



**FERNANDO ANTONIO CAMPELO SPENCER NETTO**

**EFEITO DA DESPOLARIZAÇÃO DA MEMBRANA  
PLASMÁTICA NA MODULAÇÃO DA APOPTOSE  
DE NEUTRÓFILOS MEDIADA POR  
LIPOPOLISSACARÍDEO**

**RECIFE  
2003**

**FERNANDO ANTONIO CAMPELO  
SPENCER NETTO**

**EFEITO DA DESPOLARIZAÇÃO DA  
MEMBRANA PLASMÁTICA NA MODULAÇÃO  
DA APOPTOSE DE NEUTRÓFILOS MEDIADA  
POR LIPOPOLISSACARÍDEO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Cirurgia.

**ORIENTADOR NO BRASIL:  
PROF. DR. EDMUNDO MACHADO FERRAZ**

**ORIENTADOR NO EXTERIOR:  
PROF. JOHN C. MARSHALL**

**Recife  
2003**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**REITOR**

Prof. Geraldo José Marques Pereira

**VICE-REITOR**

Prof. Yony de Sá Barreto Sampaio

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Paulo Roberto Freire Cunha

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DIRETOR**

Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS**  
**DIRETOR SUPERINTENDENTE**

Prof. Éfrem de Aguiar Maranhão

**DEPARTAMENTO DE CIRURGIA**

Prof. Sílvio Romero Marques

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA**  
**NÍVEL MESTRADO E DOUTORADO**  
**COORDENADOR**

Prof. Carlos Teixeira Brandt

**CORPO DOCENTE**

Prof. Álvaro Antonio Bandeira Ferraz  
Prof. Antonio Roberto de Barros Coelho  
Prof. Carlos Augusto Mathias  
Prof. Carlos Roberto Ribeiro de Moraes  
Prof. Cláudio Moura Lacerda de Melo  
Prof. Edmundo Machado Ferraz  
Prof. Frederico Teixeira Brandt  
Prof. Jairo de Andrade Lima  
Prof. Joaquim Alfredo Alves Norões  
Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar  
Prof. Marcello Jorge de Castro Silveira  
Prof. Nelson Costa Rego Caldas  
Prof. Oyama Arruda Frei Caneca  
Prof. Renato Dornelas Câmara Neto  
Prof. Ricardo José Caldas Machado  
Prof. Salvador Vilar Correia Lima  
Prof. Saulo Monteiro dos Santos  
Prof. Sílvio Caldas Neto (vice-coordenador)  
Prof. Sílvio Romero de Barros Marques  
Prof. Tércio Souto Bacelar

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador no Brasil, Dr. Edmundo Machado Ferraz, pelo incentivo ao aprendizado e desenvolvimento científico durante toda a pós-graduação.

Ao meu orientador no exterior, Dr. John C. Marshall, pela oportunidade de trabalho, convívio pessoal, apoio e amizade oferecidos.

Ao Dr. Andras Kapus, pela grande colaboração na discussão técnica e teórica sobre os experimentos.

Ao Dr. Ori Rotstein, pelos comentários, sugestões e tratamento democrático no laboratório e reuniões, onde tive a oportunidade de trabalhar com nomes de expressão mundial.

À Jean Parodo, colaboradora deste trabalho, pela oportunidade de partilhar da convivência pessoal e familiar, e do exemplo de vida e comunicação.

Aos colegas de laboratório Song, Ling, Ruijen, James Lu, Kinga Powers, Rachel Kadoroo, Giuseppe Papia, Andras Masszi, Caterina di Ciano, Gabor pela ajuda na discussão, desenvolvimento das técnicas, amizade e freqüentes doações de sangue.

À minha esposa Carmen, principal colaboradora desta obra, que participou ativamente de todas as fases deste trabalho, desde o momento de sua concepção. Ademais ao apoio técnico, seu apoio afetivo foi fundamental para a gestação do mesmo, demonstrando mais uma vez ser companheira incansável para todos os momentos.

Aos amigos Sandro Rizoli e Michele, pelo apoio durante nossa estada no Canadá, semeando amizade e despertando sentimento de admiração duradouros.

Aos meus amigos e companheiros do curso de graduação, residência, mestrado e doutorado, Josemberg Campos e Luís Filipe Lima, pela sua colaboração contínua durante as oportunidades de aprendizado.

Aos meus pais, que continua e carinhosamente vem ensinando-me que a vida é boa e fruto do que semeamos.

Aos meus irmãos, exemplos de amizade, independência, competência, força de vontade e respeito.

Aos meus sobrinhos Gabriel, Arthur, Jane, Neyla, Catarina e primas Eduarda e Juliana, pela renovação do amor na nossa família, motivação contínua para luta por uma sociedade mais justa e segura.

A minha amada filha Beatriz, que veio renovar minhas crenças acerca de uma ordem invisível e sutil a comandar a ordem dos eventos na Terra.

Aos meus pacientes pela oportunidade de aprendizado para a Medicina e para a Vida e pela possibilidade de aliviar a dor do semelhante.

A todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho.

## SUMÁRIO

	<b>página</b>
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b> .....	viii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	x
<b>RESUMO</b> .....	xii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2.OBJETIVOS</b> .....	3
<b>3. LITERATURA</b> .....	4
<b>3.1. APOPTOSE</b> .....	4
<b>3.1.1. Breve histórico</b> .....	4
<b>3.1.2. Conceitos e morfologia</b> .....	5
<b>3.1.3. Apoptose na ontogênese e homeostasia</b> .....	7
<b>3.1.4. Regulação da apoptose em neutrófilos: estudos <i>in vitro</i></b> .....	11
<b>3.1.5. Apoptose em neutrófilos: estudos clínicos</b> .....	17
<b>3.2. CÁLCIO, POLARIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA E APOPTOSE EM PMN</b> .....	18
<b>4. MÉTODO</b> .....	21
<b>4.1. AMOSTRA</b> .....	21
<b>4.2. DESENHO DO ESTUDO</b> .....	22
<b>4.2.1. Elenco de variáveis</b> .....	22
<b>4.3. MATERIAL</b> .....	23

<b>4.4. PROCEDIMENTOS</b> .....	24
<b>4.4.1. Coleta de sangue</b> .....	24
<b>4.4.2. Isolamento de polimorfonucleares</b> .....	25
<b>4.4.3. Experimentos</b> .....	27
<b>4.4.4. Quantificação das taxas de apoptose</b> .....	29
<b>4.4.5. Quantificação da perda da L-selectina</b> .....	30
<b>4.4.6. Eletroforese de proteínas para quantificação da Caspase-3</b> .....	30
<b>4.5. PLANO DE DESCRIÇÃO E ANÁLISE</b> .....	31
<b>5. RESULTADOS</b> .....	32
<b>5.1. EXPERIMENTO I – Efeito do lipopolissacarídeo na apoptose de PMN em baixa concentração de cálcio extracelular</b> .....	32
<b>5.2. EXPERIMENTO II – Efeito temporal da concentração de cálcio extracelular na apoptose de PMN</b> .....	34
<b>5.3. EXPERIMENTO III – Efeito de cátions divalentes na inibição da apoptose dos PMN induzida por LPS</b> .....	36
<b>5.4. EXPERIMENTO IV – Efeito da despolarização de membrana por ouabaína na apoptose de PMN</b> .....	38
<b>5.5. EXPERIMENTO V – Efeito da concentração de cálcio extracelular na perda da L-selectina em resposta ao LPS</b> .....	40
<b>5.6. EXPERIMENTO IV – Efeito de condições despolarizantes para a membrana plasmática dos PMN na quantidade de Caspase-3</b> .....	41
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	43
<b>6.1. MÉTODOS</b> .....	43
<b>6.2. EXPERIMENTOS</b> .....	45

<b>6.3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>50</b>
<b>7.0. CONCLUSÕES.....</b>	<b>53</b>
<b>8.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>54</b>
<b>9.0. ANEXO I .....</b>	<b>66</b>



## **LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

<b>FIGURA I – TÉCNICAS DE ISOLAMENTO DE LEUCÓCITOS POLIMORFONUCLEARES (PMN).....</b>	<b>26</b>
<b>FIGURA II - EFEITO DO LIPOPOLISSACARÍDEO NA APOPTOSE DE PMN EM BAIXA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO.....</b>	<b>32</b>
<b>FIGURA III – EFEITO TEMPORAL DA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO EXTRACELULAR NA APOPTOSE DE PMN.....</b>	<b>34</b>
<b>FIGURA IV - EFEITO DE CÁTIONS DIVALENTES NA INIBIÇÃO DA APOPTOSE DOS PMN INDUZIDA POR LPS.....</b>	<b>36</b>
<b>FIGURA V – EFEITO DA DESPOLARIZAÇÃO DA MEMBRANA POR OUABAÍNA NA APOPTOSE DE PMN.....</b>	<b>38</b>
<b>FIGURA VI – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO EXTRACELULAR NA PERDA DA L-SELECTINA EM RESPOSTA AO LPS.....</b>	<b>40</b>
<b>FIGURA VII – ELETROFORESE DE PROTEÍNAS PARA CASPASE-3 EM PMN SOB CONDIÇÕES DESPOLARIZANTES.....</b>	<b>42</b>

## **LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA I - EFEITO DO LIPOPOLISSACARÍDEO NA APOPTOSE DE PMN EM MEIO COM BAIXA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO.....</b>	<b>33</b>
<b>TABELA II – EFEITO TEMPORAL DA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO EXTRACELULAR NA APOPTOSE PMN.....</b>	<b>35</b>
<b>TABELA III - EFEITO DE CÁTIONS DIVALENTES NA INIBIÇÃO DA APOPTOSE DE PMN INDUZIDA POR LPS.....</b>	<b>37</b>
<b>TABELA IV – EFEITO DA DESPOLARIZAÇÃO DA MEMBRANA POR OUABAÍNA NA APOPTOSE DE PMN.....</b>	<b>39</b>
<b>TABELA V – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO EXTRACELULAR NA PERDA DA L-SELECTINA EM RESPOSTA AO LPS.....</b>	<b>41</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc – adenilato monofosfato cíclico.

ARDS – síndrome da angústia respiratória do adulto.

ATP – adenosina trifosfato.

C – Celsius.

[Ca<sup>++</sup>] – concentração de cálcio.

[Ca<sup>++</sup>]<sub>e ou i</sub> – concentração de cálcio extra ou intracelular.

DMEM - Meio de Cultura Eagle modificado por Dulbecco.

DNA – ácido desoxirribonucléico.

EGF – fator epidérmico de crescimento.

Fas – receptor de membrana tipo I; CD95.

Fas-L – Fas ligand.

FMLP - N-formilmetionil-leucil-fenilalanina.

GSH – glutation.

G-CSF – fator estimulador de colônia de granulócitos.

GM-CSF – fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago.

HC - Hospital das Clínicas.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio.

ICAM-I – molécula de adesão intracelular-1.

Ig – imunoglobulina.

IFN – interferon.

KCl – cloreto de potássio.

kD - kilodalton

LPS – lipopolissacarídeo.

NaCl – cloreto de sódio.

MAPK p38 – proteína quinase mitógeno-ativada p38.

MODS – síndrome da disfunção de múltiplos órgãos e sistemas.

PMN – leucócitos polimorfonucleares.

RNA<sub>m</sub> – ácido ribonucléico mensageiro.

SSH – solução salina hipertônica.

SIRS – síndrome da resposta inflamatória sistêmica.

TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral alfa.

UFPE - Universidade Federal de Pernambuco.

UI - unidade internacional.

UTI – unidade de terapia intensiva.

UV – ultravioleta.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** Entre suas diversas ações biológicas, o cálcio extracelular exerce um papel fundamental na manutenção da polaridade da membrana plasmática. Procurou-se avaliar o efeito da despolarização da membrana induzidas por baixa concentração extracelular de cálcio ou ouabaína na apoptose e expressão da Caspase-3 em neutrófilos (PMN).

**MÉTODOS:** PMN foram isolados de sangue de voluntários por gradiente de densidade e cultivados por 18h em meios com concentração normal (1.8mM) ou baixa de cálcio (<10nM), ou com ouabaína (1mM), um inibidor da sódio/potássio ATPase. A apoptose foi quantificada por citometria de fluxo pela captação nuclear do iodeto de propídio. A expressão da proteína Caspase-3 foi avaliada por eletroforese de proteínas.

