa morte celular entre neutrófilos, com uma mistura de sinais morfológicos de apoptose e de necrose.

DISCUSSÃO

O presente estudo nasceu de uma tentativa de aplicar à apoptose de neutrófilos e eosinófilos maduros, isolados do sangue periférico de adultos normais, hipóteses geradas pelo estudo de eosinófilos imaturos, produzidos em cultura de medula óssea murina.

A extrapolação de hipóteses de uma fase a outra do desenvolvimento, e através de barreiras de espécie, se baseia na observação freqüente de que processos bioquímicos fundamentais são altamente conservados através de consideráveis distâncias filogenéticas, e que os processos celulares refletem programas genéticos e bioquímicos que funcionam como blocos altamente organizados, a despeito das inegáveis diferenças entre espécies no que diz respeito às seqüências de genes individuais, ou às estruturas das proteínas por eles codificados. Veja (Lee e Lee, 2005; Theilgaard-Monch *et al.*, 2006), para eosinófilos e neutrófilos, respectivamente.

Nosso esforço se justificava pelo interesse de confirmar, na espécie humana, a ocorrência de interações até aqui inéditas entre substâncias regulatórias, como o ATRA e a dexametasona, descobertas em cultura de medula óssea murina (manuscrito em preparação). Um interesse adicional surge do fato de que neutrófilos humanos de sangue periférico (isto é, que ainda não foram induzidos a migrar para os tecidos por estímulos inflamatórios) são muito mais acessíveis a estudos bioquímicos e moleculares do que a sua contrapartida em camundongos, e, portanto, a demonstração de que tais células se comportam segundo padrões previamente estabelecidos em eosinófilos murinos representaria uma abertura para a realização de estudos bioquímicos que são de difícil implementação no modelo original.

Os resultados obtidos permitiram confirmar que a resposta de neutrófilos humanos ao ATRA e à dexametasona se assemelha à observada em eosinófilos murinos (indução de apoptose pelo ATRA, proteção pela dexametasona). A abordagem comparativa adotada no nosso estudo permitiu igualmente mostrar que os eosinófilos humanos maduros, presentes nas mesmas culturas, não seguem este padrão de resposta (resistência à apoptose pelo ATRA, indução de apoptose pela dexametasona).

Portanto, se nos limitarmos a observar a resposta ao ATRA e à dexametasona, os resultados obtidos são compatíveis com a fórmula adotada por nós, de que a resposta à dexametasona em eosinófilos imaturos murinos se

assemelha à observada em neutrófilos maduros humanos, mas difere da observada em eosinófilos humanos maduros (dados não publicados).

Em outras palavras, se nos limitarmos à análise destes agentes, os resultados sugerem que os estudos realizados em eosinófilos murinos em desenvolvimento têm valor preditivo para as respostas de neutrófilos maduros humanos frente a agentes indutores ou inibidores da apoptose. Este valor preditivo é exemplificado pela resposta apoptótica ao ATRA, que ainda não foi descrita na literatura sobre neutrófilos humanos maduros, e, ainda mais, pela anulação dos efeitos do ATRA com a dexametasona, combinação inédita na literatura sobre qualquer tipo celular hematopoiético.

Para apreciarmos o significado e as limitações do presente estudo, no entanto, é importante discutirmos em detalhe uma série de aspectos ligados às condições experimentais deste e dos demais trabalhos sobre o assunto encontrados na literatura, a saber: a) as semelhanças e diferenças nos procedimentos experimentais, e nos resultados obtidos em condições comparáveis; b) a relação entre as observações feitas por nós e as descritas por outros para o ATRA; c) os possíveis mecanismos de “cross-talk” entre ATRA e dexametasona; d) a relação entre as observações feitas por nós e as descritas por outros para a indometacina e outros agentes anti-inflamatórios não-esteroidais.

a) Comparação com as condições e resultados de outros estudos

A grande maioria dos estudos sobre apoptose em neutrófilos humanos (referidos em detalhe na Revisão da Literatura) foi conduzida em condições

experimentais muito próximas da nossa: granulócitos isolados do sangue periférico por uma combinação de sedimentação em dextrana, separação do concentrado leucocitário em gradiente de densidade, e lise das hemácias residuais, as condições iônicas exatas desta última etapa constituindo uma fonte de variabilidade entre estudos. No caso de estudos centrados em eosinófilos, uma etapa de separação com beads magnéticas, para selecionar negativamente as células que não exibem CD16, costuma se seguir.

Quando essa etapa de purificação não é realizada, como é o nosso caso, a contaminação por eosinófilos é normalmente pequena respondendo por cerca de 3 a 4% dos granulócitos purificados, o que inviabiliza o uso das observações referentes a eosinófilos obtidas desses experimentos. Só se obteve um número razoável de eosinófilos (entre 30 e 60% dos granulócitos purificados) que conferisse um certo grau de segurança às observações no caso de três dos primeiros doadores a serem analisados, que apresentavam histórico alérgico e que estavam em crise no momento da coleta, o que nos levou a decidir pela impraticabilidade da análise dos efeitos em eosinófilos, e por não mais usar doadores em crise alérgica.

Em vários estudos, inclusive no nosso, a contaminação por eosinófilos é uma característica interessante para o experimentador, visto que o eosinófilo constitui um controle muito informativo sobre a resposta a vários agentes, ainda mais tendo em vista que não existe evidência de interferência dos eosinófilos no processo de apoptose em neutrófilos.

A grande maioria dos estudos, incluindo o nosso, utiliza critérios morfológicos para a detecção de apoptose. Isto se deve não somente a considerações de custo e complexidade técnica (microscopia convencional versus citometria de fluxo), mas principalmente à facilidade de evidenciar as mudanças da morfologia do núcleo e do citoplasma que ocorrem com a morte celular programada em neutrófilos. Elas são fáceis de detectar porque o núcleo do neutrófilo maduro tem uma morfologia muito característica, com vários lóbulos de estrutura delicada, interligados por finas tiras de cromatina, e porque no processo de apoptose esta estrutura é rapidamente perdida, com o desenvolvimento de massas picnóticas de tamanho irregular e forma globular, muitas vezes dispostas em colar de contas. A acumulação de cromatina na face interior do envelope nuclear é também uma alteração freqüentemente observada, e precoce, durante a apoptose em neutrófilos. A cariopicnose e a cariorrexia são indicadores bastante seguros de apoptose, e facilmente evidenciadas nas nossas culturas, assim como nas de outros estudos. A morfologia de células apoptóticas, no nosso caso, seguiu de perto aquela documentada em outros estudos (Ward *et al.*, 1999a; Derouet *et al.*, 2006). Cabe lembrar que a redução do citoplasma, no caso da apoptose em neutrófilos, é menos importante do que a observada em outros tipos celulares (Ward *et al.*, 1999a), o que é documentado também no presente estudo.

Mesmo assim, muitos estudos predominantemente morfológicos buscam respaldo para suas observações em análises em citometria de fluxo (Ward *et al.*, 1999a; Derouet *et al.*, 2006). Foi igualmente o que procuramos fazer no presente estudo. Em citometria de fluxo, pudemos documentar um aumento, tempo-dependente, do número de células marcadas com Anexina V e PI, assim como das marcadas com Anexina V, semelhante ao relatado por (Negrotto *et al.*, 2006).

Contrariamente a estes autores, contudo, nossas culturas continham uma proporção importante de células marcadas com PI, mas negativas para Anexina V. Por se tratar de um experimento inicial isto poderia ser melhorado com uma padronização melhor da metodologia, ou devido a algum problema com o processo de coleta e purificação deste doador específico, visto que a observação morfológica da cultura indicou que a mesma estava consideravelmente mais suja e com mais células mortas que o encontrado normalmente. Em qualquer hipótese, a citometria de fluxo confirma que a marcação esperada (Anexina V+) aumenta com o tempo, paralelamente à apoptose detectada por critérios microscópicos.

O principal argumento para sustentar a idéia de que os nossos experimentos foram conduzidos em condições comparáveis às dos trabalhos na literatura é a concordância dos resultados experimentais obtidos frente às mesmas condições. Nossos resultados documentaram a ocorrência de apoptose espontânea em cultura, num período de 20 h de observação, tanto em neutrófilos como em eosinófilos. As taxas de apoptose observadas estão em excelente concordância com os de trabalhos da literatura (ver, por exemplo, Ward et al., 1999, para os valores de apoptose espontânea, em 2 h e 20 h).

De forma ainda mais significativa, nossos resultados documentaram efeitos idênticos aos da literatura para um importante agente regulatório, a dexametasona. Esta inibiu de forma importante a apoptose em neutrófilos, de forma tempo- e concentração-dependente, preservando a morfologia típica. O efeito da dexametasona nas nossas condições experimentais constitui um forte argumento a

favor de estarmos trabalhando em condições que atendem aos padrões internacionais no estudo de apoptose em neutrófilos.

b. Efeitos do ATRA sobre neutrófilos humanos

Como detalhamos anteriormente, apesar da literatura mencionar freqüentemente efeitos do ATRA sobre granulócitos, inclusive a indução de morte celular, estas menções devem ser interpretadas com cuidado. O ATRA é utilizado primariamente como um potente regulador da expressão gênica, e indutor de diferenciação celular em diversas linhagens celulares, especialmente de origem hematopoiética (ver Revisão da Literatura). Esta utilização é de grande interesse pelo seu potencial terapêutico em tumores malignos do sistema linfo-hematopoiético. No caso de algumas linhagens celulares utilizadas freqüentemente em estudos com ATRA, como a linhagem HL-60, o resultado da indução de diferenciação pelo ATRA é a acumulação de células com morfologia e citoquímica próximas das dos neutrófilos normais. Contudo, a diferenciação não é completa, e costuma ser ajudada por uma série de agentes, como os derivados da Vitamina D. Por esta razão, é inapropriado falar-se em efeitos do ATRA sobre neutrófilos, quando nos referimos apenas a efeitos sobre culturas de células HL-60. Neste sentido, o presente estudo é original, visto que a literatura por nós levantada se limita a estudos com linhagens celulares expostas ao ATRA, e não com neutrófilos maduros.

Alguns dos estudos com linhagens como HL-60 ressaltaram a tendência das culturas acumularem células apoptóticas, algum tempo depois da indução de diferenciação com ATRA. Contudo, estes estudos não permitiram distinguir entre

uma apoptose induzida diretamente pelo ATRA e uma apoptose resultante do processo de envelhecimento celular (a chamada apoptose espontânea) do neutrófilo. Algumas observações sugerem que receptores distintos estão envolvidos na indução de diferenciação e apoptose da linhagem HL-60 em presença de ATRA. No nosso estudo, não chegamos a fazer esta distinção. Ela deverá ser possível, no entanto, em experimentos futuros, quando for possível testar os efeitos pró-apoptóticos de diferentes retinóides, com afinidades distintas pelos diferentes subtipos de receptor retinóide.