**RESULTADOS:** Não foram observados efeitos na apoptose basal dos PMN com o uso isolado de estímulos despolarizantes. Entretanto, os efeitos inibitórios do lipopolissacarídeo (LPS - 1ug/ml) foram anulados quando os PMN foram cultivados em meio com baixa  $[Ca^{++}]$ , e restaurados pela adição de cátions divalentes (cálcio, estrôncio ou manganês); ouabaína, de forma similar, bloqueou o efeito do LPS. Tanto a depleção de cálcio extracelular quanto a utilização de ouabaína reduziram a expressão da forma precursora da Caspase-3.

**CONCLUSÃO:** A cultura de PMN em meio com baixa  $[Ca^{++}]$  ou ouabaína, dois estímulos distintos que induzem a despolarização de membrana, bloqueiam a inibição da apoptose mediada por LPS em PMN e alteram a expressão de caspases. Estas observações podem estabelecer um novo mecanismo de regulação da sobrevivência dos PMN.

**Palavras-chave:** neutrófilos; apoptose; despolarização da membrana plasmática; lipopolissacarídeo.

## **ABSTRACT**

**INTRODUCTION:** Among its many biologic activities, extracellular calcium plays a key role in the maintenance of plasma membrane polarization. The effect of membrane depolarization induced by low extracellular calcium concentration or ouabain in neutrophil (PMN) apoptosis and Caspase-3 expression are evaluated.

**METHODS:** PMN were isolated from blood of healthy lab volunteers by density gradient centrifugation, and cultured for 18h in normal (1.8mM) or low (>10nM) calcium medium or with the Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase inhibitor, ouabain (1mM). Apoptosis was quantified with flow cytometer by the nuclear uptake of propidium iodide. Caspase-3 protein was evaluated by Western blot.

**RESULTS:** There were no observed effects in PMN apoptosis cultured only with depolarizing stimuli. The inhibitory effects of LPS (1ug/ml) on PMN apoptosis were abolished by culture of PMN in low Ca<sup>++</sup> medium, and restored by the addition of divalent cations (calcium, strontium or manganese); ouabain similarly blocked the inhibitory effects of LPS. Both calcium depletion and ouabain reduced expression of Pro-Caspase-3.

**CONCLUSION:** Extracellular calcium depletion or ouabain, two distinct stimuli that induce plasma membrane depolarization, block the LPS-mediated inhibition of PMN apoptosis, and alter expression and activation of caspases. These observations may establish a novel mechanism regulating PMN survival.

**KEYWORDS:** neutrophils; apoptosis; plasmatic membrane depolarization; lipopolysaccharide.

## 1. INTRODUÇÃO

Neutrófilos desempenham um papel primordial na patogênese da resposta inflamatória dos mamíferos. Depois do processo de ativação, desencadeado por estímulos endógenos ou exógenos, suas propriedades aumentam exponencialmente. A sua capacidade de quimiotaxia, aderência, migração, degranulação, fagocitose e produção de radicais livres de oxigênio está aumentada, bem como seu tempo de vida (Collota *et al.*, 1992; Condliffe *et al.*, 1998; Chilvers *et al.*, 2000). Isto resulta em um incremento funcional e numérico, desejável para defender o organismo de uma fonte infecciosa exógena. Porém, a persistência ou exacerbação desta resposta pode levar a dano tecidual no hospedeiro (Smith, 1994; Marshall & Watson, 1997).

O aumento no período de vida dos neutrófilos (PMN) durante estados inflamatórios ou infecciosos é mediado por retardo na apoptose. A resolução da inflamação sistêmica acontece com a remoção dos PMN ativados por processo de apoptose pelos macrófagos do fígado e baços (Hallett, 1992; Marshall & Watson, 1997). O entendimento dos fenômenos celulares relacionados ao fim da inflamação sistêmica despertam interesse clínico óbvio, por seu potencial envolvimento em estratégias de tratamento da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS).

O cálcio exerce um papel importante na regulação de várias funções celulares. Sua importância como segundo mensageiro de funções neutrofílicas (Bratton *et al.*, 1997; Mahomed *et al.*, 2000; Hauser *et al.*, 2001) e o aumento de suas concentrações intracelulares com vários estímulos que modulam a apoptose (f-MLP, solução salina hipertônica, ionóforos, etc), o coloca como agente potencialmente implicado no desencadeamento e modulação dos processos de morte celular programada pelas vias

plasmática e mitocondrial (Bernardi *et al.*, 1999; Gottlieb, 2000; Vieira & Kroemer, 1999; Duchon, 2000; Rizzuto *et al.*, 2000; Gunter *et al.*, 2000). Além disto, o cálcio extracelular é um dos responsáveis pela manutenção do potencial de membrana plasmática. Embora se saiba que mudanças na concentração de cálcio intracelular possam modular a expressão da apoptose em PMN, até o momento não foi descrito um papel regulatório para o cálcio extracelular. Artigos demonstrando desregulação no metabolismo celular do cálcio em neutrófilos de pacientes com SIRS tem surgido (Hauser *et al.*, 2000; Rose *et al.*, 2000; Hauser *et al.*, 2001), trazendo novo interesse ao tema.

O propósito do presente estudo foi verificar a influência do cálcio extracelular e outros estímulos com efeito na polaridade da membrana celular, nas taxas de apoptose de neutrófilos humanos *in vitro*, estimulados ou não por lipopolissacarídeo.



## 2.0. OBJETIVOS

Os estudos aqui reportados usaram culturas *in vitro* de PMN humanos. Nestas condições visamos:

- 2.1. Verificar a influência do meio de cultura com baixa  $[Ca^{++}]$  na taxa de apoptose espontânea;
- 2.2. Verificar a influência do meio de cultura com baixa  $[Ca^{++}]$  na taxa de apoptose estimulada por LPS;
- 2.3. Observar o efeito da reposição de cátions divalentes (cálcio, estrôncio e manganês) na taxa de apoptose estimulada por LPS;
- 2.4. Verificar a influência do meio de cultura com outro agente despolarizante da membrana (ouabaína) na taxa de apoptose espontânea ou estimulada por LPS;
- 2.5. Comparar os resultados obtidos utilizando meio de cultura com baixa  $[Ca^{++}]$  em apoptose com outra função leucocitária, a perda da L-selectina;
- 2.6. Determinar o efeito da cultura dos PMN em meios com baixa  $[Ca^{++}]$  ou ouabaína na concentração da proteína Caspase-3, em células estimuladas ou não com LPS.

### **3.0. LITERATURA**

#### **3.1. APOPTOSE**

##### **3.1.1. Breve histórico**

Os achados histológicos da apoptose foram descritos pela primeira vez por Walther Flemming, em 1885 ao estudar folículos ovarianos maduros de mamíferos. Em 1914, Ludwig Graper, ao pesquisar células de endométrio propôs que este mecanismo seria oposto ao processo de mitose, e que estaria presente em todos os órgãos em que houvesse necessidade de eliminação de células. Suas observações não receberam a importância devida, passando-se algumas décadas sem estudos relevantes sobre o tema. Em 1950, Glucksmann, examinando embriões, verificou ser este um processo comum nesta fase de desenvolvimento, sugerindo ser esta uma forma especial de morte limitada a tecidos embrionários. Kerr, a partir de 1971, analisando fígado de ratos submetidos à ligadura de segmentos dos vasos portais, demonstrou as mesmas alterações histológicas anteriormente descritas, desta vez em células não germinativas ou embrionárias, retomando os conceitos do início do século. A este mecanismo de morte celular, Kerr denominou apoptose. Esta palavra é de origem grega e refere a perda de pétalas ou folhas caindo no outono, numa alusão a uma perda aceitável, para posterior renovação. Desde então, um grande espectro de particularidades vem sendo estudado sobre fatores relacionados a este processo (Majno & Joris, 1995; Rosser e Goren, 1995).

### 3.1.2. Conceitos e morfologia

Necrose e apoptose, processos de morte celular conhecidos atualmente, são desencadeados por estímulos diversos, sendo factível sua diferenciação, e consequente mensuração, por alterações específicas ocorridas no nível dos compartimentos celulares (Duke *et al.*, 1996; Marshall & Watson, 1997; Kuan & Pássaro, 1998; Spencer Netto & Ferraz, 2001).

A necrose, geralmente mediada por estímulos externos agressivos e não fisiológicos, como a hipóxia, é um mecanismo passivo e patológico. São achados morfológicos/bioquímicos característicos da necrose: a) Perda da arquitetura do citoesqueleto de membrana celular e organelas, com balonização e formação de bolhas, culminando com ruptura e lançamento dos componentes citosólicos no meio extracelular, desencadeando resposta inflamatória tecidual, que é um achado constante; b) Perda da homeostasia iônica intracelular, com aumento das concentrações de sódio e de cálcio e queda das concentrações de potássio intracelular com alteração concomitante de permeabilidade a líquido; c) Desequilíbrio oxidativo, com predomínio de agentes oxidantes; d) Disfunção mitocondrial levando a depleção dos níveis de ATP; e) Ativação de hidrolases degradativas (proteases, fosfolipases e endonucleases) a níveis citosólico e lisossômico. O DNA nuclear sofre hidrólise de forma inespecífica

Devido à liberação de cininas no meio, há migração de células leucocitárias ao redor das células necróticas para a fagocitose, bem como edema e dilatação capilar. Esta resposta inflamatória leva horas a dias para ocorrer, e leva à formação de cicatriz. A necrose ajuda a limitar a infecção, porém, pode lesar extensamente o tecido normal

adjacente (Duke *et al.*, 1996; Flora-Filho & Zilberstein, 1996; Kuan & Pássaro, 1998; Marshall & Watson, 1997; Spencer Netto & Ferraz, 2001).

Apoptose, ou morte celular programada, é um processo vital normal que ocorre todo o tempo nos organismos, de forma ativa e fisiológica. As células, em resposta à estímulos externos ou inerentes à célula, perdem a aderência ao tecido adjacente e estruturas especializadas, como as microvilosidades. Formam-se bolhas citoplasmáticas e a cromatina nuclear condensa e fragmenta-se de forma regular, sendo envolta pela membrana nuclear. A célula perde líquido e divide-se em segmentos envolvidos pela membrana celular chamados corpos apoptóticos. Todo o processo é mediado por vias intracelulares complexas, exigindo a produção de proteínas a partir do material gênico (Cox & Austin, 1997; Kuan & Pássaro, 1998). Os corpos apoptóticos são fagocitados por macrófagos adjacentes sem sinais de inflamação local. É estimado que o processo dure cerca de duas horas desde as primeiras mudanças estruturais até a ingestão pelos fagócitos (Duke *et al.*, 1996; Marshall & Watson, 1997; Kuan & Pássaro, 1998).

A morte celular programada pode ser observada por microscopia ou eletroforese de DNA, uma vez que a fragmentação de DNA segue um padrão característico, sendo este último método qualitativo (Nicoletti *et al.*, 1991).

A aferição das taxas de apoptose através da citometria de fluxo trouxe a possibilidade de sua quantificação, simplificando o processo. Através desta técnica, a morte celular programada pode ser detectada com o uso de corante nuclear, permitindo a quantificação através da identificação das células com DNA fragmentado (hipodiplóide) (Nicoletti *et al.*, 1991; Telford *et al.*, 1992; McClosley *et al.*, 1994) ou ainda pela verificação da fosfatidilserina na membrana celular, fosfolípido que se exterioriza

precocemente na membrana celular de células em apoptose (Homburg *et al.*, 1995; Vermes *et al.*, 1995).

### **3.1.3. Apoptose na ontogênese e homeostasia**

A morte celular programada é essencial para o crescimento e desenvolvimento dos organismos. Embora o processo tenha sido documentado em células embriônicas desde 1950, ganhou impulso há cerca de 30 anos quando foi detectado em organismos maduros. Os estudos com o *Caenorhabditis elegans*, um pequeno nematóide foram de importância para o entendimento da entidade. Este verme maduro possui 1090 células, perdendo precisamente 131 delas durante o processo de maturação (Duke *et al.*, 1996; Marshall & Watson, 1997; Kuan & Pássaro, 1998).

Todo o mecanismo de transformação no embrião humano, como o desaparecimento de membranas interdigitais, fendas faríngeas e tubulização do intestino deve-se à apoptose, sendo que a falha nestes processos pode levar a malformações como sindactilia, anomalias craniofaciais, estenose/atresia intestinal (Marshall & Watson, 1997; Kuan & Pássaro, 1998).