Apesar desta limitação, o presente estudo não deixa dúvidas sobre a capacidade de ATRA induzir rapidamente apoptose em neutrófilos maduros. A morfologia do processo é característica, com uma predominância do aspecto de cariorrexis, o que sugere tratar-se de um processo distinto de uma simples aceleração da apoptose espontânea.

c) Ainda mais interessante é a capacidade da dexametasona bloquear os efeitos pró-apoptóticos do ATRA. Por um lado, isto confirma a existência de “cross-talk” entre os dois sistemas. Por outro lado, os efeitos antagônicos da dexametasona (isto é, o seu bloqueio da apoptose induzida pelo ATRA) se fazem sentir mais precocemente que os seus efeitos como agonista (isto é, bloqueando diretamente a apoptose em neutrófilos). Esta diferença em cinética sugere que mecanismos distintos possam estar envolvidos nestas duas ações.

Um aspecto importante do mecanismo de ação da dexametasona, como antagonista do ATRA, que merece, sem dúvida, uma investigação futura, é o

possível envolvimento do co-fator de transcrição CBP (do inglês cre binding protein). Este tinha sido implicado como um dos genes-alvo da dexametasona na cultura de medula óssea murina (manuscrito em preparação). Como CBP é um dos mediadores da ação regulatória do ATRA sobre a expressão gênica, a sua repressão forneceria um mecanismo possível de bloqueio pela dexametasona naquele sistema. Esta possibilidade não foi ainda investigada com neutrófilos humanos, mas pretendemos avaliá-la futuramente. Para isto, podem ser utilizadas técnicas de biologia molecular, como a transfecção com construções gênicas que permitam superexpressar CBP, e, portanto, vencer o bloqueio imposto pela dexametasona, que reprime a transcrição de CBP. Alternativamente, técnicas de interferência de RNA (RNAi) podem ser utilizadas para reduzir a produção da proteína CBP, na ausência de tratamento com dexametasona, fornecendo assim uma evidência independente de que este seria um dos fatores críticos na atuação do ATRA. O uso de RNAi, no entanto, é sujeito a condições técnicas, que envolvem tanto o tempo de vida útil da célula *in vitro*, como o “turnover” da proteína cuja expressão queremos atenuar. Portanto, a técnica poderá ou não ser diretamente utilizada em neutrófilos maduros, que têm uma sobrevida limitada *in vitro*. Em caso negativo, talvez a mesma abordagem possa ser utilizada num sistema de granulopoiese *in vitro*, a partir de medula óssea ou de sangue de cordão umbilical.

d. Indução de morte celular em neutrófilos humanos pela indometacina

Antes de discutirmos os resultados da adição de indometacina sobre a apoptose de neutrófilos humanos maduros, vale lembrar que a bibliografia sobre o assunto é inexistente, embora existam referências sobre a ação modulatória da indometacina sobre a ativação de neutrófilos, e existam também referências sobre

os efeitos pró-apoptóticos de outros agentes anti-inflamatórios não-esteroidais, como aspirina e salicilato de sódio (ver Revisão da Literatura). Em estudos de ativação, a indometacina, usada em concentrações distintas, tanto aumentou como diminuiu a ativação celular. A variação de efeitos dependeu do parâmetro de análise escolhido para analisar a ativação neutrofílica, indo da localização do cálcio intracelular (Northover, 1982), à capacidade fagocítica e metabolismo oxidativo do neutrófilo (Horan *et al.*, 1983; Gay *et al.*, 1985; Huang *et al.*, 2002). Como é de se esperar, todos os estudos ditos de ativação em uma célula de vida útil tão curta se passam numa escala de minutos ou horas após o seu isolamento, numa fase, portanto, em que a apoptose espontânea, e mesmo a induzida por agentes como o ATRA, ainda não é significativa.

Isto explica porque a mesma indometacina que modula a ativação celular em neutrófilos pode ter efeitos pró-apoptóticos importantes sem que estes tenham sido percebidos antes. Para detectá-los, de fato, é preciso esperar um tempo bem maior do que necessário para ver modulação de funções efetoras.

Apesar de ser considerada um agente anti-inflamatório não-esteroidal (NSAID na sigla em inglês), a indometacina apresenta, segundo relatado na literatura, alguns efeitos pró-inflamatórios *in vitro*, ao atuar sobre o neutrófilo, como a potenciação da sua capacidade de produzir íons superóxido em resposta ao zimosan (Gay *et al.*, 1985) e a restauração da motilidade neutrofílica inibida pela peroxidase (Anderson *et al.*, 1981; Northover, 1981). Dentre as ações anti-inflamatórias, vale destacar a diminuição da desgranulação, quimiotaxia e fagocitose (Northover, 1981; , 1982; Huang *et al.*, 2002).

Os efeitos inibitórios da indometacina sobre o metabolismo neutrofílico seriam semelhantes aos vistos com dexametasona e salicilato de sódio, mas, diferentemente do relatado para a dexametasona, em altas doses a indometacina e o salicilato são capazes de causar danos aos neutrófilos, pelo menos os de coelho (Northover, 1981; , 1982)

O salicilato de sódio (outro NSAID) estimula a apoptose neutrofílica em altas doses (Derouet *et al.*, 2006), e se opõe aos efeitos anti-apoptóticos de citocinas inflamatórias. A propriedade comum aos NSAIDs é a capacidade de inibir, reversivelmente ou irreversivelmente, a ciclo-oxigenase. Por outro lado, entre os muitos efeitos de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF e a IL-1 β , se incluem a capacidade de promover a produção de prostaglandinas, através da ciclo-oxigenase. Poderia ser, portanto, levantada a hipótese de que a indução de apoptose por indometacina, documentada no presente estudo, representa apenas um exemplo a mais de um efeito comum a todos os membros de uma mesma classe de drogas, e que o mecanismo da morte celular envolve a retirada dos efeitos citoprotetores de um ou mais produtos da ciclo-oxigenase.

Contudo, os diferentes NSAIDs diferem grandemente na eficiência e no mecanismo desta inibição, e o salicilato de sódio é considerado um inibidor fraco, comparativamente à indometacina. Ademais, a dexametasona também inibe a síntese de prostanóides, mas isto não resulta em morte celular comparável à observada por nós com indometacina e por outros com salicilato de sódio e aspirina. No nosso estudo, um dos experimentos foi realizado com um doador em uso crônico de aspirina, mas não foi encontrada uma taxa de apoptose espontânea mais elevada

que nos demais doadores, nem uma morfologia de morte celular semelhante à observada com indometacina. Portanto, ainda precisa ser estabelecido se existe uma relação entre a inibição da ciclo-oxigenase e a morte celular induzida por indometacina em neutrófilos.

Também vale notar, como pôde ser observado nas microfotografias apresentadas, que apesar de induzirem apoptose em proporções semelhantes, o ATRA e a indometacina provocam alterações morfológicas muito distintas, o que levanta a pergunta se o mecanismo de ação do ATRA e da indometacina para a indução de apoptose em neutrófilos seria o mesmo, e em caso negativo, se a ação da indometacina também poderia ser antagonizada pela dexametasona.

No total, os dados apresentados neste trabalho respondem a algumas perguntas sobre o comportamento de neutrófilos frente a alguns agentes sabidamente capazes de regular a apoptose de eosinófilos murinos, ao mesmo tempo em que levantam muitas outras perguntas sobre o “crosstalk” entre dexametasona e ATRA, o mecanismo pelo qual a indometacina estimula a apoptose neutrofílica, e se esses mesmos efeitos também se aplicam a neutrófilos humanos imaturos obtidos a partir de sangue de cordão umbilical.

CONCLUSÕES

A densidade da cultura tem um efeito importante sobre a taxa de apoptose espontânea, tanto em eosinófilos, quanto em neutrófilos, com uma proteção observada na densidade mais elevada, sendo a taxa de apoptose espontânea proporcional ao tempo de cultivo.

A observação de apoptose espontânea em neutrófilos após 20 horas de cultura por microscopia ótica é compatível com as análises realizadas por citometria de fluxo.

O ATRA é capaz de induzir intensamente a apoptose de neutrófilos em cultura, sendo o efeito detectado a partir de 4 horas de incubação, e com um grande número de neutrófilos com alterações nucleares bem características, onde predominam uma intensa cariorexis em vez do padrão picnótico predominantemente associado à apoptose espontânea após 20 horas de cultura com ATRA.

A dexametasona é capaz de inibir, de forma dose-dependente, a apoptose espontânea de neutrófilos em cultura. Este é um efeito tempo-dependente, detectado a partir de 8 horas de incubação, e mais pronunciado em cultura de 20 horas de duração. A dexametasona também foi capaz de impedir o efeito do ATRA sobre os neutrófilos em cultura, de forma tempo-dependente, a partir de 4 horas de incubação, e culminando com a abolição completa do efeito do ATRA após 20 horas de incubação.

A indometacina foi capaz de aumentar intensamente a apoptose de neutrófilos em cultura por 20 horas.

BIBLIOGRAFIA

AGARWAL, N. e MEHTA, K. Possible involvement of Bcl-2 pathway in retinoid X receptor alpha-induced apoptosis of HL-60 cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v.230, n.2, Jan 13, p.251-3. 1997.

AKGUL, C. e EDWARDS, S. W. Regulation of neutrophil apoptosis via death receptors. **Cell Mol Life Sci**, v.60, n.11, Nov, p.2402-8. 2003.

AKGUL, C., MOULDING, D. A. e EDWARDS, S. W. Molecular control of neutrophil apoptosis. **FEBS Lett**, v.487, n.3, Jan 5, p.318-22. 2001.

ALENZI, F. Q., *et al.* Apoptosis role of FAS/FAS ligand system in the regulation of myelopoiesis. **Yale J Biol Med**, v.78, n.1, Jan, p.25-36. 2005.

ALLEN, D. A., YAQOUB, M. M. e HARWOOD, S. M. Mechanisms of high glucose-induced apoptosis and its relationship to diabetic complications. **J Nutr Biochem**, v.16, n.12, Dec, p.705-13. 2005.

ALLENDORF, D. J., *et al.* C5a-mediated leukotriene B4-amplified neutrophil chemotaxis is essential in tumor immunotherapy facilitated by anti-tumor monoclonal antibody and beta-glucan. **J Immunol**, v.174, n.11, Jun 1, p.7050-6. 2005.

ALVARADO-KRISTENSSON, M., *et al.* p38-MAPK signals survival by phosphorylation of caspase-8 and caspase-3 in human neutrophils. **J Exp Med**, v.199, n.4, Feb 16, p.449-58. 2004.

ANDERSON, R., OOSTHUIZEN, R. e GRABOW, G. Prevention of peroxidase mediated inhibition of neutrophil motility and lymphocyte transformation by levamisole, OMPI, sodium aurothiomalate, indomethacin and tolmetin in vitro. **Int J Immunopharmacol**, v.3, n.2, p.123-32. 1981.