A todo o momento, células estão morrendo devido a morte celular programada nos seres humanos a fim de garantir a homeostase. Queratinócitos iniciam a vida a partir de camadas profundas da pele, e entram em apoptose durante sua jornada às camadas superficiais onde descamam. Este processo de migração e descamação leva cerca de 21 dias, podendo ser acelerado, por exemplo, por queimaduras solares, levando à morte de células mais profundas (Duke *et al.*, 1996; Kuan & Pássaro, 1998).

No intestino, as células migram das criptas para o ápice das vilosidades, onde perdem o contato com a membrana basal e morrem, sendo perdidas no lúmen intestinal. De forma semelhante, as células endometriais são perdidas na menstruação. Nos exemplos citados, evidencia-se a tentativa de equilíbrio entre a produção e morte celular, regulada por fatores tróficos da membrana basal ou hormonais (Duke *et al.*, 1996; Kuan & Pássaro, 1998).

Durante o desenvolvimento do sistema imunológico, os linfócitos que reagem contra antígenos do hospedeiro são eliminados por apoptose, podendo haver a expressão clínica de doença auto-imune se não isto não ocorre de forma adequada (Thompson, 1995; Duke *et al.*, 1996; Thate & Dahanukar, 1997; Kuan & Pássaro, 1998).

Da mesma forma, células transformadas são induzidas à morte, evitando o aparecimento de neoplasias. O acúmulo de mutações em vários genes é necessário para que a célula exiba alterações fenotípicas características do câncer. Quando se verifica a irreversibilidade da transformação, mecanismos de reparo são acionados, desencadeando a apoptose da célula modificada. Se por alguma falha esta sequência de reparo não entra em ação, a célula continuará se multiplicando a despeito da inibição da replicação por contato ou falta de fatores de crescimento e originando metástases. Na maioria dos tumores sólidos em humanos, inclusive pulmão, cólon e mama, observa-se uma falha na expressão da proteína p53, que induz à morte celular programada. Neoplasias de cólon com alguma expressão desta proteína têm melhor resposta a radio e quimioterapia do que aqueles em que não se evidencia o gene (Thompson, 1995; Duke *et al.*, 1996; Thate & Dahanukar, 1997).

A Bcl-2, outra proteína relacionada ao desenvolvimento de neoplasias, particularmente linfomas, onde se encontra em produção excessiva, bloqueia os

mecanismos de indução da apoptose adequada (Duke *et al.*, 1996; Kuan & Pássaro, 1998). O conhecimento de sua forma de ação pode levar a atuação específica, e com a ajuda da engenharia genética, propiciar possibilidade terapêutica.

A orquiectomia ou ooforectomia agem na indução da apoptose de células, inclusive neoplásicas, que dependem de estímulo hormonal para seu crescimento (Thompson, 1995; Thate & Dahanukar, 1997). A expressão excessiva da ciclooxigenase-2 é associada com a supressão da apoptose em câncer de cólon humano. O uso de antiinflamatórios não-hormonais ocasionou o retorno aos níveis normais de apoptose e a regressão de adenomas em pacientes com adenomatose familiar (Thate & Dahanukar, 1997).

Em contraste com as enfermidades anteriores, a morte excessiva pode ocorrer em eventos isquêmicos em cérebro e miocárdio. Nestas entidades, uma parte das células morre imediatamente por necrose, em decorrência da privação aguda de oxigênio e glicose, essenciais para os mecanismos básicos intracelulares. No período que se segue, a zona circunjacente pode morrer, a despeito de receber irrigação. Isto pode ocorrer por necrose, em virtude de lesão direta decorrente da reação inflamatória despertada, porém, a maioria é levada a apoptose (Duke *et al.*, 1996).

Correlacionando outras afecções do aparelho digestivo, a infecção gástrica pelo *Helicobacter pylori* causa liberação de nitrogênio endógeno reativo, que lesa o DNA e estimula a apoptose de células gástricas. O tratamento leva a uma diminuição das taxas de morte celular. A acalásia não chagásica está relacionada a uma perda de neurônios mioentéricos pelo mesmo mecanismo. Na colite ulcerativa, as células da cripta também são induzidas a morte celular. No fígado, uma série de doenças está relacionada a apoptose como as neoplasias e toxicidade por álcool e outras substâncias. O álcool também está

envolvido na indução da morte celular em células pancreáticas na pancreatite alcoólica adequada (Thompson, 1995; Duke *et al.*, 1996; Flora-Filho & Zilberstein, 1996; Marshall & Watson, 1997; Thate & Dahanukar, 1997; Kuan & Pássaro, 1998).

Na Universidade Federal de Pernambuco, em estudo conjunto com as Universidades de Aberdeen e Nottingham, verificaram-se alterações na mucosa e submucosa de intestino delgado em pacientes com sepse intra-abdominal. Observaram aumento da morte celular programada de plasmócitos e uma consequente redução na IgA e IgM, favorecendo a adesão e translocação bacteriana (Coutinho *et al.*, 1997).



### 3.1.4. Regulação da apoptose em neutrófilos: estudos *in vitro*

A regulação das taxas de apoptose em PMN e do lançamento de formas jovens na circulação pela medula óssea são responsáveis por seu aumento numérico durante as infecções e posterior retorno aos valores basais (Smith, 1994; Marshall & Watson, 1997). O período de vida do neutrófilo está entre os mais curtos entre todas as células. Eles vivem menos que um dia entre a liberação pela medula óssea e a morte por apoptose, sendo fagocitados por macrófagos do fígado ou baço (Haslett, 1992). *In vitro*, após 24h em cultura, uma grande proporção de PMN extraídos do sangue periférico ou tecidos inflamados exibe características celulares compatíveis com apoptose (Savill *et al.*, 1989). Neutrófilos apoptóticos perdem gradualmente as funções de mudança de formato e migração, reduzindo a resposta receptor dependente a degranulação, metabolismo oxidativo, fagocitose (Whyte *et al.*, 1993a) e diminuem a expressão de L-selectina (Tanji-Matsuba *et al.*, 1997).

A taxa de apoptose nos neutrófilos é muito sensível às condições ambientais. A exposição a componentes orgânicos e alguns processos celulares podem alterar a expressão da apoptose nesta célula. Fagocitose de bactérias, exposição a substâncias bacterianas como endotoxinas ou a algumas citocinas provocam uma diminuição na taxa de apoptose, aumentando a sobrevivência e consequentemente o número dos neutrófilos circulantes na tentativa de fortalecer as defesas orgânicas (Baran *et al.*, 1992; Colotta *et al.*, 1992; Watson *et al.*, 1996a). Os neutrófilos inflamatórios perdem sua sensibilidade aos mecanismos de indução de apoptose e circulam por longos períodos (Marshall & Watson, 1997; Condliffe *et al.*, 1998; Chilvers *et al.*, 2000).

Watson *et al.* (1996a), estudando *in vitro* neutrófilos humanos, os submeteram a estímulos antagônicos no que tange à regulação das taxas de apoptose. Após incubação por 1h ao LPS, submeteu os PMN à incubação com TNF- $\alpha$ , à ingestão de *E. coli*, e a temperatura de 42°C por 45 minutos, observou o efeito predominante destes sobre a ação do LPS, aumentando a taxa de apoptose.

Spencer Netto *et al.* (2000), estudando *in vitro*, PMN humanos submetidos a solução salina hipertônica, demonstrou um aumento das taxas de morte celular programada e que PMN previamente submetidos à solução salina hipertônica (SSH) não apresentavam a queda nas taxas de apoptose ao serem expostos à endotoxina bacteriana.

Antioxidantes endógenos como o glutation (GSH), protegem a célula do metabolismo oxidativo. A exposição ao dietilmaleato, um inibidor do GSH, leva a uma queda nos níveis de glutation intracelulares e aumento nas taxas de apoptose. Uma vez que os antioxidantes celulares levam a mediação intracelular através da fosforilação da tirosina, inibidores da tirosina quinase inibiram a redução das taxas de apoptose induzidas pelo dietilmaleato (Watson *et al.*, 1996b).

O Fas, receptor de membrana tipo I, membro da família do TNF, expresso nos PMN e em uma série de células, quando ativado pelo seu anticorpo agonista ou ligante fisiológico (Fas ligand – FasL), leva à transdução do sinal para morte celular, sendo um mecanismo reportado de apoptose constitucional nos PMN (Liles *et al.*, 1996; Watson *et al.*, 1997a).

Tortorella *et al.* (1998a), estudando apoptose constitucional em PMN de voluntários sadios idosos, não observaram diferença estatisticamente significativa entre este grupo e de voluntários sadios jovens, seja na taxa de apoptose espontânea ou induzida por

Fas-L. Observaram, entretanto, uma diminuição da inibição apoptose devido a estímulo de LPS, GM-CSF e G-CSF em PMN de voluntários idosos expostos a Fas-L.

Watson *et al.* (1997a), demonstraram *in vitro*, um aumento dose dependente das taxas de apoptose em PMN não ativados expostos ao anticorpo anti-Fas, resposta que não foi observada em PMN ativados previamente pela exposição ao LPS ou transmigração de membrana. Uma vez que o LPS induz ao aumento de concentração intracelular de glutathione, foi induzido o aumento da concentração do antioxidante no intracelular através do aumento da concentração no meio, observando diminuição nas taxas de apoptose dos PMN submetidos à anti-Fas. A exposição ao LPS, *in vitro*, aumenta a expressão das  $\beta 2$  integrinas CD<sub>11a</sub> e CD<sub>11b</sub>, diminuindo a expressão da L-selectina. O uso de anticorpos contra a L-selectina aumentou as taxas de apoptose. A L-selectina inicia a cascata de indução da fosforilação da tirosina, ativação da MAPK e liberação do cálcio dos estoques intracelulares (Watson *et al.*, 1997a).

Liles *et al.* (1995 e 1996), também observaram a indução da apoptose em PMN ativados por anti-Fas. Esta indução foi suprimida pela incubação prévia com citocinas pró-inflamatórias [fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF), fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago (GM-CSF), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )], dexametasona ou inibidores da tirosina quinase.

Colotta *et al.* (1992), ao exporem PMN a citocinas [interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), TNF, GM-CSF, G-CSF e IFN- $\gamma$ ], observaram redução das taxas de apoptose. Murray *et al.* (1997), tentando esclarecer controvérsias sobre o efeito do TNF- $\alpha$  na taxa de apoptose dos PMN, demonstraram que este efeito é variável, dependendo do tempo de exposição.

Tempos de exposição de 2 a 6h levam à indução da apoptose, enquanto tempos maiores que 12h levam à inibição do processo.

Kettritz *et al.* (1998), observaram, *in vitro*, que a exposição à IL-8 retarda as taxas de apoptose em 10, 20 e 30h de exposição num processo dose dependente não mediado pelo gene Bcl-2.

O GM-CSF inibe a apoptose e leva a aumento da fosforilação da tirosina. Este efeito é revertido com o uso de um bloqueador da tirosina quinase (genistein). Usando um bloqueador da tirosina fosfatase, Yousefi *et al.* (1994), aumentaram a fosforilação da tirosina e inibiram a apoptose em PMN.

Os neutrófilos humanos possuem quatro receptores para a adenosina, sendo estes acoplados a adenilato ciclase para envio de mensageiro e modulação de processos intracelulares. O receptor  $A_{2a}$ , que ativado inibe a fagocitose, produção de peróxido de hidrogênio, radical superóxido e regula a expressão de receptores  $CD_{18}$ , quando ativado por agonistas levam à redução das taxas de apoptose (Walker *et al.*, 1997). A adição de inibidores da fosfodiesterase potencializam esta redução, sugerindo que o adenilato monofosfato cíclico ( $AMP_c$ ) esteja envolvido como mensageiro intracelular (Tortorella *et al.*, 1998; Walker *et al.*, 1997). A exposição a prostaglandina  $E_1$  e  $E_2$  ( $PGE_1$  e  $PGE_2$ ), que modulam funções celulares em neutrófilos através do  $AMP_c$ , também retardam a apoptose em PMN em cultura (Walker *et al.*, 1997).

A adesão do PMN ao endotélio, um dos passos precoces na resposta inflamatória, mediado por receptores de membrana específicos (moléculas de adesão), modula funções efetoras no PMN como concentração de cálcio intracelular, estado do citoesqueleto, resposta aos agonistas da inflamação (Whorthen & Downey, 1993; Chacon-Cruz *et al.*, 1998). Ginis & Faller (1997) observaram que a adesão de PMN a diferentes superfícies leva

a diferenças na regulação das taxas de apoptose, a depender da superfície. A adesão ao endotélio ativado com exposição prévia a interleucina-1 (Il-1), reduz as taxas de apoptose em relação à adesão ao endotélio não ativado, sendo este efeito revertido pela adição ao meio de anticorpos monoclonais contra a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e contra a cadeia  $\beta_2$  das integrinas leucocitárias.