ASHKENAZI, A. e DIXIT, V. M. Death receptors: signaling and modulation. **Science**, v.281, n.5381, Aug 28, p.1305-8. 1998.

BABIOR, B. M. Neutrophil function as related to neutrophil-endothelial cell interactions. **Nouv Rev Fr Hematol**, v.34 Suppl, p.S29-35. 1992.

BALAZS, C., BOKK, A. e KISS, E. Inhibition of metabolic activity of polymorphonuclear granulocytes by thyroid stimulating antibodies. **J Endocrinol Invest**, v.15, n.6, Jun, p.465-9. 1992.

BANNERMAN, D. D., *et al.* The Fas-associated death domain protein suppresses activation of NF-kappa B by LPS and IL-1 beta. **J Clin Invest**, v.109, n.3, Feb, p.419-25. 2002.

BARRY, D. P. e BEAMAN, B. L. Modulation of eukaryotic cell apoptosis by members of the bacterial order Actinomycetales. **Apoptosis**, v.11, n.10, Oct, p.1695-707. 2006.

BEERE, H. M. e GREEN, D. R. Stress management - heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. **Trends Cell Biol**, v.11, n.1, Jan, p.6-10. 2001.

BEST, S. M. e BLOOM, M. E. Caspase activation during virus infection: more than just the kiss of death? **Virology**, v.320, n.2, Mar 15, p.191-4. 2004.

BIFFL, W. L., *et al.* Clinically relevant hypertonicity prevents stored blood- and lipid-mediated delayed neutrophil apoptosis independent of p38 MAPK or caspase-3 activation. **Surgery**, v.134, n.1, Jul, p.86-91. 2003.

BIRGENS, H. S., *et al.* Lactoferrin receptors in normal and leukaemic human blood cells. **Scand J Haematol**, v.33, n.3, Sep, p.275-80. 1984.

BLACKWELL, N. M., *et al.* Reduced infiltration and increased apoptosis of leukocytes at sites of inflammation by systemic administration of a membrane-permeable I κ B α repressor. **Arthritis Rheum**, v.50, n.8, Aug, p.2675-84. 2004.

BOCHNER, B. S. Road signs guiding leukocytes along the inflammation superhighway. **J Allergy Clin Immunol**, v.106, n.5, Nov, p.817-28. 2000.

BORISH, L., *et al.* Recombinant interleukin-1 beta interacts with high-affinity receptors to activate neutrophil leukotriene B₄ synthesis. **Inflammation**, v.14, n.2, Apr, p.151-62. 1990.

BORREGAARD, N., *et al.* A variant form of X-linked chronic granulomatous disease with normal nitroblue tetrazolium slide test and cytochrome b. **Eur J Clin Invest**, v.13, n.3, Jun, p.243-8. 1983.

BORREGAARD, N. e HERLIN, T. Energy metabolism of human neutrophils during phagocytosis. **J Clin Invest**, v.70, n.3, Sep, p.550-7. 1982.

BOUCHIER-HAYES, L., LARTIGUE, L. e NEWMAYER, D. D. Mitochondria: pharmacological manipulation of cell death. **J Clin Invest**, v.115, n.10, Oct, p.2640-7. 2005.

BOYUM, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. **Scand J Clin Lab Invest Suppl**, v.97, p.7. 1968.

_____. Separation of blood leucocytes, granulocytes and lymphocytes. **Tissue Antigens**, v.4, n.4, p.269-74. 1974.

BREITMAN, T. R. Growth and differentiation of human myeloid leukemia cell line HL60. **Methods Enzymol**, v.190, p.118-30. 1990.

BREITMAN, T. R., SELONICK, S. E. e COLLINS, S. J. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.77, n.5, May, p.2936-40. 1980.

BROWN, G., *et al.* All-trans retinoic acid and 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 cooperate to promote differentiation of the human promyeloid leukemia cell line HL60 to monocytes. **Leukemia**, v.8, n.5, May, p.806-15. 1994.

BUNNETT, N. W. Protease-activated receptors: how proteases signal to cells to cause inflammation and pain. **Semin Thromb Hemost**, v.32 Suppl 1, Apr, p.39-48. 2006.

CAMPBELL, J. J., FOXMAN, E. F. e BUTCHER, E. C. Chemoattractant receptor cross talk as a regulatory mechanism in leukocyte adhesion and migration. **Eur J Immunol**, v.27, n.10, Oct, p.2571-8. 1997.

CARAMORI, G. e ADCOCK, I. Anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids targeting granulocytes. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v.4, n.4, Aug, p.455-63. 2005.

CARPENTIER, Y., *et al.* Cofactors in in vitro induction of apoptosis in HL60 cells by all-trans retinoic acid (ATRA). **Biochem Pharmacol**, v.55, n.2, Jan 15, p.177-84. 1998.

CASTRO-ALCARAZ, S., *et al.* NF-kappa B regulation in human neutrophils by nuclear I kappa B alpha: correlation to apoptosis. **J Immunol**, v.169, n.7, Oct 1, p.3947-53. 2002.

CECIC, I., SUN, J. e KORBELIK, M. Role of complement anaphylatoxin C3a in photodynamic therapy-elicited engagement of host neutrophils and other immune cells. **Photochem Photobiol**, v.82, n.2, Mar-Apr, p.558-62. 2006.

CHANG, H. Y. e YANG, X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. **Microbiol Mol Biol Rev**, v.64, n.4, Dec, p.821-46. 2000.

CHEN, Y. e ZYCHLINSKY, A. Apoptosis induced by bacterial pathogens. **Microb Pathog**, v.17, n.4, Oct, p.203-12. 1994.

CHIN, A. C. e PARKOS, C. A. Neutrophil transepithelial migration and epithelial barrier function in IBD: potential targets for inhibiting neutrophil trafficking. **Ann N Y Acad Sci**, v.1072, Aug, p.276-87. 2006.

CHOI, M., *et al.* Inhibition of NF-kappaB by a TAT-NEMO-binding domain peptide accelerates constitutive apoptosis and abrogates LPS-delayed neutrophil apoptosis. **Blood**, v.102, n.6, Sep 15, p.2259-67. 2003.

CHRISTOPHER, M. J. e LINK, D. C. Regulation of neutrophil homeostasis. **Curr Opin Hematol**, v.14, n.1, Jan, p.3-8. 2007.

CLARK, R. A. e KLEBANOFF, S. J. Role of the myeloperoxidase-H₂O₂-halide system in concanavalin A-induced tumor cell killing by human neutrophils. **J Immunol**, v.122, n.6, Jun, p.2605-10. 1979.

CLARKE, P., *et al.* Mechanisms of reovirus-induced cell death and tissue injury: role of apoptosis and virus-induced perturbation of host-cell signaling and transcription factor activation. **Viral Immunol**, v.18, n.1, p.89-115. 2005.

CLARKE, P. G. e CLARKE, S. Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. **Anat Embryol (Berl)**, v.193, n.2, Feb, p.81-99. 1996.

COLOTTA, F., *et al.* Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. **Blood**, v.80, n.8, Oct 15, p.2012-20. 1992.

COOKSON, B. T. e BRENNAN, M. A. Pro-inflammatory programmed cell death. **Trends Microbiol**, v.9, n.3, Mar, p.113-4. 2001.

COWBURN, A. S., *et al.* Aminopeptidase N (CD13) regulates tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in human neutrophils. **J Biol Chem**, v.281, n.18, May 5, p.12458-67. 2006.

COX, G. Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. **J Immunol**, v.154, n.9, May 1, p.4719-25. 1995.

COXON, A., *et al.* A novel role for the beta 2 integrin CD11b/CD18 in neutrophil apoptosis: a homeostatic mechanism in inflammation. **Immunity**, v.5, n.6, Dec, p.653-66. 1996.

CROCKETT-TORABI, E., *et al.* Activation of human neutrophils through L-selectin and Mac-1 molecules. **J Immunol**, v.154, n.5, Mar 1, p.2291-302. 1995.

CROMPTON, M. Bax, Bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis. **Curr Opin Cell Biol**, v.12, n.4, Aug, p.414-9. 2000.

DANG, P. M., *et al.* Anti-inflammatory effect of interleukin-10 on human neutrophil respiratory burst involves inhibition of GM-CSF-induced p47PHOX phosphorylation through a decrease in ERK1/2 activity. **Faseb J**, v.20, n.9, Jul, p.1504-6. 2006.

DELEO, F. R. Modulation of phagocyte apoptosis by bacterial pathogens. **Apoptosis**, v.9, n.4, Jul, p.399-413. 2004.

DEROUET, M., *et al.* Granulocyte macrophage colony-stimulating factor signaling and proteasome inhibition delay neutrophil apoptosis by increasing the stability of Mcl-1. **J Biol Chem**, v.279, n.26, Jun 25, p.26915-21. 2004.

_____. Sodium salicylate promotes neutrophil apoptosis by stimulating caspase-dependent turnover of Mcl-1. **J Immunol**, v.176, n.2, Jan 15, p.957-65. 2006.

DESAGHER, S. e MARTINOU, J. C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. **Trends Cell Biol**, v.10, n.9, Sep, p.369-77. 2000.

DISCIPIO, R. G., *et al.* C5a mediates secretion and activation of matrix metalloproteinase 9 from human eosinophils and neutrophils. **Int Immunopharmacol**, v.6, n.7, Jul, p.1109-18. 2006.

DRACH, J., *et al.* Retinoic acid-induced expression of CD38 antigen in myeloid cells is mediated through retinoic acid receptor-alpha. **Cancer Res**, v.54, n.7, Apr 1, p.1746-52. 1994.

_____. Rapid induction of CD38 antigen on myeloid leukemia cells by all trans-retinoic acid. **Biochem Biophys Res Commun**, v.195, n.2, Sep 15, p.545-50. 1993.

DUCKETT, C. S. Apoptosis and NF-kappa B: the FADD connection. **J Clin Invest**, v.109, n.5, Mar, p.579-80. 2002.

DURR, M. C., *et al.* Neutrophil chemotaxis by pathogen-associated molecular patterns--formylated peptides are crucial but not the sole neutrophil attractants produced by *Staphylococcus aureus*. **Cell Microbiol**, v.8, n.2, Feb, p.207-17. 2006.

EHRENGRUBER, M. U., GEISER, T. e DERANLEAU, D. A. Activation of human neutrophils by C3a and C5A. Comparison of the effects on shape changes, chemotaxis, secretion, and respiratory burst. **FEBS Lett**, v.346, n.2-3, Jun 13, p.181-4. 1994.

ELSAS, M. I. C. G., ELSAS P.X. Anti-Inflammatory Drug Effects on Apoptosis of Eosinophil Granulocytes Derived from Murine Bone-Marrow: Cellular Mechanisms as Related to Lineage, Developmental Stage and Hemopoietic Environment. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, v.5, n.1, February, p.13-26. 2006.