O processo de localização neutrofílica em resposta a um estímulo inflamatório é precoce, decorrendo da interação entre as moléculas de adesão dos PMN e seus contrarreceptores no endotélio, seguidos da transmigração para o local da lesão. Watson *et al.* (1997b), demonstraram que o processo de transmigração pelo endotélio pode modular as taxas de apoptose ao induzir a migração em membrana em resposta a um quimiotático. Observaram que PMN não estimulados que migram aumentam a taxa de apoptose, enquanto PMN pré-tratados com LPS apresentavam retardo na apoptose que era exacerbado com a migração através do endotélio.

Frash *et al.* (1998), procuraram definir vias intracelulares de transdução de apoptose. Verificaram que a indução da apoptose por estímulos estressantes com raios ultravioletas (UV), hiperosmolaridade induzida por sucrose e esfingosina foi suprimida com a inibição da MAP p38, o que não aconteceu com a morte celular programada mediada por anti-Fas, formulando a hipótese da existência de pelo menos duas vias mediadoras da apoptose em PMN.

Aoshiba *et al.* (1999), estudando as vias intracelulares da apoptose constitucional dos PMN, *in vitro*, observaram que inibidores específicos da MAPK p38 (SB2035580) levavam a inibição da apoptose constitucional, bem como inibidores da tirosina quinase de maior espectro (genistein) o faziam de forma menos intensa. Estes dados se contrapõem aos

de Frash *et al.* (1998), que sugerem que a MAPK p38 não tem efeito na apoptose constitucional.

A exposição dos PMN ao calor, *in vitro*, uma condição conhecida como choque térmico, em que se mantém as células à temperatura de 43°C por 60 minutos, leva à aceleração da apoptose e diminuição das suas funções oxidativas (Callahan *et al.*, 1999).

Liles *et al.* (1995), observaram em experimento *in vitro*, em que submetiam PMN a culturas com glicocorticóides (dexametasona, prednisolona e hidrocortisona), que ao contrário do efeito observado em linfócitos, houve redução na taxa de apoptose.

### 3.1.5. Apoptose em neutrófilos: estudos clínicos

Pacientes com queimaduras severas apresentam retardo nas taxas de apoptose dos neutrófilos circulantes, provavelmente por mecanismo regulado pelo fator estimulante de crescimento granulócito macrófago (GM-CSF) (Dhanajay *et al.*, 1996).

Pacientes submetidos a cirurgias eletivas apresentam aumento da apoptose dos linfócitos periféricos e redução da apoptose dos PMN. Estas alterações são mais acentuadas e prolongadas em cirurgias de grande porte, sendo aventada que a severidade e persistência destas alterações estaria relacionada aos níveis de interleucina-6 (IL-6) circulante (Kobayashi & Yamauchi, 1997).

Estudando plasma de pacientes com síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) e em pós-operatório de aneurismectomia de aorta eletiva, Jimenez *et al.* (1997) observaram inibição da apoptose dos neutrófilos em relação a doadores sadios.

De forma similar, PMN de pacientes sépticos também apresentam significativa inibição da apoptose. Esta redução é reproduzida *in vitro* ao cultivar PMN de doadores sadios com as citocinas inflamatórias fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), G-CSF e GM-CSF nos níveis detectados em pacientes sépticos. Culturas com IL-6 e IL-8 nas concentrações encontradas no sangue de pacientes sépticos não apresentaram efeito na apoptose dos neutrófilos de doadores sadios (Keel *et al.*, 1997).

No trauma, frequentemente associam-se o choque hipovolêmico e a contaminação, sendo a SIRS e a sepse as principais causas de mortalidade tardia nestes pacientes. Ogura *et al.* (1999) demonstraram que a inibição da taxa de apoptose observada em PMN de pacientes severamente traumatizados permanece por três semanas.

Ertel *et al.* (1999) observaram em pacientes com trauma craniano e torácico, que o líquido cefalorraquidiano e o lavado broncoalveolar demonstra concentrações elevadas de G-CSF. Quando incubados com PMN de doadores sadios, estes produziam inibição das taxas de apoptose que eram parcialmente revertidas quando as soluções eram tratadas previamente com anticorpo monoclonal contra G-CSF.

### 3.2. CÁLCIO, POLARIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA E APOPTOSE EM PMN

No sangue humano, durante a circulação, os PMN estão expostos a uma concentração de cálcio extracelular ( $[Ca^{++}]_e$ ) de aproximadamente 1,8mM. Concentrações similares tendem a ser reproduzidas em meios de cultura convencionais. Cultivos celulares em meios contendo esta  $[Ca^{++}]_e$  resultam na concentração de cálcio intracelular de aproximadamente 100–130nM no citoplasma (Majander & Wikstrom, 1989; Morris *et al.*, 2001), embora tenham sido verificadas diferenças significativas da  $[Ca^{++}]_i$  de acordo com o local da aferição intracelular, ou seja, a concentração pode variar de acordo com o sítio intracelular verificado (Davies & Hallett, 1998; Pettit & Hallett, 2000). Esta diferença é mantida por mecanismos ativos de permeabilidade seletiva da membrana plasmática, uma vez que a tendência das membranas semipermeáveis é a isotonicidade. Quando experimentalmente a  $[Ca^{++}]_e$  é levada a zero, a  $[Ca^{++}]_i$  cai para níveis de aproximadamente 20nM (Majander & Wikstrom, 1989).

A manipulação da  $[Ca^{++}]_e$  até níveis considerados livres de cálcio, leva a despolarização da membrana plasmática de neutrófilos. Acredita-se que isto se deva ao



influxo de sódio do extracelular, que é bloqueado não apenas pela presença extracelular de cálcio, mas também por outros íons divalentes (Majander & Wikstrom, 1989). A ouabaína é um inibidor da sódio/potássio ATPase, que também atua levando a despolarização de membrana, embora haja discordância a respeito da magnitude dessa despolarização (Majander & Wikstrom, 1989).

Contrariamente a maioria das outras células do organismo, o aumento prolongado da  $[Ca^{++}]_i$  em PMN cultivados por 20h, causado por ionóforos (A23187 ou ionomicina), leva a retardo acentuado nas taxas de apoptose. Por outro lado, o uso de quelantes intracelulares do cálcio, levou ao aumento das taxas de apoptose em culturas por 8h (Whyte *et al.*, 1993b).

Hipertonicidade por NaCl ou sucrose, condições que levam ao aumento da taxa de apoptose em PMN (Frash *et al.*, 1998; Spencer Netto *et al.*, 2000), são capazes de induzir aumentos significativos do  $[Ca^{++}]_i$ . Nesta situação, acredita-se que este aumento se daria apenas pela contração de volume celular proporcionado pela hipertonicidade, havendo retorno aos níveis basais com a volta a isotonicidade (Morris, *et al.*, 2001).

O cálcio exerce importantes funções celulares como segundo mensageiro. Entretanto, acredita-se que a ativação dos PMN pelo lipopolissacarídeo (LPS), ocorra de forma cálcio independente. A exposição de PMN pelo LPS não leva a alterações detectáveis na  $[Ca^{++}]_i$ . Coerente com esta hipótese, a depleção das reservas intracelulares de cálcio não inibiram a resposta de regulação dos receptores CD11b/CD18 por neutrófilos estimulados com LPS (Rodeberg & Babcock, 1996).

Chacon-Cruz *et al.* (1998), foram os primeiros a aventar um papel para a despolarização de membrana na regulação da apoptose de PMN. Usando metodologia diversa da utilizada neste estudo, aferiram precocemente a apoptose induzida por

ciclohexamida e observaram que a depleção do cálcio intracelular protegia a célula da apoptose ciclohexamida induzida. Esta proteção foi mantida com o uso de outros meios de cultura que levavam a despolarização da membrana (150 $\mu$ M de KCl).

## **4. MÉTODO**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Sepsis do Departamento de Cirurgia da Universidade de Toronto, através de convênio entre o Serviço de Cirurgia Geral do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco e o referido serviço.

Para realização do mesmo, o doutorando recebeu bolsa individual do Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), na categoria doutorado sanduíche (processo 200545/01-9), durante o período de seis meses em que esteve no exterior.

Todo o material de laboratório utilizado foi custeado pelo Laboratório de Sepse do Departamento de Cirurgia da Universidade de Toronto.

### **4.1. AMOSTRA**

Foram utilizadas no presente estudo amostras de sangue periférico de voluntários saudáveis que trabalhavam nos laboratórios de pesquisa do Toronto General Hospital, entre os meses de junho e dezembro de 2001. A idade dos voluntários variou de 19 a 55 anos. Todos os voluntários negavam ao inquérito qualquer sintoma de doenças ou faziam uso de qualquer medicamento. Nenhum dos mesmos era tabagista ou havia feito uso de álcool nas 72h que antecederam a coleta. O volume das doações variava de 10 a 60ml, conforme o número e tipo de experimentos propostos.

## 4.2. DESENHO DO ESTUDO

O desenho do estudo enquadrou-se na tipologia ensaio biológico, sendo objeto de estudo, *in vitro*, os leucócitos humanos. Na presente investigação, os doadores voluntários foram submetidos à coleta de sangue periférico e em seguida realizou-se o isolamento dos leucócitos polimorfonucleares (PMN) das amostras sanguíneas. Após o isolamento dos PMN realizaram-se os procedimentos dos experimentos, seguidos dos procedimentos inerentes à quantificação das taxas de apoptose das células ou isolamento e separação de proteínas por gradiente de peso molecular.

### 4.2.1. Elenco de variáveis

#### 4.2.1.1. *Variáveis Independentes*

Nome da variável	Escala
[Ca <sup>++</sup> ] no meio de cultura	Nominal (normal; baixo)
Presença de ouabaína no meio de cultura	Nominal (Sim; Não)
Exposição a LPS	Nominal (Sim; Não)
Exposição sequencial a cátions divalentes	Nominal (Sim; Não)

#### 4.2.1.2. *Variáveis Dependentes*

Nome da variável	Escala
Taxa de apoptose em PMN	Razão (%)
Número de PMN positivos para L-selectina	Razão (%)
Concentração de Caspase-3	Quantidade de proteína e relação entre pro-forma e forma ativa.

### 4.3. MATERIAL

Foram utilizados os materiais listados a seguir no presente estudo, estando relacionados os fornecedores.

O meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) DMEM livre de cálcio, proteína sérica de vitelo e penicilina/estreptomicina foram fornecidos pela Gibco Life Technologists Ltd. (Mississauga, ON, Canadá).

Cloreto de sódio, citrato de sódio, Tris, ácido etilenodiamina tetraacético (EDTA), EGTA, Triton – X, iodeto de propídio (PI), albumina bovina obtidos da Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo.).

Dextran T500 e Ficoll foram oriundos da Pharmacia (San Diego, Calif).

LPS (E. coli, 0111:B4) fornecido pela Difco Laboratories (Detroit, MI).

Sistema de detecção de quimiluminescência, anticorpo anti-coelho com peroxidase acoplada e anti-rato foram comprados da Amersham Pharmacia Biotech.

Albumina bovina, anticorpo monoclonal fluoresceína isotiocanato-conjugado anti-L-selectina (CD62L) foi comprado da Immunotech. Demais materiais utilizados foram obtidos da Sigma e Gibco.

Os meios de culturas eram acrescidos de penicilina/estreptomicina e proteína sérica de vitelo. Para utilização do meio com baixo cálcio ( $7-9\eta\text{M}$ ) foi adicionado EGTA ( $400\mu\text{M}$ ) a solução de DMEM livre de cálcio. A concentração de cálcio foi calculada por programa de computador de forma matemática e dosada em laboratório. Além disso, um controle usando cultura de PMN com ionomicina foi utilizado a cada experimento.

Para utilização do meio com ouabaína,  $1\text{mM}$  da substância foi acrescido ao DMEM  $[\text{Ca}^{++}]$  normal, sendo este conservado com proteção da luz.

A manipulação das amostras sanguíneas ocorria em capelas de fluxo unidirecional. O citômetro de fluxo utilizado foi o Coulter EPICS XL-MCL.

#### **4.4. PROCEDIMENTOS**

##### **4.4.1. Coleta de sangue**

Foi realizada a coleta individual de sangue dos voluntários sempre pelo horário da manhã após noite de sono e refeições habituais. Foram seguidas as normas de assepsia e antissepsia requeridas para um procedimento invasivo com uso de luvas e material estéril em ambiente próprio.

As punções procederam-se com escalpe número 21, na veia cefálica a altura da prega do cotovelo, em seringa de  $50\text{ml}$ . O escalpe e a seringa foram previamente

preparados com 1.000 UI de heparina sódica para cada 10ml de sangue. Após a coleta, o sangue seguia para os procedimentos de isolamento na capela de fluxo unidirecional.

#### **4.4.2. Isolamento de polimorfonucleares**

Após a coleta, cada 10 a 30ml de sangue são colocados em tubo com 10ml de dextran a 3% por 25min, observando-se a sedimentação das hemácias. As camadas superiores, localizadas acima das hemácias eram aspiradas e colocadas em um segundo tubo com 10ml de Ficoll-Paque. A solução era submetida à centrifugação por 20min a uma velocidade de 1.200RPM, a temperatura ambiente (aproximadamente 21°C). O sobrenadante da solução era desprezado e adicionado 2ml de solução de lise a base de amônia por 5min, para evitar a contaminação por hemácias. Realizada nova centrifugação por 5min a uma velocidade de 1.200RPM, a temperatura ambiente. O sobrenadante novamente desprezado e as células ressuspensas em solução isotônica de DMEM com  $[Ca^{++}]$  normal (Savill *et al.*, 1989). 10 $\mu$ l da solução eram colocados em lâmina e corados por azul de tripan, sendo realizada a contagem de células. A partir desta, a solução era submetida a uma nova diluição com DMEM com  $[Ca^{++}]$  normal fim de obter-se a concentração de  $10^6$  PMN/ml (Figura I). As células eram novamente centrifugadas e ressuspensas no meio de cultura a ser estudado  $\{[Ca^{++}]$  normal, baixa (7-9 $\eta$ M), ou com ouabaína (1mM) $\}$ .

Todos os tubos usados no processo foram de polipropileno, a fim de evitar a aderência de células. O grau de pureza observado dos PMN foi maior que 95%, verificado pela microscopia direta e pela citometria de fluxo.





### **4.4.3. Experimentos**

#### ***4.4.3.1. Experimento I***

Após o isolamento dos neutrófilos estes foram cultivados em meios com  $[Ca^{++}]$  normal ou baixa, com ou sem adição de lipopolissacarídeo. Após 18h de cultura, os PMN foram submetidos a procedimentos para verificação da taxa de apoptose, havendo seis repetições do experimento.

#### ***4.4.3.2. Experimento II***

Após o isolamento, os PMN foram expostos a LPS em meios com  $[Ca^{++}]$  normal ou baixa por uma hora em condições de cultura. Todas as amostras foram então submetidas a centrifugação e ressuspensas em meio com  $[Ca^{++}]$  normal, sendo cultivadas por 17h. Após 18h do isolamento, os PMN foram submetidos a procedimentos para verificação da taxa de apoptose. O experimento foi repetido por cinco vezes.

#### ***4.4.3.3. Experimento III***

Após os procedimentos de isolamento, os neutrófilos foram cultivados em meio com baixa  $[Ca^{++}]$ , incubados com ou sem lipopolissacarídeo, receberam a adição subsequente de 2mM dos cátions divalentes cálcio, estrôncio ou manganês. Após 18h de cultura, os PMN foram submetidos a procedimentos para verificação da taxa de apoptose, sendo realizadas cinco repetições.

#### ***4.4.3.4. Experimento IV***

Após os procedimentos de isolamento, os neutrófilos foram cultivados em meio com  $[Ca^{++}]$  normal com ou sem ouabaína e estimulados ou não por LPS. Após 18h de cultura, os PMN foram submetidos a procedimentos para verificação da taxa de apoptose (n=7).

#### ***4.4.3.5. Experimento V***

Após os procedimentos de isolamento, os neutrófilos foram cultivados em meios com  $[Ca^{++}]$  normal ou baixa e estimulados ou não por LPS. Após 2h de cultura, os PMN foram submetidos a procedimentos para verificação da perda da L-selectina. O experimento foi repetido cinco vezes.

#### ***4.4.3.6. Experimento VI***

Após os procedimentos de isolamento, os neutrófilos foram cultivados em meios de cultura com  $[Ca^{++}]$  baixa,  $[Ca^{++}]$  baixa com reposição de cátions divalentes,  $[Ca^{++}]$  normal ou  $[Ca^{++}]$  normal com ouabaína por 20h. Procedeu-se então a extração de proteínas. Estas foram utilizadas em técnica de eletroforese de proteínas para detecção de Caspase-3 em suas formas precursora e ativa. O experimento foi repetido quatro vezes comparando a reposição dos cátions divalentes e quatro comparando meios de cultura com  $[Ca^{++}]$  baixa,  $[Ca^{++}]$  normal e com adição de ouabaína.

#### 4.4.4. Quantificação das taxas de apoptose

A quantificação das taxas de apoptose foi realizada após 18 horas de cultura (37°C; 5% CO<sub>2</sub>) após o isolamento dos PMN. As soluções com PMN testadas foram centrifugadas a 1200RPM por cinco minutos a temperatura ambiente. As células foram delicadamente ressuspensas em 400 ul de solução de fluorocromo hipotônico (50 ug/ml de iodeto de propídio; 3,4 mmol/L de citrato de sódio; 1 mmol/L Tris; 0,1 mmol/L EDTA, 0,1 % Triton X-100), estocados por 20 minutos no escuro a 4° C (Nicolleti *et al.*, 1991) e analisados pelo citômetro de fluxo Coulter EPICS XL-MCL (Miami, FL) com o software Lysis II. Desta forma foi verificada a aquisição de fluorescência pelo núcleo das células e o tamanho, registrando os dados em escala logarítmica. A taxa de apoptose em PMN foi quantificada como a percentagem de células com DNA hipodiplóide uma vez que os PMN apoptóticos são distintos dos normais por esta característica (Nicolleti *et al.*, 1991; Telford *et al.*, 1992). Esta forma de aquisição de dados permite a diferenciação de debris e possível contaminação por células de outra linhagem. Um número mínimo de 10.000 eventos é coletado e analisado. Todas as aferições foram realizadas pelo autor, com os mesmos instrumentos.

#### **4.4.5. Quantificação da perda da L-selectina**

A quantificação da perda da L-selectina dos neutrófilos foi realizada por citometria de fluxo. Após duas horas de cultura, os PMN foram incubados com anticorpo marcado contra L-selectina e armazenados por 30 minutos a 4°C, protegidos da luz. As células foram analisadas por citometria (Coulter EPICS XL-MCL), usando o detector FL1 (comprimento de onda de 488). Um total de 5000 neutrófilos foi analisado por amostra e os resultados foram expressos como número de neutrófilos apresentando fluorescência (anticorpos marcados para L-selectina).

#### **4.4.6. Eletroforese de proteínas para quantificação da Caspase-3**

Para quantificar a proteína Caspase-3, foram utilizadas amostras de PMN em cultura por 20h nos meios previamente descritos. As células foram centrifugadas e acondicionadas em 1ml de PBS, novamente centrifugadas e após retirada de sobrenadante rediluídas em 40 µl de solução A (10µl de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> a 100mM; 10µl de PMSF 100mM; 20µl EGTA 50mM; 12.5µl NaF 1M; 1µl leptina 10mg/ml; 1µl aprotinina a 10mg/ml) e 40 µl de solução B (400µl de SDSa 10%; 100µl glicerol 100%; 66µl Tris/HCl pH7.0 a 1M; 1µl bromphenol blue 1%; 390µl H<sub>2</sub>O; 40µl DTT), aquecidas a 100° C por 5min e estocadas por congelamento em -20°C.

O extrato protéico obtido foi separado por gradiente de migração por eletroforese de proteínas em gel de SDS-poliacrilamida a 15% (2,3ml de H<sub>2</sub>O; 5ml de mistura de acrilamida a 30%; 2,5ml de Tris 1,5M – pH 8,8; 0,1ml de SDS a 10%; 0,1ml de persulfato

de amônia a 10%; 4µl de TEMED por gel). Em seguida, as proteínas foram transferidas para membrana de polivinil diofluoride por eletroblot e as terminações livres reativas bloqueadas com tampão salino Tris contendo albumina bovina a 1% por 12h a 4°C. A membrana então era imersa em solução com anticorpo contra Caspase-3 na concentração de 1:3.000 por 30 minutos, temperatura ambiente. Os complexos antígeno-anticorpo eram marcados por IgG anti rato marcadas com peroxidase e detectados por sistema de detecção de quimioluminescência em filme radiológico. A análise foi feita com base na densidade das bandas correspondentes das formas precursoras (Pro-Caspase-3) de 34 e 32 kD e formas ativas de 20 e 18kD. Foi verificada a aplicação similar de proteínas no gel através do azul de Cromassie. Foram considerados conclusivos os achados concordantes em todos os quatro experimentos.

#### 4.5. PLANO DE DESCRIÇÃO E ANÁLISE

Foram seguidas as recomendações para apresentação e editoração de tese sugeridas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (Spector, 2001).

O formato das referências bibliográficas desta tese seguiu as normas estabelecidas Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas, denominadas *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomed Journals*, e conhecidas como o Estilo de Vancouver (<http://www.icmje.org>).

Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Todos os experimentos foram feitos em duplicata. Utilizou-se o programa STATISTICA for Windows (Copyright)

para análise estatística dos dados, sendo empregado o método do T pareado para amostras dependentes para análise dos dados. Empregou-se o intervalo de confiança de 95%.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. EXPERIMENTO I - Efeito do lipopolissacarídeo na apoptose de PMN em baixa concentração de cálcio extracelular

Neutrófilos incubados em meio com baixa  $[Ca^{++}]$  apresentam taxa de apoptose basal similar ao controle. Entretanto, a inibição da apoptose induzida por LPS é revertida em meio com baixa  $[Ca^{++}]$  (Figura II – Tabela I). Os dados referentes aos experimentos individuais estão no Anexo I.

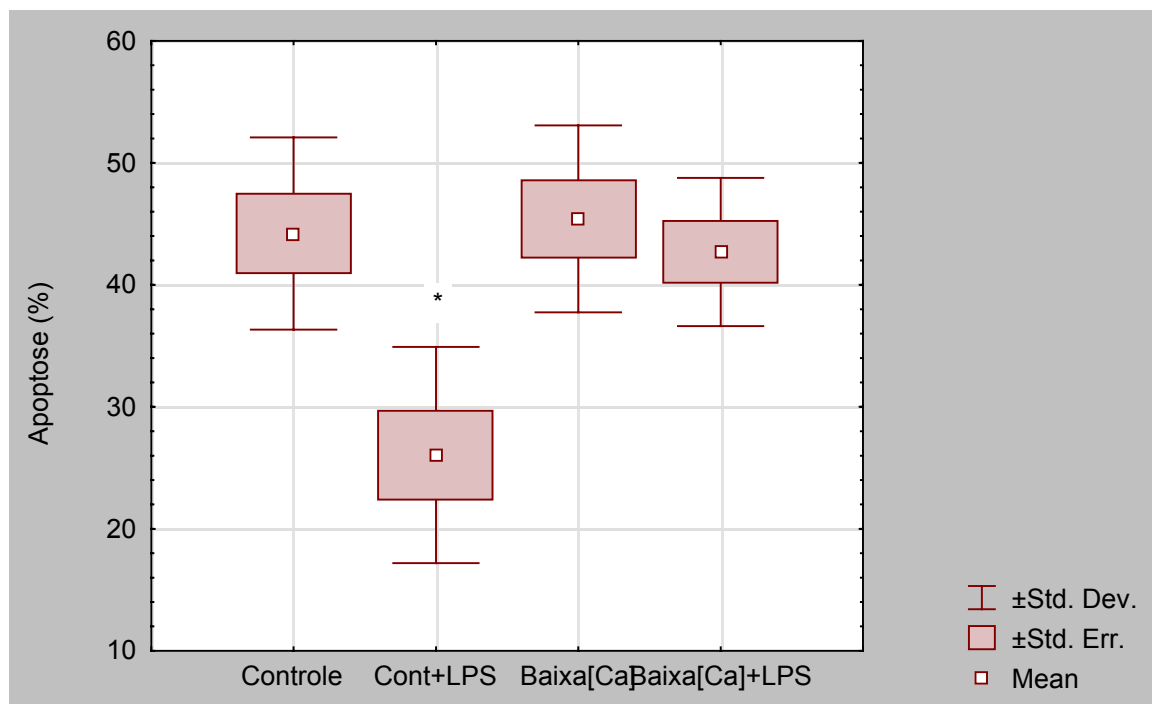


Figura II – Efeitos do LPS na apoptose de PMN em baixa concentração de cálcio extracelular. N=6; \*  $p < 0,001$  do controle.