ELSAS, P. X., *et al.* The effects of allergen and anti-allergic drugs on murine hemopoietic cells: moving targets, unusual mechanisms, and changing paradigms. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v.2, n.4, Dec, p.329-37. 2003.

ENARI, M., *et al.* A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. **Nature**, v.391, n.6662, Jan 1, p.43-50. 1998.

FADEEL, B., *et al.* Involvement of caspases in neutrophil apoptosis: regulation by reactive oxygen species. **Blood**, v.92, n.12, Dec 15, p.4808-18. 1998.

FADEEL, B. e ORRENIUS, S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. **J Intern Med**, v.258, n.6, Dec, p.479-517. 2005.

FALCONE, F. H., ZILLIKENS, D. e GIBBS, B. F. The 21st century renaissance of the basophil? Current insights into its role in allergic responses and innate immunity. **Exp Dermatol**, v.15, n.11, Nov, p.855-64. 2006.

FERRANTE, A. Activation of neutrophils by interleukins-1 and -2 and tumor necrosis factors. **Immunol Ser**, v.57, p.417-36. 1992.

FINK, S. L. e COOKSON, B. T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Infect Immun**, v.73, n.4, Apr, p.1907-16. 2005.

FLOREY, H. W. London: Saunders. 1962. 98-127 p. (General Pathology)

FOSSATI, G., *et al.* In vitro effects of GM-CSF on mature peripheral blood neutrophils. **Int J Mol Med**, v.1, n.6, Jun, p.943-51. 1998.

FOXMAN, E. F., KUNKEL, E. J. e BUTCHER, E. C. Integrating conflicting chemotactic signals. The role of memory in leukocyte navigation. **J Cell Biol**, v.147, n.3, Nov 1, p.577-88. 1999.

FRANCOIS, S., *et al.* Inhibition of neutrophil apoptosis by TLR agonists in whole blood: involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt and NF-kappaB signaling pathways, leading to increased levels of Mcl-1, A1, and phosphorylated Bad. **J Immunol**, v.174, n.6, Mar 15, p.3633-42. 2005.

FUCHS, T. A., *et al.* Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. **J Cell Biol**, v.176, n.2, Jan 15, p.231-41. 2007.

FULDA, S. e DEBATIN, K. M. Resveratrol modulation of signal transduction in apoptosis and cell survival: a mini-review. **Cancer Detect Prev**, v.30, n.3, p.217-23. 2006.

FULOP, T., *et al.* Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging. **Aging Cell**, v.3, n.4, Aug, p.217-26. 2004.

GAO, L. e ABU KWAIK, Y. Hijacking of apoptotic pathways by bacterial pathogens. **Microbes Infect**, v.2, n.14, Nov, p.1705-19. 2000.

GAO, L. Y. e KWAIK, Y. A. The modulation of host cell apoptosis by intracellular bacterial pathogens. **Trends Microbiol**, v.8, n.7, Jul, p.306-13. 2000.

GASPAR ELSAS, M. I., VARGAFTIG B.B., XAVIER ELSAS P. Do glucocorticoids enhance eosinopoiesis? **Trends in Pharmacological Sciences**, v.21, n.11, November, p.417-20. 2000.

GAUDREAU, E., STANKOVA, J. e ROLA-PLESZCZYNSKI, M. Involvement of leukotriene B4 receptor 1 signaling in platelet-activating factor-mediated neutrophil degranulation and chemotaxis. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v.75, n.1-4, Jan, p.25-34. 2005.

GAY, J. C., ENGLISH, D. e LUKENS, J. N. Stimulation of neutrophil oxidative metabolism by indomethacin. **Agents Actions**, v.16, n.5, Jul, p.336-41. 1985.

GERL, R. e VAUX, D. L. Apoptosis in the development and treatment of cancer. **Carcinogenesis**, v.26, n.2, Feb, p.263-70. 2005.

GHIO, M., *et al.* Transforming growth factor-beta1 in supernatants from stored red blood cells inhibits neutrophil locomotion. **Blood**, v.102, n.3, Aug 1, p.1100-7. 2003.

GIBBS, B. F. Human basophils as effectors and immunomodulators of allergic inflammation and innate immunity. **Clin Exp Med**, v.5, n.2, Jul, p.43-9. 2005.

GILES, K. M., *et al.* An appetite for apoptotic cells? Controversies and challenges. **Br J Haematol**, v.109, n.1, Apr, p.1-12. 2000.

GILROY, D. W., *et al.* Inducible cyclooxygenase-derived 15-deoxy(Delta)12-14PGJ2 brings about acute inflammatory resolution in rat pleurisy by inducing neutrophil and macrophage apoptosis. **Faseb J**, v.17, n.15, Dec, p.2269-71. 2003.

GORDON, L. I., *et al.* Modulation of neutrophil function by lysozyme. Potential negative feedback system of inflammation. **J Clin Invest**, v.64, n.1, Jul, p.226-32. 1979.

GOTO, Y., *et al.* Benzodiazepines inhibit the rate of neutrophil apoptosis. **Ir J Med Sci**, v.172, n.4, Oct-Dec, p.191-4. 2003.

GOTTLIEB, R. A. e KITSIS, R. N. Seeing death in the living. **Nat Med**, v.7, n.12, Dec, p.1277-8. 2001.

GOUGEON, M. L. Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack. **Nat Rev Immunol**, v.3, n.5, May, p.392-404. 2003.

GRANDE, A., *et al.* All-trans-retinoic acid induces simultaneously granulocytic differentiation and expression of inflammatory cytokines in HL-60 cells. **Exp Hematol**, v.23, n.2, Feb, p.117-25. 1995.

GUPTA, S. Molecular mechanisms of apoptosis in the cells of the immune system in human aging. **Immunol Rev**, v.205, Jun, p.114-29. 2005.

HACHIYA, O., *et al.* Inhibition by bacterial lipopolysaccharide of spontaneous and TNF-alpha-induced human neutrophil apoptosis in vitro. **Microbiol Immunol**, v.39, n.9, p.715-23. 1995.

HACKER, G. The morphology of apoptosis. **Cell Tissue Res**, v.301, n.1, Jul, p.5-17. 2000.

HAIL, N., JR., KIM, H. J. e LOTAN, R. Mechanisms of fenretinide-induced apoptosis. **Apoptosis**, v.11, n.10, Oct, p.1677-94. 2006.

HANNAH, S., *et al.* Hypoxia prolongs neutrophil survival in vitro. **FEBS Lett**, v.372, n.2-3, Sep 25, p.233-7. 1995.

_____. Constitutive neutrophil apoptosis in culture is modulated by cell density independently of beta2 integrin-mediated adhesion. **FEBS Lett**, v.421, n.2, Jan 9, p.141-6. 1998.

HASLETT, C., *et al.* Apoptosis (programmed cell death) and functional changes in aging neutrophils. Modulation by inflammatory mediators. **Chest**, v.99, n.3 Suppl, Mar, p.6S. 1991.

HELDIN, C. H. Simultaneous induction of stimulatory and inhibitory signals by PDGF. **FEBS Lett**, v.410, n.1, Jun 23, p.17-21. 1997.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v.407, n.6805, Oct 12, p.770-6. 2000.

HINDS, M. G. e DAY, C. L. Regulation of apoptosis: uncovering the binding determinants. **Curr Opin Struct Biol**, v.15, n.6, Dec, p.690-9. 2005.

HOFFMANN, A. e BALTIMORE, D. Circuitry of nuclear factor kappaB signaling. **Immunol Rev**, v.210, Apr, p.171-86. 2006.

HOGAN, S. P. e ROTHENBERG, M. E. Eosinophil Function in Eosinophil-associated Gastrointestinal Disorders. **Curr Allergy Asthma Rep**, v.6, n.1, Feb, p.65-71. 2006.

HORAN, T. D., NOUJAIM, A. A. e MCPHERSON, T. A. Effect of indomethacin on human neutrophil chemiluminescence and microbicidal activity. **Immunopharmacology**, v.6, n.2, Aug, p.97-106. 1983.

HOTCHKISS, R. S. e NICHOLSON, D. W. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. **Nat Rev Immunol**, v.6, n.11, Nov, p.813-22. 2006.

HOWELLS, G. L., *et al.* Proteinase-activated receptor-2: expression by human neutrophils. **J Cell Sci**, v.110 (Pt 7), Apr, p.881-7. 1997.

HSU, H. C., SCOTT, D. K. e MOUNTZ, J. D. Impaired apoptosis and immune senescence - cause or effect? **Immunol Rev**, v.205, Jun, p.130-46. 2005.

HUANG, J. B., KINDZELSKII, A. L. e PETTY, H. R. Hexokinase translocation during neutrophil activation, chemotaxis, and phagocytosis: disruption by cytochalasin D, dexamethasone, and indomethacin. **Cell Immunol**, v.218, n.1-2, Jul-Aug, p.95-106. 2002.

IVERSON, S., ZAHID, N. e UETRECHT, J. P. Predicting drug-induced agranulocytosis: characterizing neutrophil-generated metabolites of a model compound, DMP 406, and assessing the relevance of an in vitro apoptosis assay for identifying drugs that may cause agranulocytosis. **Chem Biol Interact**, v.142, n.1-2, Nov 10, p.175-99. 2002.

IWAI, K., *et al.* Differential expression of bcl-2 and susceptibility to anti-Fas-mediated cell death in peripheral blood lymphocytes, monocytes, and neutrophils. **Blood**, v.84, n.4, Aug 15, p.1201-8. 1994.

JAATTELA, M. e TSCHOPP, J. Caspase-independent cell death in T lymphocytes. **Nat Immunol**, v.4, n.5, May, p.416-23. 2003.

JAGELS, M. A., *et al.* C5a- and tumor necrosis factor-alpha-induced leukocytosis occurs independently of beta 2 integrins and L-selectin: differential effects on neutrophil adhesion molecule expression in vivo. **Blood**, v.85, n.10, May 15, p.2900-9. 1995.

JING, Y., *et al.* Topoisomerase inhibitors potentiate the effect of retinoic acid on cell growth inhibition and induction of differentiation of leukemia HL-60 cells. **Leuk Res**, v.18, n.4, Apr, p.299-304. 1994.

JONES, C. P., *et al.* Prostaglandin E2 and dexamethasone regulate eosinophil differentiation and survival through a nitric oxide- and CD95-dependent pathway. **Nitric Oxide**, v.11, n.2, Sep, p.184-93. 2004.

KANAMORI, M., *et al.* NF-kappaB activator Act1 associates with IL-1/Toll pathway adaptor molecule TRAF6. **FEBS Lett**, v.532, n.1-2, Dec 4, p.241-6. 2002.

KANAMORI, Y., *et al.* Migration of neutrophils from blood to tissue: alteration of modulatory effects of prostanoid on superoxide generation in rabbits and humans. **Life Sci**, v.60, n.16, p.1407-17. 1997.

KATO, M., *et al.* Dual signaling and effector pathways mediate human eosinophil activation by platelet-activating factor. **Int Arch Allergy Immunol**, v.134 Suppl 1, Jun, p.37-43. 2004.

KATO, T., *et al.* Cyclic AMP delays neutrophil apoptosis via stabilization of Mcl-1. **FEBS Lett**, v.580, n.19, Aug 21, p.4582-6. 2006.

KERR, J. F., WYLLIE, A. H. e CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, v.26, n.4, Aug, p.239-57. 1972.

KILPATRICK, L. E., *et al.* Regulation of TNF mediated antiapoptotic signaling in human neutrophils: role of δ -PKC and ERK1/2. **J Leukoc Biol**, v.80, n.6, Dec, p.1512-21. 2006.

KISHIMOTO, T. K., *et al.* Heterogeneous mutations in the beta subunit common to the LFA-1, Mac-1, and p150,95 glycoproteins cause leukocyte adhesion deficiency. **Cell**, v.50, n.2, Jul 17, p.193-202. 1987.

KISHIMOTO, T. K. e ROTHLEIN, R. Integrins, ICAMs, and selectins: role and regulation of adhesion molecules in neutrophil recruitment to inflammatory sites. **Adv Pharmacol**, v.25, p.117-69. 1994.

KISS, E., *et al.* Effect of TSH and anti-TSH receptor antibodies on the plasma membrane potential of polymorphonuclear granulocytes. **Immunol Lett**, v.55, n.3, Mar, p.173-7. 1997.

KOBAYASHI, S. D. e DELEO, F. R. Apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes: searching for a genetic roadmap. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v.51, n.1, p.1-8. 2003.

KOBAYASHI, S. D., *et al.* An apoptosis-differentiation program in human polymorphonuclear leukocytes facilitates resolution of inflammation. **J Leukoc Biol**, v.73, n.2, Feb, p.315-22. 2003.

KRAMMER, P. H. CD95's deadly mission in the immune system. **Nature**, v.407, n.6805, Oct 12, p.789-95. 2000.

KRZYZOWSKA, M., SCHOLLENBERGER, A. e NIEMIALTOWSKI, M. G. How human immunodeficiency viruses and herpesviruses affect apoptosis. **Acta Virol**, v.44, n.3, Jun-Aug, p.203-10. 2000.

LAICHALK, L. L., DANFORTH, J. M. e STANDIFORD, T. J. Interleukin-10 inhibits neutrophil phagocytic and bactericidal activity. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v.15, n.4, Oct, p.181-7. 1996.

LAKHANI, S. A., *et al.* Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. **Science**, v.311, n.5762, Feb 10, p.847-51. 2006.

LAVRIK, I. N., GOLKS, A. e KRAMMER, P. H. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. **J Clin Invest**, v.115, n.10, Oct, p.2665-72. 2005.

LAWSON, N. D. e BERLINER, N. Neutrophil maturation and the role of retinoic acid. **Exp Hematol**, v.27, n.9, Sep, p.1355-67. 1999.

LE BRAS, M., ROUY, I. e BRENNER, C. The modulation of inter-organelle cross-talk to control apoptosis. **Med Chem**, v.2, n.1, Jan, p.1-12. 2006.

LE, X. F., *et al.* Regulation of AML2/CBFA3 in hematopoietic cells through the retinoic acid receptor alpha-dependent signaling pathway. **J Biol Chem**, v.274, n.31, Jul 30, p.21651-8. 1999.

LEE, A., WHYTE, M. K. e HASLETT, C. Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. **J Leukoc Biol**, v.54, n.4, Oct, p.283-8. 1993.

LEE, J. J. e LEE, N. A. Eosinophil degranulation: an evolutionary vestige or a universally destructive effector function? **Clin Exp Allergy**, v.35, n.8, Aug, p.986-94. 2005.

LEE, W. Y., *et al.* In vitro neutrophil transepithelial migration. **Methods Mol Biol**, v.341, p.205-15. 2006.

LEHRER, R. I. Multispecific myeloid defensins. **Curr Opin Hematol**, v.14, n.1, Jan, p.16-21. 2007.

LETAI, A. Pharmacological manipulation of Bcl-2 family members to control cell death. **J Clin Invest**, v.115, n.10, Oct, p.2648-55. 2005.

LEUZZI, R., *et al.* Inhibition of microsomal glucose-6-phosphate transport in human neutrophils results in apoptosis: a potential explanation for neutrophil dysfunction in glycogen storage disease type 1b. **Blood**, v.101, n.6, Mar 15, p.2381-7. 2003.

LEVY, O. Antibiotic proteins of polymorphonuclear leukocytes. **Eur J Haematol**, v.56, n.5, May, p.263-77. 1996.

LILES, W. C., DALE, D. C. e KLEBANOFF, S. J. Glucocorticoids inhibit apoptosis of human neutrophils. **Blood**, v.86, n.8, Oct 15, p.3181-8. 1995.

LINDBOM, L. e WERR, J. Integrin-dependent neutrophil migration in extravascular tissue. **Semin Immunol**, v.14, n.2, Apr, p.115-21. 2002.

LINDEMANS, C. A. e COFFER, P. J. Regulation of granulocyte apoptosis by phosphatidylinositol 3-kinase. **Biochem Soc Trans**, v.32, n.Pt3, Jun, p.480-4. 2004.

LIU, J., *et al.* Inhibition of neutrophil apoptosis by verotoxin 2 derived from *Escherichia coli* O157:H7. **Infect Immun**, v.67, n.11, Nov, p.6203-5. 1999.

LORANT, D. E., *et al.* Coexpression of GMP-140 and PAF by endothelium stimulated by histamine or thrombin: a juxtacrine system for adhesion and activation of neutrophils. **J Cell Biol**, v.115, n.1, Oct, p.223-34. 1991.

MAHMUDI-AZER, S., *et al.* Immunofluorescence analysis of cytokine and granule protein expression during eosinophil maturation from cord blood-derived CD34 progenitors. **J Allergy Clin Immunol**, v.105, n.6 Pt 1, Jun, p.1178-84. 2000.

MAHONEY, J. A. e ROSEN, A. Apoptosis and autoimmunity. **Curr Opin Immunol**, v.17, n.6, Dec, p.583-8. 2005.

MAIANSKI, N. A., *et al.* Functional characterization of mitochondria in neutrophils: a role restricted to apoptosis. **Cell Death Differ**, v.11, n.2, Feb, p.143-53. 2004a.

_____. Apoptosis of neutrophils. **Acta Haematol**, v.111, n.1-2, p.56-66. 2004b.

_____. Granulocyte colony-stimulating factor inhibits the mitochondria-dependent activation of caspase-3 in neutrophils. **Blood**, v.99, n.2, Jan 15, p.672-9. 2002.

MAIANSKI, N. A., ROOS, D. e KUIJPERS, T. W. Tumor necrosis factor alpha induces a caspase-independent death pathway in human neutrophils. **Blood**, v.101, n.5, Mar 1, p.1987-95. 2003.

MAJNO, G. London: Oxford University Press. 2004. 186-245 p.

MALECH, H. L. e HICKSTEIN, D. D. Genetics, biology and clinical management of myeloid cell primary immune deficiencies: chronic granulomatous disease and leukocyte adhesion deficiency. **Curr Opin Hematol**, v.14, n.1, Jan, p.29-36. 2007.

MALININ, N. L., *et al.* MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. **Nature**, v.385, n.6616, Feb 6, p.540-4. 1997.

MARTIN, M. C., *et al.* Cyclic AMP regulation of neutrophil apoptosis occurs via a novel protein kinase A-independent signaling pathway. **J Biol Chem**, v.276, n.48, Nov 30, p.45041-50. 2001.

MARTIN, S. J., BRADLEY, J. G. e COTTER, T. G. HL-60 cells induced to differentiate towards neutrophils subsequently die via apoptosis. **Clin Exp Immunol**, v.79, n.3, Mar, p.448-53. 1990.

MARTIN, S. J., *et al.* Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. **J Exp Med**, v.182, n.5, Nov 1, p.1545-56. 1995.

MARUYAMA, S., *et al.* Administration of glucocorticoids markedly increases the numbers of granulocytes and extrathymic T cells in the bone marrow. **Cell Immunol**, v.194, n.1, May 25, p.28-35. 1999.

MATES, J. M., *et al.* Pathways from glutamine to apoptosis. **Front Biosci**, v.11, p.3164-80. 2006.

MAXIMIANO, E. S., *et al.* Cells isolated from bone-marrow and lungs of allergic BALB/C mice and cultured in the presence of IL-5 are respectively resistant and susceptible to apoptosis induced by dexamethasone. **Int Immunopharmacol**, v.5, n.5, May, p.857-70. 2005.

MAYADAS, T. N. e CULLERE, X. Neutrophil beta2 integrins: moderators of life or death decisions. **Trends Immunol**, v.26, n.7, Jul, p.388-95. 2005.

MCCARTHY, D. A., *et al.* The neutropenia induced by the thalidomide analogue CC-4047 in patients with multiple myeloma is associated with an increased percentage of neutrophils bearing CD64. **Int Immunopharmacol**, v.6, n.7, Jul, p.1194-203. 2006.

MCCONKEY, D. J., ZHIVOTOVSKY, B. e ORRENIUS, S. Apoptosis--molecular mechanisms and biomedical implications. **Mol Aspects Med**, v.17, n.1, Feb, p.1-110. 1996.

MEAGHER, L. C., *et al.* Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes. **J Immunol**, v.156, n.11, Jun 1, p.4422-8. 1996.

MECKLENBURGH, K. I., *et al.* Involvement of a ferroprotein sensor in hypoxia-mediated inhibition of neutrophil apoptosis. **Blood**, v.100, n.8, Oct 15, p.3008-16. 2002.

MEDAN, D., *et al.* Induction of neutrophil apoptosis and secondary necrosis during endotoxin-induced pulmonary inflammation in mice. **J Cell Physiol**, v.191, n.3, Jun, p.320-6. 2002.

MEDZHITOV, R. e JANEWAY, C. A., JR. An ancient system of host defense. **Curr Opin Immunol**, v.10, n.1, Feb, p.12-5. 1998.

MEHTA, K. Retinoic acid--a player that rules the game of life and death in neutrophils. **Indian J Exp Biol**, v.40, n.8, Aug, p.874-81. 2002.

MEHTA, K., *et al.* Activation of retinoid receptors RAR alpha and RXR alpha induces differentiation and apoptosis, respectively, in HL-60 cells. **Cell Growth Differ**, v.7, n.2, Feb, p.179-86. 1996.

MIGLIACCIO, E., GIORGIO, M. e PELICCI, P. G. Apoptosis and aging: role of p66Shc redox protein. **Antioxid Redox Signal**, v.8, n.3-4, Mar-Apr, p.600-8. 2006.

MILLER, A. H., *et al.* Glucocorticoid receptors are differentially expressed in the cells and tissues of the immune system. **Cell Immunol**, v.186, n.1, May 25, p.45-54. 1998.