TABELA I - EFEITO DO LIPOPOLISSACARÍDEO NA APOPTOSE DE PMN EM MEIO COM BAIXA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO.

Meio de Cultivo	Média $\pm$ desvio padrão	p
Controle ( $[Ca^{++}]$ 1,8mM)	44,2 $\pm$ 7,9	-
Controle + LPS	26,1 $\pm$ 8,9	0,001
Baixa $[Ca^{++}]$	45,4 $\pm$ 7,7	0,814
Baixa $[Ca^{++}]$ + LPS	42,7 $\pm$ 6,1	0,678

## 5.2. EXPERIMENTO II - Efeito temporal da concentração de cálcio extracelular na apoptose de PMN

PMN foram expostos a LPS em meios com  $[Ca^{++}]$  normal ou baixa por uma hora e então centrifugados e ressuspensos em meio com  $[Ca^{++}]$  normal (Figura III – Tabela II). A inibição da apoptose pelo LPS ocorreu em ambas condições. Os dados referentes aos experimentos individuais estão no Anexo I.

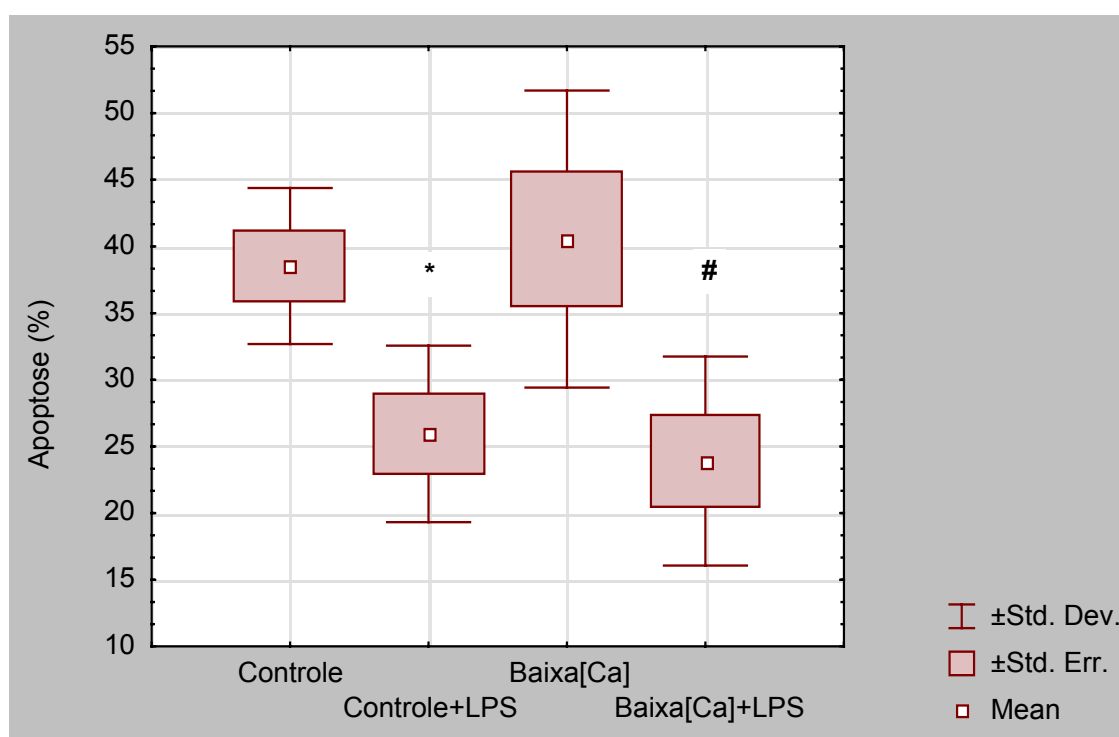


Figura III – Efeito temporal da concentração do cálcio extracelular na apoptose de PMN humanos. N= 5; \* p=0,002 do controle; #=0,001 do controle. Observação: as amostras foram centrifugadas após 1h e ressuspensas num meio com concentração normal de cálcio.



TABELA II – EFEITO TEMPORAL DA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO EXTRACELULAR NA APOPTOSE DE PMN

Meio de Cultivo	Média $\pm$ desvio padrão	p
Controle ( $[Ca^{++}]$ 1,8mM)	38,5 $\pm$ 5,8	-
Controle + LPS	25,9 $\pm$ 6,6	0,001
Baixa $[Ca^{++}]$	40,6 $\pm$ 11,1	0,814
Baixa $[Ca^{++}]$ + LPS	23,9 $\pm$ 7,8	0,678

Observação: as amostras foram centrifugadas após 1h e ressuspensas num meio com concentração normal de cálcio.

### 5.3. EXPERIMENTO III – Efeito de cátions divalentes na inibição da apoptose dos PMN induzida por LPS

Neutrófilos foram cultivados em meio com baixa  $[Ca^{++}]$ , recebendo posteriormente a adição de 2mM dos cátions divalentes cálcio, estrôncio ou manganês, sendo incubados com ou sem lipopolissacarídeo. A adição de cátions divalentes (cálcio, estrôncio ou manganês) ao meio com baixa  $[Ca^{++}]$  restaura a resposta ao LPS (Figura IV – Tabela III), demonstrando um efeito inespecífico que pode ser exercido por outros cátions. Os dados referentes aos experimentos individuais estão no Anexo I.

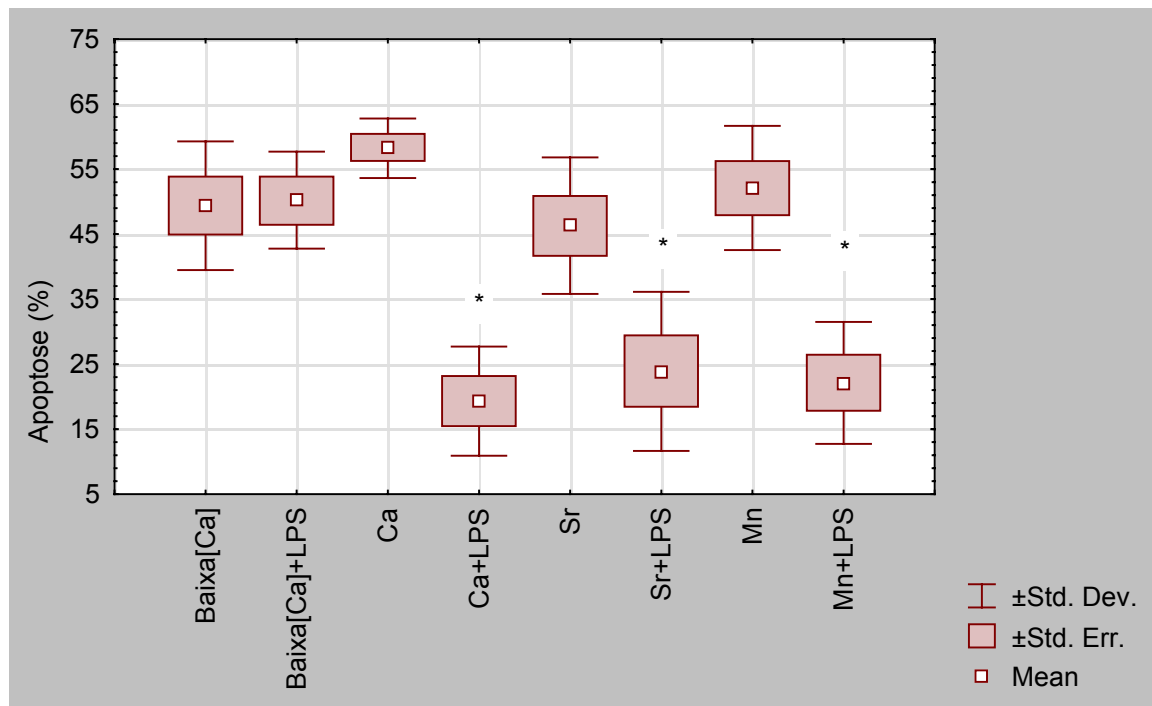


Figura IV – Efeitos de cátions divalentes na inibição da apoptose dos PMN induzida por LPS. N= 5; a amostra que recebeu apenas cálcio foi considerada controle; \*  $p < 0,001$  do controle.

TABELA III - EFEITO DE CÁTIOS DIVALENTES NA INIBIÇÃO DA APOPTOSE DOS PMN INDUZIDA POR LPS.

Meio de Cultivo	Média $\pm$ desvio padrão	p
Baixa [Ca <sup>++</sup> ]	49,4 $\pm$ 9,9	0,181
Baixa [Ca <sup>++</sup> ]+ LPS	50,2 $\pm$ 7,5	0,192
Baixa [Ca <sup>++</sup> ]+Ca	58,2 $\pm$ 4,6	-
Baixa [Ca <sup>++</sup> ]+ Ca+LPS	19,3 $\pm$ 8,4	0,0009
Baixa [Ca <sup>++</sup> ]+Sr	46,3 $\pm$ 10,5	0,08
Baixa [Ca <sup>++</sup> ]+ Sr+LPS	23,8 $\pm$ 12,8	0,006
Baixa [Ca <sup>++</sup> ]+Mn	52,9 $\pm$ 9,6	0,171
Baixa [Ca <sup>++</sup> ]+ Mn+LPS	22,1 $\pm$ 9,4	0,0008

#### 5.4. EXPERIMENTO IV – Efeito da despolarização da membrana por ouabaína na apoptose de PMN

Neutrófilos foram cultivados em meio com  $[Ca^{++}]$  normal, com ou sem adição de ouabaína e estimulados ou não por LPS. A presença de ouabaína em meio de cultura inibiu a redução da taxa de apoptose observada em neutrófilos desencadeada pelo LPS (Figura V – Tabela IV). Os dados referentes aos experimentos individuais estão no Anexo I.

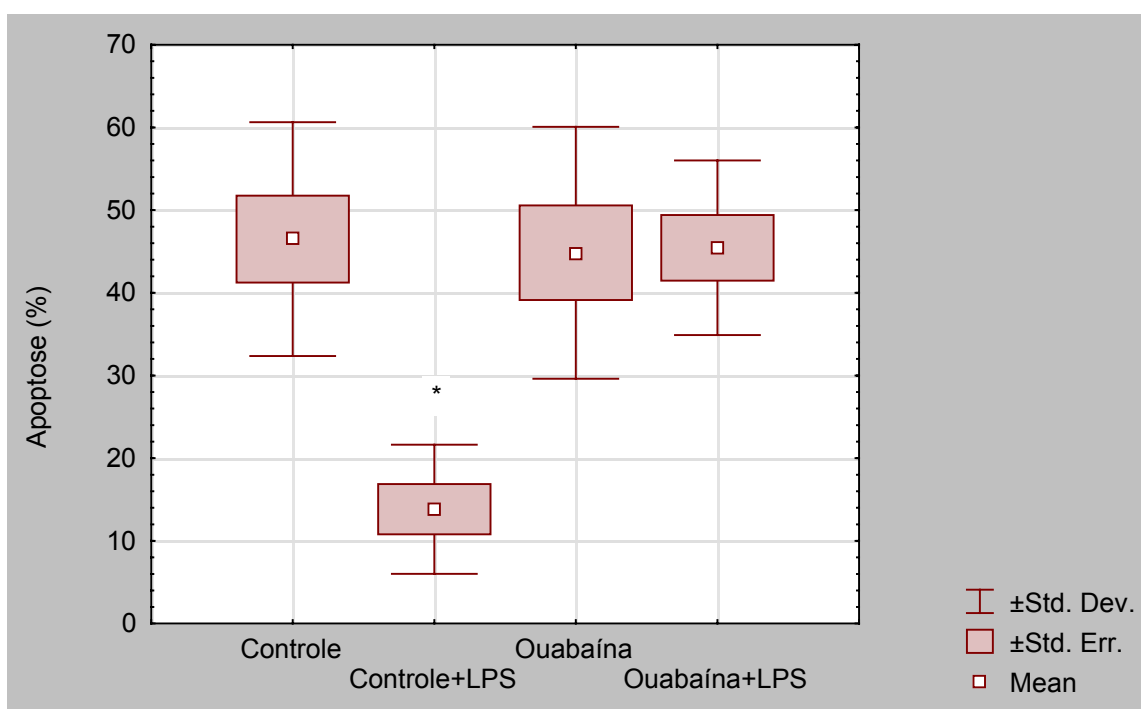


Figura V – Efeito da despolarização de membrana induzida por ouabaína na apoptose de PMN. N=7; \*  $p < 0,002$  do controle.