MILLS, K. I., *et al.* Identification of transcription factors expressed during ATRA-induced neutrophil differentiation of HL60 cells. **Br J Haematol**, v.103, n.1, Oct, p.87-92. 1998.

MODJTAHEDI, N., *et al.* Apoptosis-inducing factor: vital and lethal. **Trends Cell Biol**, v.16, n.5, May, p.264-72. 2006.

MOLEY, K. H. e MUECKLER, M. M. Glucose transport and apoptosis. **Apoptosis**, v.5, n.2, Apr, p.99-105. 2000.

MOLLINEDO, F., BORREGAARD, N. e BOXER, L. A. Novel trends in neutrophil structure, function and development. **Immunol Today**, v.20, n.12, Dec, p.535-7. 1999.

MOLLOY, E. J., *et al.* Sex-specific alterations in neutrophil apoptosis: the role of estradiol and progesterone. **Blood**, v.102, n.7, Oct 1, p.2653-9. 2003.

MOSS, J. E., ALIPRANTIS, A. O. e ZYCHLINSKY, A. The regulation of apoptosis by microbial pathogens. **Int Rev Cytol**, v.187, p.203-59. 1999.

MOULIAN, N. e BERRIH-AKNIN, S. Fas/APO-1/CD95 in health and autoimmune disease: thymic and peripheral aspects. **Semin Immunol**, v.10, n.6, Dec, p.449-56. 1998.

MURRAY, J., *et al.* Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha: requirement for TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis in vitro. **Blood**, v.90, n.7, Oct 1, p.2772-83. 1997.

NAGASE, H., *et al.* Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand. **J Immunol**, v.171, n.8, Oct 15, p.3977-82. 2003.

NEGROTTO, S., *et al.* Aspirin and salicylate suppress polymorphonuclear apoptosis delay mediated by proinflammatory stimuli. **J Pharmacol Exp Ther**, v.319, n.2, Nov, p.972-9. 2006.

NORTHOVER, A. M. A morphological study of the effects of indomethacin, flufenamate, salicylate and calcium ions on rabbit peritoneal neutrophil polymorphs. **Br J Exp Pathol**, v.62, n.4, Aug, p.375-82. 1981.

_____. A study of the effects of indomethacin, flufenamate and salicylate on the localization of intracellular calcium in rabbit neutrophil polymorphs using an antimonate staining method. **Br J Exp Pathol**, v.63, n.6, Dec, p.686-92. 1982.

NUSBAUM, P., *et al.* Distinct signaling pathways are involved in leukosialin (CD43) down-regulation, membrane blebbing, and phospholipid scrambling during neutrophil apoptosis. **J Biol Chem**, v.280, n.7, Feb 18, p.5843-53. 2005.

_____. Early membrane events in polymorphonuclear cell (PMN) apoptosis: membrane blebbing and vesicle release, CD43 and CD16 down-regulation and phosphatidylserine externalization. **Biochem Soc Trans**, v.32, n.Pt3, Jun, p.477-9. 2004.

O'CONNOR, L., *et al.* Apoptosis and cell division. **Curr Opin Cell Biol**, v.12, n.2, Apr, p.257-63. 2000.

OPFERMAN, J. T. e KORSMEYER, S. J. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. **Nat Immunol**, v.4, n.5, May, p.410-5. 2003.

OSSOVSKAYA, V. S. e BUNNETT, N. W. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. **Physiol Rev**, v.84, n.2, Apr, p.579-621. 2004.

OTTONELLO, L., *et al.* Prostaglandin E2 inhibits apoptosis in human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes: role of intracellular cyclic AMP levels. **Exp Hematol**, v.26, n.9, Aug, p.895-902. 1998.

PAEGELOW, I., *et al.* Migratory responses of polymorphonuclear leukocytes to kinin peptides. **Pharmacology**, v.66, n.3, Nov, p.153-61. 2002.

PALLISTER, I., *et al.* Alteration of polymorphonuclear neutrophil surface receptor expression and migratory activity after isolation: comparison of whole blood and isolated PMN preparations from normal and postfracture trauma patients. **J Trauma**, v.60, n.4, Apr, p.844-50. 2006.

PARKER, L. C., *et al.* The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. **J Leukoc Biol**, v.77, n.6, Jun, p.886-92. 2005.

PAUL, C. C., *et al.* Changing the differentiation program of hematopoietic cells: retinoic acid-induced shift of eosinophil-committed cells to neutrophils. **Blood**, v.86, n.10, Nov 15, p.3737-44. 1995.

PEACHMAN, K. K., LYLES, D. S. e BASS, D. A. Mitochondria in eosinophils: functional role in apoptosis but not respiration. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.98, n.4, Feb 13, p.1717-22. 2001.

PENG, S. L. Fas (CD95)-related apoptosis and rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford)**, v.45, n.1, Jan, p.26-30. 2006a.

_____. Neutrophil apoptosis in autoimmunity. **J Mol Med**, v.84, n.2, Feb, p.122-5. 2006b.

PERL, M., CHUNG, C. S. e AYALA, A. Apoptosis. **Crit Care Med**, v.33, n.12 Suppl, Dec, p.S526-9. 2005.

PITHON-CURI, T. C., *et al.* Glutamine delays spontaneous apoptosis in neutrophils. **Am J Physiol Cell Physiol**, v.284, n.6, Jun, p.C1355-61. 2003.

POLSTER, B. M., PEVSNER, J. e HARDWICK, J. M. Viral Bcl-2 homologs and their role in virus replication and associated diseases. **Biochim Biophys Acta**, v.1644, n.2-3, Mar 1, p.211-27. 2004.

PROSKURYAKOV, S. Y., *et al.* Immunology of apoptosis and necrosis. **Biochemistry (Mosc)**, v.70, n.12, Dec, p.1310-20. 2005.

PRYDE, J. G., *et al.* Temperature-dependent arrest of neutrophil apoptosis. Failure of Bax insertion into mitochondria at 15 degrees C prevents the release of cytochrome c. **J Biol Chem**, v.275, n.43, Oct 27, p.33574-84. 2000.

RAI, N. K., *et al.* Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. **Int J Low Extrem Wounds**, v.4, n.3, Sep, p.138-44. 2005.

RAJASEKARIAH, P., *et al.* Purification and characterization of a human bradykinin binding protein from inflammatory cells. **Int J Biochem Cell Biol**, v.30, n.3, Mar, p.353-67. 1998.

REIBMAN, J., *et al.* Transforming growth factor beta 1, a potent chemoattractant for human neutrophils, bypasses classic signal-transduction pathways. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.88, n.15, Aug 1, p.6805-9. 1991.

RESNICK, M. B. e WELLER, P. F. Mechanisms of eosinophil recruitment. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v.8, n.4, Apr, p.349-55. 1993.

RESTIFO, N. P. Building better vaccines: how apoptotic cell death can induce inflammation and activate innate and adaptive immunity. **Curr Opin Immunol**, v.12, n.5, Oct, p.597-603. 2000.

RICH, T., ALLEN, R. L. e WYLLIE, A. H. Defying death after DNA damage. **Nature**, v.407, n.6805, Oct 12, p.777-83. 2000.

RILEY, N. A., WARD C., SAWATZKY D.A., SHELDRAKE T.A., DRANSFIELD I., HASLETT C., ROSSI A.G. . Granulocyte Apoptosis and Macrophage Clearance of Apoptotic Cells as Targets for Pharmacological Intervention in Inflammatory Diseases **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, v.5, n.1, February, p.3-12. 2006.

RONNSTRAND, L. e HELDIN, C. H. Mechanisms of platelet-derived growth factor-induced chemotaxis. **Int J Cancer**, v.91, n.6, Mar 15, p.757-62. 2001.

ROOIJAKKERS, S. H., *et al.* Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. **Nat Immunol**, v.6, n.9, Sep, p.920-7. 2005.

ROOS, W. P. e KAINA, B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. **Trends Mol Med**, v.12, n.9, Sep, p.440-50. 2006.

ROSSI, A. G., *et al.* Agents that elevate cAMP inhibit human neutrophil apoptosis. **Biochem Biophys Res Commun**, v.217, n.3, Dec 26, p.892-9. 1995.

_____. Regulation of macrophage phagocytosis of apoptotic cells by cAMP. **J Immunol**, v.160, n.7, Apr 1, p.3562-8. 1998.

_____. Cyclin-dependent kinase inhibitors enhance the resolution of inflammation by promoting inflammatory cell apoptosis. **Nat Med**, v.12, n.9, Sep, p.1056-64. 2006.

ROTHENBERG, M. E. e HOGAN, S. P. The eosinophil. **Annu Rev Immunol**, v.24, p.147-74. 2006.

ROTHENBERG, M. E., *et al.* Gastrointestinal eosinophils. **Immunol Rev**, v.179, Feb, p.139-55. 2001.

ROWE, S. J., *et al.* Caspase-1-deficient mice have delayed neutrophil apoptosis and a prolonged inflammatory response to lipopolysaccharide-induced acute lung injury. **J Immunol**, v.169, n.11, Dec 1, p.6401-7. 2002.

SABROE, I., DOWER, S. K. e WHYTE, M. K. The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis. **Clin Infect Dis**, v.41 Suppl 7, Nov 15, p.S421-6. 2005.

SALAMONE, G., *et al.* Promotion of neutrophil apoptosis by TNF-alpha. **J Immunol**, v.166, n.5, Mar 1, p.3476-83. 2001.

_____. Analysis of the mechanisms involved in the stimulation of neutrophil apoptosis by tumour necrosis factor-alpha. **Immunology**, v.113, n.3, Nov, p.355-62. 2004.

SAMEJIMA, K. e EARNSHAW, W. C. Trashing the genome: the role of nucleases during apoptosis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.6, n.9, Sep, p.677-88. 2005.

SAMPSON, A. P. The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. **Clin Exp Allergy**, v.30 Suppl 1, Jun, p.22-7. 2000.

SAUTER, B., *et al.* Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. **J Exp Med**, v.191, n.3, Feb 7, p.423-34. 2000.

SAVILL, J., *et al.* A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. **Nat Rev Immunol**, v.2, n.12, Dec, p.965-75. 2002.

_____. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. **Immunol Today**, v.14, n.3, Mar, p.131-6. 1993.

SAVILL, J. S., HENSON, P. M. e HASLETT, C. Phagocytosis of aged human neutrophils by macrophages is mediated by a novel "charge-sensitive" recognition mechanism. **J Clin Invest**, v.84, n.5, Nov, p.1518-27. 1989.

SCAFFIDI, C., *et al.* Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. **Embo J**, v.17, n.6, Mar 16, p.1675-87. 1998.

_____. Apoptosis signaling in lymphocytes. **Curr Opin Immunol**, v.11, n.3, Jun, p.277-85. 1999.

SCHEEL-TOELLNER, D., *et al.* Clustering of death receptors in lipid rafts initiates neutrophil spontaneous apoptosis. **Biochem Soc Trans**, v.32, n.Pt 5, Nov, p.679-81. 2004.

SECCO, D. D., *et al.* Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. **Nitric Oxide**, v.9, n.3, Nov, p.153-64. 2003.

SEELY, A. J., *et al.* Reduction in neutrophil cell surface expression of tumor necrosis factor receptors but not Fas after transmigration: implications for the regulation of neutrophil apoptosis. **Arch Surg**, v.133, n.12, Dec, p.1305-10. 1998.

SEHMI, R., BAATJES, A. J. e DENBURG, J. A. Hemopoietic progenitor cells and hemopoietic factors: potential targets for treatment of allergic inflammatory diseases. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v.2, n.4, Dec, p.271-8. 2003.

SELVATICI, R., *et al.* Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils. **Eur J Pharmacol**, v.534, n.1-3, Mar 18, p.1-11. 2006.

SENDO, F., KATO, T. e YAZAWA, H. Modulation of neutrophil apoptosis by psychological stress and glucocorticoid. **Int J Immunopharmacol**, v.19, n.9-10, Sep-Oct, p.511-6. 1997.

SEPIASHVILI, R. I., SHUBICH M.G., KOLESNIKOVA N.V., SLAVYANSKAYA T.A., LOMTATIDZE L.V. Apoptosis in immunologic processes. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v.1, n.3-4, Jan-Mar, p.163-72. 2001.

SHERIFF, A., *et al.* Loss of GM1 surface expression precedes annexin V-phycoerythrin binding of neutrophils undergoing spontaneous apoptosis during in vitro aging. **Cytometry A**, v.62, n.2, Dec, p.75-80. 2004.

SHI, J., *et al.* Role of the liver in regulating numbers of circulating neutrophils. **Blood**, v.98, n.4, Aug 15, p.1226-30. 2001.

SHIMIZU, T., *et al.* Granulocyte macrophage colony-stimulating factor enhances retinoic acid-induced gene expression. **J Leukoc Biol**, v.80, n.4, Oct, p.889-96. 2006.

SIMON, H. U. Regulation of eosinophil and neutrophil apoptosis--similarities and differences. **Immunol Rev**, v.179, Feb, p.156-62. 2001.

_____. Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation. **Immunol Rev**, v.193, Jun, p.101-10. 2003.

SIMON, S. I. e GREEN, C. E. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. **Annu Rev Biomed Eng**, v.7, p.151-85. 2005.

SKULACHEV, V. P. Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms. **Mol Aspects Med**, v.20, n.3, Jun, p.139-84. 1999.

_____. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. **Apoptosis**, v.11, n.4, Apr, p.473-85. 2006.

SMITH, C. W. Possible steps involved in the transition to stationary adhesion of rolling neutrophils: a brief review. **Microcirculation**, v.7, n.6 Pt 1, Dec, p.385-94. 2000.

SPIK, G., *et al.* Characterization of two kinds of lactotransferrin (lactoferrin) receptors on different target cells. **Adv Exp Med Biol**, v.357, p.13-9. 1994.

STANDIFORD, T. J., KESHAMOUNI, V. G. e REDDY, R. C. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ as a regulator of lung inflammation and repair. **Proc Am Thorac Soc**, v.2, n.3, p.226-31. 2005.

STARK, M. A., *et al.* Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. **Immunity**, v.22, n.3, Mar, p.285-94. 2005.

STEVENS, V. L., *et al.* Modulation of retinoic acid-induced differentiation of human leukemia (HL-60) cells by serum factors and sphinganine. **Cancer Res**, v.50, n.2, Jan 15, p.222-6. 1990.

STRICKLAND, I., *et al.* High constitutive glucocorticoid receptor beta in human neutrophils enables them to reduce their spontaneous rate of cell death in response to corticosteroids. **J Exp Med**, v.193, n.5, Mar 5, p.585-93. 2001.

STUTZIN, A. e HOFFMANN, E. K. Swelling-activated ion channels: functional regulation in cell-swelling, proliferation and apoptosis. **Acta Physiol (Oxf)**, v.187, n.1-2, May-Jun, p.27-42. 2006.

SULOWSKA, Z., *et al.* Flow cytometric evaluation of human neutrophil apoptosis during nitric oxide generation in vitro: the role of exogenous antioxidants. **Mediators Inflamm**, v.2005, n.2, Jun 9, p.81-7. 2005.

_____. Influence of opioid peptides on human neutrophil apoptosis and activation in vitro. **Mediators Inflamm**, v.11, n.4, Aug, p.245-50. 2002.

SUZUKI, K., *et al.* Cleavage of mitogen-activated protein kinases in human neutrophils undergoing apoptosis: role in decreased responsiveness to inflammatory cytokines. **J Immunol**, v.166, n.2, Jan 15, p.1185-92. 2001.

SUZUKI, R., *et al.* Modulation of neutrophil apoptosis in plasma of patients after orthognathic surgery. **J Surg Res**, v.130, n.1, Jan, p.110-8. 2006.

SZEGEZDI, E., *et al.* Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. **EMBO Rep**, v.7, n.9, Sep, p.880-5. 2006.

TACHIMOTO, H., EBISAWA, M. e BOCHNER, B. S. Cross-talk between integrins and chemokines that influences eosinophil adhesion and migration. **Int Arch Allergy Immunol**, v.128 Suppl 1, p.18-20. 2002.

TAGER, A. M. e LUSTER, A. D. BLT1 and BLT2: the leukotriene B(4) receptors. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.69, n.2-3, Aug-Sep, p.123-34. 2003.

TAKAHASHI, K., *et al.* Human neutrophils express messenger RNA of vitamin D receptor and respond to 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v.24, n.3, Aug, p.335-47. 2002.

TANEJA, R., *et al.* Delayed neutrophil apoptosis in sepsis is associated with maintenance of mitochondrial transmembrane potential and reduced caspase-9 activity. **Crit Care Med**, v.32, n.7, Jul, p.1460-9. 2004.

TARLOWE, M. H., *et al.* Inflammatory chemoreceptor cross-talk suppresses leukotriene B4 receptor 1-mediated neutrophil calcium mobilization and chemotaxis after trauma. **J Immunol**, v.171, n.4, Aug 15, p.2066-73. 2003.

TAYLOR, E. L., *et al.* Dissociation of DNA fragmentation from other hallmarks of apoptosis in nitric oxide-treated neutrophils: differences between individual nitric oxide donor drugs. **Biochem Biophys Res Commun**, v.289, n.5, Dec 21, p.1229-36. 2001.

_____. Nitric oxide: a key regulator of myeloid inflammatory cell apoptosis. **Cell Death Differ**, v.10, n.4, Apr, p.418-30. 2003.

_____. GEA 3162 decomposes to co-generate nitric oxide and superoxide and induces apoptosis in human neutrophils via a peroxynitrite-dependent mechanism. **Br J Pharmacol**, v.143, n.1, Sep, p.179-85. 2004.

TERUI, Y., *et al.* Expression of differentiation-related phenotypes and apoptosis are independently regulated during myeloid cell differentiation. **J Biochem (Tokyo)**, v.117, n.1, Jan, p.77-84. 1995.

THEILGAARD-MONCH, K., PORSE, B. T. e BORREGAARD, N. Systems biology of neutrophil differentiation and immune response. **Curr Opin Immunol**, v.18, n.1, Feb, p.54-60. 2006.

TIBBETTS, M. D., ZHENG, L. e LENARDO, M. J. The death effector domain protein family: regulators of cellular homeostasis. **Nat Immunol**, v.4, n.5, May, p.404-9. 2003.

TOWER, J. Sex-specific regulation of aging and apoptosis. **Mech Ageing Dev**, v.127, n.9, Sep, p.705-18. 2006.

TRAMBAS, C. M. e GRIFFITHS, G. M. Delivering the kiss of death. **Nat Immunol**, v.4, n.5, May, p.399-403. 2003.

TRAPANI, J. A., *et al.* Proapoptotic functions of cytotoxic lymphocyte granule constituents in vitro and in vivo. **Curr Opin Immunol**, v.12, n.3, Jun, p.323-9. 2000.

TURINA, M., *et al.* Endotoxin inhibits apoptosis but induces primary necrosis in neutrophils. **Inflammation**, v.29, n.1, Feb, p.55-63. 2005.

_____. Effects of hyperglycemia, hyperinsulinemia, and hyperosmolarity on neutrophil apoptosis. **Surg Infect (Larchmt)**, v.7, n.2, Apr, p.111-21. 2006.

TYTHER, R., *et al.* Effect of sevoflurane on human neutrophil apoptosis. **Eur J Anaesthesiol**, v.20, n.2, Feb, p.111-5. 2003.

UEKI, S., *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates eosinophil functions: a new therapeutic target for allergic airway inflammation. **Int Arch Allergy Immunol**, v.134 Suppl 1, Jun, p.30-6. 2004.

UPHAM, J. W., *et al.* Retinoic acid modulates IL-5 receptor expression and selectively inhibits eosinophil-basophil differentiation of hemopoietic progenitor cells. **J Allergy Clin Immunol**, v.109, n.2, Feb, p.307-13. 2002.

VAN LEEUWEN, H. J., *et al.* The role of tumour necrosis factor in the kinetics of lipopolysaccharide-mediated neutrophil priming in whole blood. **Clin Exp Immunol**, v.140, n.1, Apr, p.65-72. 2005.

VANCUROVA, I., MISKOLCI, V. e DAVIDSON, D. NF-kappa B activation in tumor necrosis factor alpha-stimulated neutrophils is mediated by protein kinase Cdelta. Correlation to nuclear I kappa Balpha. **J Biol Chem**, v.276, n.23, Jun 8, p.19746-52. 2001.

VAUX, D. L., FLAVELL, R. A. Apoptosis genes and autoimmunity. **Current Opinion in Immunology**, v.13, n.6, December, p.719-24. 2001.

VAUX, D. L. e KORSMEYER, S. J. Cell death in development. **Cell**, v.96, n.2, Jan 22, p.245-54. 1999.

VISSERS, M. C. e HAMPTON, M. B. The role of oxidants and vitamin C on neutrophil apoptosis and clearance. **Biochem Soc Trans**, v.32, n.Pt3, Jun, p.499-501. 2004.

VLAHAKIS, S. R. e BADLEY, A. D. Influence of proteasome inhibitors on apoptosis. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v.9, n.1, Jan, p.42-7. 2006.

WALKER, A., *et al.* Regulation of neutrophil apoptosis and removal of apoptotic cells. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v.4, n.4, Aug, p.447-54. 2005.

WALKLEY, C. R., *et al.* Retinoic acid receptor antagonism in vivo expands the numbers of precursor cells during granulopoiesis. **Leukemia**, v.16, n.9, Sep, p.1763-72. 2002.

WALLACH, D. Suicide by order: some open questions about the cell-killing activities of the TNF ligand and receptor families. **Cytokine Growth Factor Rev**, v.7, n.3, Oct, p.211-21. 1996.