TABELA IV – EFEITO DA DESPOLARIZAÇÃO DA MEMBRANA POR OUABAÍNA NA APOPTOSE DE PMN.

Meio de Cultivo	Média $\pm$ desvio padrão	p
Controle ( $[Ca^{++}]$ 1,8mM)	46,7 $\pm$ 14,1	-
Controle + LPS	13,8 $\pm$ 7,8	0,001
Ouabaína (1mM)	44,8 $\pm$ 15,2	0,750
Ouabaína (1mM)+ LPS	45,4 $\pm$ 10,6	0,816

### 5.5. EXPERIMENTO V – Efeito da concentração de cálcio extracelular na perda da L-selectina em resposta ao LPS

Neutrófilos foram cultivados em meios com  $[Ca^{++}]$  normal ou baixa e estimulados ou não por LPS. A perda da L-selectina induzida pelo LPS não sofreu modificação pela concentração de cálcio no meio extracelular (Figura V – Tabela V). Os dados referentes aos experimentos individuais estão no Anexo I.

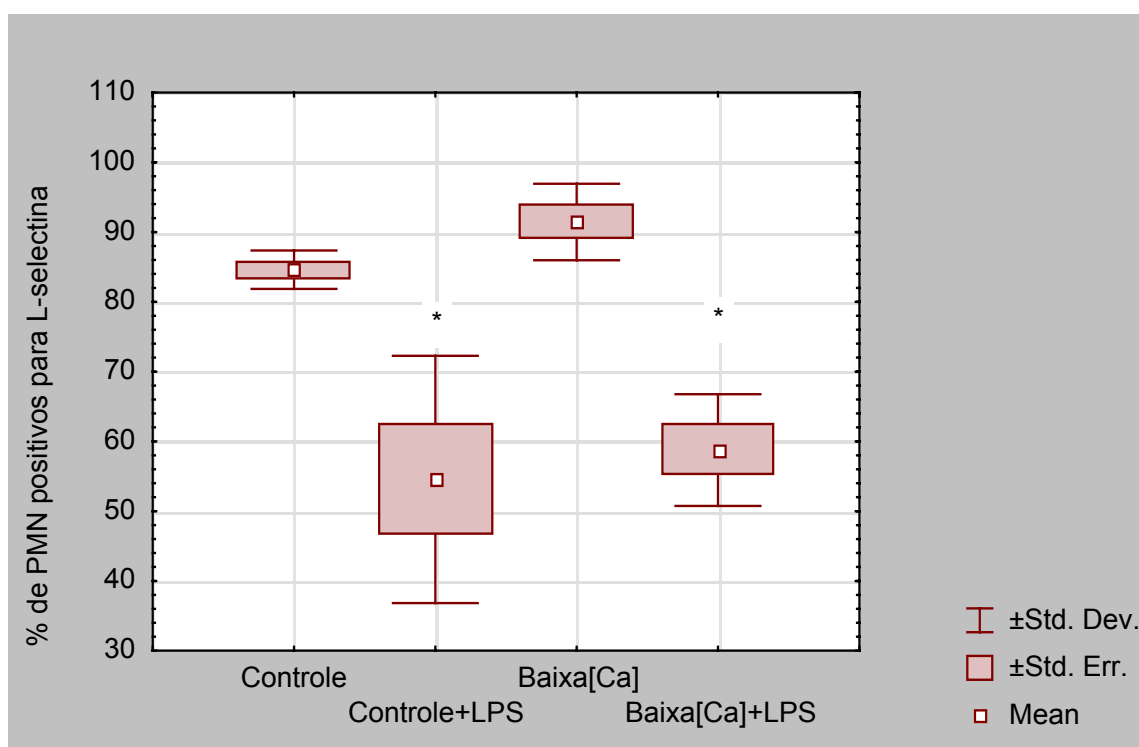


Figura VI – Efeito da concentração de cálcio extracelular na perda da L-selectina dos PMN em resposta ao LPS. N=5; \*  $p < 0,02$  do controle.

TABELA V – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO EXTRACELULAR NA PERDA DA L-SELECTINA EM RESPOSTA AO LPS.

Meio de Cultivo	Média $\pm$ desvio padrão	p
Controle ( $[Ca^{++}]$ 1,8mM)	84,6 $\pm$ 2,7	-
Controle + LPS	54,5 $\pm$ 17,7	0,017
Baixa $[Ca^{++}]$	91,4 $\pm$ 5,5	0,922
Baixa $[Ca^{++}]$ + LPS	58,8 $\pm$ 8,0	0,0009

Observação: a variável aferida foi a porcentagem de PMN positivos para Ac anti L-selectina (CD62L).

### 5.6. EXPERIMENTO VI – Efeitos de condições despolarizantes para a membrana plasmática de PMN na quantidade de Caspase-3

Após 20h de cultivo em meios de cultura com  $[Ca^{++}]$  baixa,  $[Ca^{++}]$  baixa com reposição de cátions divalentes,  $[Ca^{++}]$  normal ou normal com ouabaína, com ou sem estímulo por LPS, as células foram submetidas à extração de proteínas. Em seguida foi realizado eletroforese de proteínas para detecção de Caspase-3 em suas formas precursora e ativa. Verificou-se a diminuição da quantidade total de Caspase-3, particularmente em sua forma precursora, em células cultivadas em condições que levavam a despolarização da membrana plasmática (Figura VII).

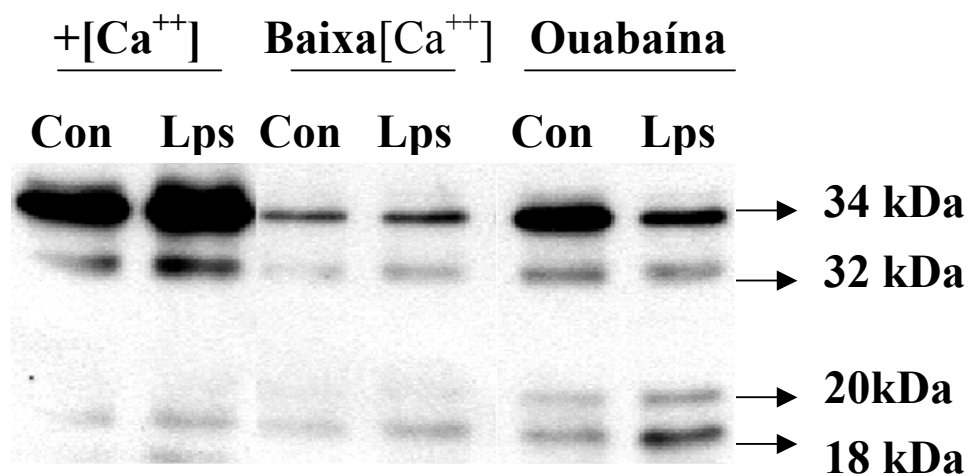
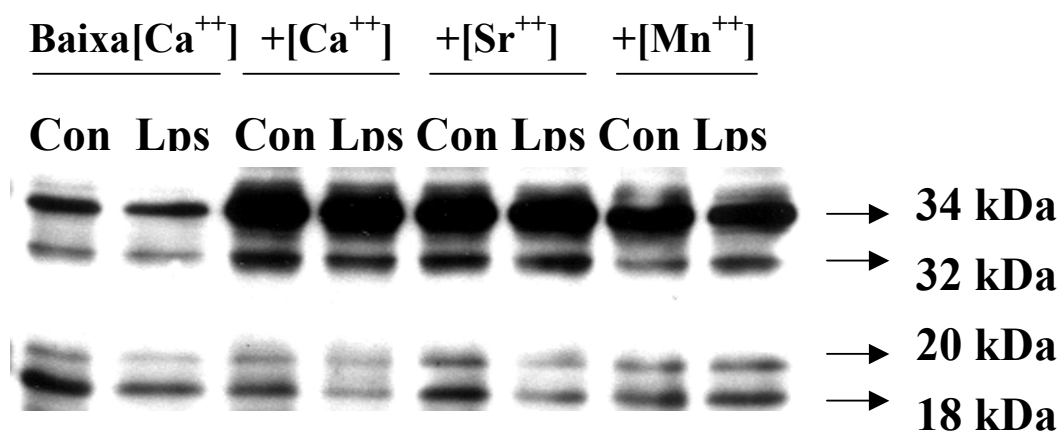


Figura VII – Eletroforese de proteínas para Caspase-3 em PMN humanos sob condições despolarizantes. Observação: os filmes acima representam cada um o resultado de quatro experimentos com resultados similares.



## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. MÉTODOS

A amostra utilizada foi formada por voluntários sadios, em sua maioria pesquisadores ou profissionais do Toronto General Hospital. Uma vez que as variáveis pesquisadas referem-se a propriedades fundamentais dos neutrófilos, uma população de doadores sadios não deve diferir significativamente de outra. Possíveis fatores de confusão estariam relacionados a enfermidades que causem alteração quantitativa ou qualitativa nos neutrófilos. Não foi verificada ao interrogatório anormalidade que estivesse associada a anormalidades funcionais ou quantitativas ou qualitativas dos PMN (ex: elevada frequência de infecções).

Manaster *et al.* (1996) demonstraram *in vitro* o efeito da exposição prolongada de heparina na indução de apoptose em neutrófilos de humanos. No presente estudo, a coleta do sangue foi feita em tubos heparinizados com dose constante e a exposição à mesma foi transitória, apenas na fase inicial de coleta e isolamento dos PMN, sendo esta técnica usada pela maioria dos autores que estuda o tema (Baran *et al.*, 1996; Watson *et al.*, 1996a e b/ 1997a e b; Jimenez *et al.*, 1997; Frash *et al.*, 1998; Tortorella *et al.*, 1998a e b).

A escolha de meio com  $[Ca^{++}]$  diferente de zero (em torno de  $7-9\eta M$ ) deveu-se ao receio de instabilidade da membrana plasmática dos PMN em cultura prolongada com a ausência total de cálcio extracelular. Entretanto, uma vez que a  $[Ca^{++}]_i$  quando PMN são cultivados em meio livre de cálcio situa-se em torno de  $20\eta M$ , não há diferença de gradiente entre a concentração utilizada neste trabalho em relação ao meio totalmente livre de cálcio (Majander & Wikstrom, 1989).

Os PMN são células sensíveis aos estímulos ambientais exigindo manuseio delicado a fim de evitar a ativação. Devido a esta possibilidade, todos os experimentos foram realizados pelo mesmo pesquisador, usando a mesma aparelhagem. Pelo mesmo motivo, as amostras controle foram submetidas aos procedimentos de centrifugação e ressuspensão como as amostras testadas.

Uma vez que se buscou analisar uma propriedade fundamental dos neutrófilos, em que a resposta a pergunta de cada experimento versava sobre a possibilidade de um estímulo causar ou não variação nas taxas de apoptose ou de perda da L-selectina, usou-se o mínimo de experimentos necessários para alcançar resultado estatístico confiável (N variou de 5 a 7 de acordo com o experimento). Há uma tendência mundial neste sentido, relacionando resultados com análise estatística, baixando custos e economizando tempo do pesquisador. Este número de repetições por experimento está de acordo com as publicações relacionadas ao tema, bem como o método estatístico utilizado (T pareado para amostras dependentes).

Previamente à utilização da citometria de fluxo, a morte celular programada poderia ser aferida por métodos de microscopia ou eletroforese de DNA. No primeiro método, são necessárias a identificação morfológica e contagem pelo pesquisador das células individualmente. Na eletroforese, o DNA é separado, determinando-se o DNA intacto e o fragmentado, apresentando o risco potencial de contaminação por DNA de células necróticas, sendo menos sensível e não quantitativo (McCloskey *et al.*, 1994).