WALMSLEY, S. R., *et al.* Characterization of the survival effect of tumour necrosis factor-alpha in human neutrophils. **Biochem Soc Trans**, v.32, n.Pt3, Jun, p.456-60. 2004.

_____. Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1alpha-dependent NF-kappaB activity. **J Exp Med**, v.201, n.1, Jan 3, p.105-15. 2005.

WALRAND, S., *et al.* In vivo evidences that insulin regulates human polymorphonuclear neutrophil functions. **J Leukoc Biol**, v.76, n.6, Dec, p.1104-10. 2004.

WALSH, G. M., SEXTON, D. W. e BLAYLOCK, M. G. Corticosteroids, eosinophils and bronchial epithelial cells: new insights into the resolution of inflammation in asthma. **J Endocrinol**, v.178, n.1, Jul, p.37-43. 2003.

WANG, K., *et al.* Inhibition of neutrophil apoptosis by type 1 IFN depends on cross-talk between phosphoinositol 3-kinase, protein kinase C-delta, and NF-kappa B signaling pathways. **J Immunol**, v.171, n.2, Jul 15, p.1035-41. 2003.

WANG, T. T., *et al.* Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. **J Immunol**, v.173, n.5, Sep 1, p.2909-12. 2004.

WARD, C., *et al.* NF-kappaB activation is a critical regulator of human granulocyte apoptosis in vitro. **J Biol Chem**, v.274, n.7, Feb 12, p.4309-18. 1999a.

_____. Pharmacological manipulation of granulocyte apoptosis: potential therapeutic targets. **Trends Pharmacol Sci**, v.20, n.12, Dec, p.503-9. 1999b.

WATANABE-FUKUNAGA, R., *et al.* Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. **Nature**, v.356, n.6367, Mar 26, p.314-7. 1992.

WATSON, R. W., *et al.* Regulation of Fas antibody induced neutrophil apoptosis is both caspase and mitochondrial dependent. **FEBS Lett**, v.453, n.1-2, Jun 18, p.67-71. 1999.

WEBB, P. R., *et al.* Regulation of neutrophil apoptosis: a role for protein kinase C and phosphatidylinositol-3-kinase. **Apoptosis**, v.5, n.5, Nov, p.451-8. 2000.

WEBSTER, J. C. e CIDLOWSKI, J. A. Mechanisms of Glucocorticoid-receptor-mediated Repression of Gene Expression. **Trends Endocrinol Metab**, v.10, n.10, Dec, p.396-402. 1999.

WEIL, M., *et al.* Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. **J Cell Biol**, v.133, n.5, Jun, p.1053-9. 1996.

WEINRAUCH, Y. e ZYCHLINSKY, A. The induction of apoptosis by bacterial pathogens. **Annu Rev Microbiol**, v.53, p.155-87. 1999.

WHEELDON, A. e VARDEY, C. J. Characterization of the inhibitory prostanoid receptors on human neutrophils. **Br J Pharmacol**, v.108, n.4, Apr, p.1051-4. 1993.

WHITE, E. Mechanisms of apoptosis regulation by viral oncogenes in infection and tumorigenesis. **Cell Death Differ**, v.13, n.8, Aug, p.1371-7. 2006.

WICKREMASINGHE, R. G. e HOFFBRAND, A. V. Biochemical and genetic control of apoptosis: relevance to normal hematopoiesis and hematological malignancies. **Blood**, v.93, n.11, Jun 1, p.3587-600. 1999.

WITKO-SARSAT, V., *et al.* Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. **Lab Invest**, v.80, n.5, May, p.617-53. 2000.

WOWK, M. E. e TRAPANI, J. A. Cytotoxic activity of the lymphocyte toxin granzyme B. **Microbes Infect**, v.6, n.8, Jul, p.752-8. 2004.

WYLLIE, A. H., KERR, J. F. e CURRIE, A. R. Cell death: the significance of apoptosis. **Int Rev Cytol**, v.68, p.251-306. 1980.

XU, C., BAILLY-MAITRE, B. e REED, J. C. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. **J Clin Invest**, v.115, n.10, Oct, p.2656-64. 2005.

YANG, K. Y., *et al.* Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase gamma in neutrophil apoptosis. **Cell Signal**, v.15, n.2, Feb, p.225-33. 2003.

YANG, Y. e YU, X. Regulation of apoptosis: the ubiquitous way. **Faseb J**, v.17, n.8, May, p.790-9. 2003.

ZEN, K. e PARKOS, C. A. Leukocyte-epithelial interactions. **Curr Opin Cell Biol**, v.15, n.5, Oct, p.557-64. 2003.

ZHANG, B., *et al.* Elucidation of molecular events leading to neutrophil apoptosis following phagocytosis: cross-talk between caspase 8, reactive oxygen species, and MAPK/ERK activation. **J Biol Chem**, v.278, n.31, Aug 1, p.28443-54. 2003.

ZHANG, X., *et al.* Divergent effect of mometasone on human eosinophil and neutrophil apoptosis. **Life Sci**, v.71, n.13, Aug 16, p.1523-34. 2002.

ZHELEV, D. V. e ALTERAIFI, A. Signaling in the motility responses of the human neutrophil. **Ann Biomed Eng**, v.30, n.3, Mar, p.356-70. 2002.

ZIMMERMANN, K. C., BONZON, C. e GREEN, D. R. The machinery of programmed cell death. **Pharmacol Ther**, v.92, n.1, Oct, p.57-70. 2001.

ZIMMERMANN, K. C. e GREEN, D. R. How cells die: apoptosis pathways. **J Allergy Clin Immunol**, v.108, n.4 Suppl, Oct, p.S99-103. 2001.

ZWIRNER, J., *et al.* Evaluation of C3a receptor expression on human leucocytes by the use of novel monoclonal antibodies. **Immunology**, v.97, n.1, May, p.166-72. 1999.

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO

1ª Via

Dados de identificação

Título do Projeto: Estudo Comparativo da Regulação da Apoptose Mediada por Agentes Pró- e Anti-Inflamatórios em Granulócitos Humanos

Pesquisador Responsável: Pedro Paulo Xavier Elsas

Instituição a que pertence o Pesquisador Responsável: Universidade Federal do Rio de Janeiro

Telefones para contato: (21) 2270-0990- (21) 2554-1731

Nome do voluntário: _____

Idade: _____ anos R.G. _____

O Sr. (ª) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa “Estudo Comparativo da Regulação da Apoptose Mediada por Agentes Pró-e anti-Inflamatórios em Granulócitos Humanos”, de responsabilidade do pesquisador Pedro Paulo Xavier Elsas.

Entender a regulação da morte por apoptose de eosinófilos e neutrófilos, vai permitir entender melhor os processos de inflamação aguda e crônica, e ajudar a desenvolver novos tratamentos que atuem somente nas células específicas, diminuindo, com isso, efeitos adversos dos tratamentos atuais.

40 mL de sangue serão coletados com uma seringa, exatamente como em um exame de sangue convencional. As células de interesse (neutrófilos e

eosinófilos) serão separadas desse sangue, e utilizadas para observar o efeito de várias substâncias químicas, algumas atualmente utilizadas com anti-inflamatórios.

Não é esperado que o doador passe por nenhum desconforto a não ser o associado à picada da agulha, já que o volume de sangue coletado é pequeno.

Com um maior entendimento dos mecanismos de vida e morte dessas células, seria possível desenvolver estratégias que removessem essas células do organismo, impedindo o seu acúmulo e várias doenças associadas ao seu acúmulo no organismo.

A participação neste estudo é completamente voluntária, podendo o doador requisitar sua retirada do estudo a qualquer momento sem nenhum custo ou prejuízo de qualquer espécie para o mesmo.

No caso de qualquer outra dúvida que o doador possa ter, o mesmo poderá conseguir maiores informações através do telefone do Laboratório de Fisiopatologia Humana (21) 2554-1731, ou através de e-mail: imunodiag@iff.fiocruz.br

Todas as informações referentes aos doadores obtidas na realização deste projeto são confidenciais, e não serão utilizadas de nenhuma forma que permita a identificação dos mesmos.

Eu, _____, RG nº _____

declaro ter sido informado e concordo em participar, como voluntário, do projeto de pesquisa acima descrito.

Rio de Janeiro, _____ de _____ de _____

Nome e assinatura do paciente

Nome e assinatura do responsável por obter o consentimento

TERMO DE CONSENTIMENTO

2ª Via

Dados de identificação

Título do Projeto: Estudo Comparativo da Regulação da Apoptose Mediada por Agentes Pró- e Anti-Inflamatórios em Granulócitos Humanos

Pesquisador Responsável: Pedro Paulo Xavier Elsas

Instituição a que pertence o Pesquisador Responsável: Universidade Federal do Rio de Janeiro

Telefones para contato: (21) 2270-0990- (21) 2554-1731

Nome do voluntário: _____

Idade: _____ anos R.G. _____

O Sr. (ª) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa “Estudo Comparativo da Regulação da Apoptose Mediada por Agentes Pró-e anti-Inflamatórios em Granulócitos Humanos”, de responsabilidade do pesquisador Pedro Paulo Xavier Elsas.

Entender a regulação da morte por apoptose de eosinófilos e neutrófilos, vai permitir entender melhor os processos de inflamação aguda e crônica, e ajudar a desenvolver novos tratamentos que atuem somente nas células específicas, diminuindo, com isso, efeitos adversos dos tratamentos atuais.

40 mL de sangue serão coletados com uma seringa, exatamente como em um exame de sangue convencional. As células de interesse (neutrófilos e eosinófilos) serão separadas desse sangue, e utilizadas para observar o efeito de várias substâncias químicas, algumas atualmente utilizadas com anti-inflamatórios.

Não é esperado que o doador passe por nenhum desconforto a não ser o associado à picada da agulha, já que o volume de sangue coletado é pequeno.

Com um maior entendimento dos mecanismos de vida e morte dessas células, seria possível desenvolver estratégias que removessem essas células do organismo, impedindo o seu acúmulo e várias doenças associadas ao seu acúmulo no organismo.

A participação neste estudo é completamente voluntária, podendo o doador requisitar sua retirada do estudo a qualquer momento sem nenhum custo ou prejuízo de qualquer espécie para o mesmo.

No caso de qualquer outra dúvida que o doador possa ter, o mesmo poderá conseguir maiores informações através do telefone do Laboratório de Fisiopatologia Humana (21) 2554-1731, ou através de e-mail: imunodiag@iff.fiocruz.br

Todas as informações referentes aos doadores obtidas na realização deste projeto são confidenciais, e não serão utilizadas de nenhuma forma que permita a identificação dos mesmos.

Eu, _____, RG nº _____
declaro ter sido informado e concordo em participar, como voluntário, do projeto de pesquisa acima descrito.

Rio de Janeiro, _____ de _____ de _____

Nome e assinatura do paciente

Nome e assinatura do responsável por obter o consentimento