A aferição das taxas de apoptose e da perda da L-selectina através da citometria de fluxo é um meio reprodutível e fidedigno, trazendo a possibilidade de quantificação celular, simplificando o processo (Nicoletti *et al.*, 1991; Telford *et al.*, 1992; McCloskey *et al.*, 1994; Homburg *et al.*, 1995; Vermes *et al.*, 1995). O propidium iodide é um corante

nuclear, permitindo a quantificação da apoptose através da identificação das células com DNA fragmentado (hipodiplóide), que formam um pico na área  $A_0$ . Neste método, não há possibilidade de interferência da leitura por células necróticas, identificadas em outra fase da leitura (Nicoletti *et al.*, 1991; McCloskey *et al.*, 1994; Vermes *et al.*, 1995). As células em apoptose também podem ser identificadas na citometria de fluxo devido a expressão precoce da fosfatidilserina na membrana celular com o uso de corantes específicos (Homburg *et al.*, 1995; Vermes *et al.*, 1995).

A verificação da quantidade de Caspase-3 nas células estudadas é um método qualitativo, em que é possível ver a distribuição relativa das formas precursoras e ativas. Para uma adequada comparação, é necessário que as colunas estejam igualmente carregadas com proteínas celulares. A verificação da quantidade de proteína foi estimada visualmente por análise do gel formado com azul cromassie. Estes métodos poderiam ter sido aperfeiçoados pela análise densitométrica computadorizada das bandas, que atribuiria valores relativos as bandas estudadas, permitindo comparação quantitativa e mais fidedigna.

## **6.2. EXPERIMENTOS**

Verificou-se no Experimento I que os PMN deixam de responder ao LPS com redução das taxas de apoptose em meio com baixa  $[Ca^{++}]$ . Uma vez que foi verificada anteriormente ausência de alteração nas reservas de cálcio intracelular com estímulo por LPS (Rodeberg & Babcock, 1996) e que PMN cultivados em meio livre de cálcio preservam a modulação de CD11b/CD18 em resposta ao LPS, formulou-se a hipótese que o meio com baixo cálcio a interação entre LPS e seu receptor estariam preservadas, porém

passos subseqüentes da cascata de desenvolvimento das alterações morfológicas relacionadas a diminuição da apoptose mediada por LPS seriam dependentes da  $[Ca^{++}]_e$ .

No Experimento II, observou-se que os PMN estimulados por 1h pelo LPS em meio com baixa  $[Ca^{++}]_e$ , submetidos a centrifugação e ressuspensão em meio com  $[Ca^{++}]_e$  normal (livre de LPS) apresentavam resposta ao LPS com queda das taxas de apoptose. Esta informação corrobora com a hipótese que ocorre o acoplamento LPS-receptor em meio com baixa  $[Ca^{++}]_e$ , porém os passos subseqüentes do desenvolvimento das alterações relacionadas a modulação da apoptose desencadeada por LPS são dependentes da  $[Ca^{++}]_e$ . Uma hipótese alternativa é que apenas uma centrifugação seria insuficiente para remover todas as moléculas de LPS e as que permanecessem na cultura seriam suficientes para desencadear a resposta na presença de cálcio extracelular. Entretanto, o método empregado (centrifugação e ressuspensão) é o padrão para a remoção de partículas extracelulares de pequena massa molecular como o LPS.

Uma vez que meios de cultura livres de  $[Ca^{++}]_e$  levam a despolarização da membrana plasmática dos PMN e que, a propriedade de manutenção do potencial de membrana pode ser mantida inespecificamente por outros cátions divalentes (Majander & Wikstrom, 1989), procurou-se avaliar o efeito da adição de outros cátions divalentes na regulação de apoptose mediada por LPS. No Experimento III verificou-se que a adição de estrôncio ou manganês no meio com baixa  $[Ca^{++}]_e$  atuou de forma idêntica a adição do cálcio, sugerindo um papel inespecífico para o mesmo, que poderia ser apenas de manutenção da polaridade de membrana. Chacon-Cruz *et al.* (1998) já haviam sugerido um papel da polaridade da membrana de PMN na regulação da apoptose e demonstrado a inespecificidade do meio com ausência do cálcio extracelular, que poderia ser substituído por meio com 150mM de KCl. Entretanto, de forma contrária e usando metodologia

diversa a utilizada no corrente trabalho, demonstrou diminuição da apoptose espontânea em PMN cultivados por 16 e 24h em meio extracelular livre de cálcio.

Utilizou-se outro estímulo a fim de levar a despolarização da membrana plasmática dos PMN (ouabaína 1mM). De forma concordante aos experimentos anteriores, PMN cultivados com ouabaína não apresentaram resposta com modulação da apoptose ao estímulo do LPS, corroborando a hipótese de que, a despolarização da membrana plasmática e não a ausência do  $[Ca^{++}]_e$  seria o fenômeno responsável pela perda desta propriedade.

As selectinas constituem um grupo de glicoproteínas de membrana, que engloba as L-, E- e P-selectinas. Suas características estruturais incluem um domínio cálcio-dependente no terminal amina, um domínio tipo fator epidérmico de crescimento (EGF-like), um domínio transmembrana e um curto final citoplasmático (Crockett-Torabi *et al.*, 1998).

A adesão dos neutrófilos às células endoteliais é um evento básico no processo de migração celular e subsequente inflamação tissular. Neutrófilos circulantes no sangue periférico entram em contato e transitoriamente interagem com moléculas das células endoteliais, resultando em um movimento de rolamento pela superfície endotelial. O rolamento constitui um primeiro passo no recrutamento de neutrófilo para os tecidos, estabelecendo uma associação frouxa entre eles, representando um pré-requisito para uma posterior interação firme com o endotélio. Este processo é mediado por proteínas pertencentes à família das selectinas, as quais distribuem-se em leucócitos (L e P-selectina) e células endoteliais vasculares (E e P-selectina). Nos neutrófilos, a molécula da L-selectina é localizada na microvilosidade do neutrófilo e é clivada ou perdida durante a ativação desta célula, permitindo aos neutrófilos o início dos estágios subsequentes de adesão. L-

selectina é rapidamente clivada a partir da membrana celular por metaloproteases ainda não conhecidas (Walcheck *et al.*, 1996; Kahn *et al.*, 1998; Middelhoven *et al.*, 1999; Burg & Pillinger, 2001).

Anteriormente foi demonstrado que PMN em meio livre de cálcio mantinha a resposta de regulação de CD11b/Cd18 (Rodeberg & Babcock, 1996). O fato do LPS ser efetivo na modulação desta propriedade da membrana em meio livre de cálcio e não ser na modulação da apoptose poderia ser justificado se diferentes vias intracelulares estivessem relacionadas a cada uma destas funções neutrofílicas. Assim, foi necessário testar outra função neutrofílica regulada pelo LPS. A perda da L-selectina induzida pelo LPS não foi influenciada pela meio de cultura utilizado, sugerindo que a necessidade de cálcio no meio é específica para a modulação da apoptose mediada por LPS, porém não para as outras funções acima discutidas. Outro ponto relevante é que há discussão sobre o tempo que o meio livre de cálcio leva para causar completa despolarização dos PMN. Enquanto alguns autores afirmam que o fenômeno é rápido, outros afirmam que a despolarização é progressiva, demorando pelo menos 120min para apresentar queda diferença estatisticamente significativa (Majander & Wikstrom, 1989; Chacon-Cruz *et al.*, 1998). No caso de que a despolarização significativa só ocorra com 120min o experimento acima se torna inválido, sob o parâmetro de avaliação da influência da perda da L-selectina em resposta ao LPS em células despolarizadas. Uma vez que PMN em cultivo perdem progressivamente L-selectina, e o que se pretendeu no corrente estudo é a avaliação da modulação da perda, outro intervalo de tempo poderia ser inadequado.

As proteínas caspases são cisteíno-proteases envolvidas na regulação do processo de morte celular programada. São atualmente conhecidas 14 caspases, sendo divididas em

3 classes. A Caspase-3, bem como as Caspases-2 e 7, são efetores primários da apoptose pela via citoplasmática e exercem sua ação a partir de sua clivagem na forma ativa.

Analisando os separadamente os grupos de eletroforese de proteínas, pode-se observar um padrão distinto. Estudando inicialmente os experimentos em que cátions divalentes (cálcio, estrôncio e manganês) são adicionados a meio com baixa  $[Ca^{++}]$  e estimulados ou não com LPS, pode-se observar que, nas soluções em que se preserva a polaridade da membrana, a quantidade de Caspase-3 em sua forma precursora (32 e 34 kD) é expressa em bandas mais densas (maior quantidade de proteína). Nos experimentos em que células cultivadas em meio com  $[Ca^{++}]$  foram comparadas a cultivadas em meios com estímulo despolarizante (baixa  $[Ca^{++}]$  ou ouabaína) foi possível reproduzir esta observação inicial, havendo maior quantidade da forma inativa da Caspase-3 entre as células cultivadas no meio que preservou a polaridade celular.

Uma vez que o número de células ao início do experimento foi idêntico para cada grupo, e as proteínas não seriam degradadas por processo passivo, cabe a formulação de algumas hipóteses para explicar estes achados. É possível que a despolarização da membrana cause a degradação da Caspase-3 pela célula ou regule a síntese da mesma. Dados não publicados realizados no Laboratório de Sepsis da Universidade de Toronto sugerem que a síntese de Caspase-3, verificada pela quantidade de RNAm, possa sofrer modulação de sua síntese (Spencer Netto *et al.*, 2002), embora a resposta definitiva esteja em aberto.

### 6.3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo das propriedades funcionais dos neutrófilos pode ajudar na compreensão e tratamento de inúmeras enfermidades que tem sua patogênese mediada por esta célula. De particular importância para clínica cirúrgica, apresenta-se a SIRS pela alta morbidade e mortalidade associadas. A maioria dos pacientes que vem a falecer em Unidades de Terapia Intensiva (50-80%), sofre a falência progressiva dos órgãos vitais conhecida como síndrome de disfunção de múltiplos órgãos e sistemas (MODS), que desenvolve-se a partir da SIRS ou da septicemia (Marshall & Nathens, 1996).

As estratégias para tratamento desta entidade, apesar da pequena mudança do ponto de vista prático, sendo mantido basicamente o tratamento de suporte em UTI, passou por uma mudança conceitual importante. A verificação que estados graves de inflamação sistêmica, podem acontecer sem a presença de microorganismos (SIRS) mudou o foco de atenção das pesquisas em desenvolvimento de antibióticos potentes, para as possíveis estratégias de modulação da resposta imunológica (Bone *et al.*, 1992; Nathens & Marshall, 1996). Esta mudança de entendimento levou, por exemplo, a reutilização de corticosteróides em situação de síndrome da angústia respiratória do adulto (ARDS – Tasaka *et al.*, 2002).

Há cerca de duas décadas, houve no meio científico a impressão que o conhecimento e controle das moléculas mediadoras da inflamação levaria ao controle da SIRS. Apesar de resultados em sua maioria favoráveis em situações experimentais, anticorpos monoclonais contra citocinas inflamatórias falharam em demonstrar efeitos benéficos em estudos clínicos. É possível que isto se deva ao fato de que, em situações clínicas, a cascata inflamatória está ativada, sendo múltiplas as substâncias circulantes pró e



anti-inflamatórias, interagindo de forma complexa. Atualmente, as atenções dos pesquisadores se voltam para a modulação das funções das células envolvidas na inflamação. Neste quadro, a observação do aumento da apoptose de linfócitos e diminuição da apoptose de neutrófilos em situação de inflamação merece destaque (Smith, 1994; Marshall & Watson, 1997; Condliffe *et al.*, 1998; Chilvers *et al.*, 2000; Oberholzer *et al.*, 2001).

Neutrófilos ativados circulam em condições de inflamação sistêmica. Como discutido anteriormente, esta exacerbação funcional pode levar a danos no hospedeiro (Chilvers *et al.*, 2000; Condliffe *et al.*, 1998; Smith, 1994). Embora recentemente tenha-se verificado a possibilidade do PMN ser desativado e ativado *de novo* (Condliffe *et al.*, 1998), não se sabe ainda a importância numérica e funcional deste processo. Desta forma, a retirada dos PMN por apoptose permanece como principal mecanismo potencial implicado na resolução da inflamação sistêmica (Chilvers *et al.*, 2000; Squier *et al.*, 1995).

O presente estudo versou sobre uma propriedade básica dos PMN: a resposta a apoptose em condições reconhecidamente despolarizantes. O conhecimento das propriedades elementares dos PMN trazidos por estudos *in vitro* são importantes para entendimento do funcionamento destas células e para aventar futuros estudos de intervenção. Torna-se necessário esclarecer, por exemplo, se a modulação da apoptose dos PMN por outras substâncias observadas na circulação durante a SRIS, que exerçam papel pró e anti-inflamatório, também necessitam da preservação da polaridade da membrana plasmática ou se é um fenômeno específico para o LPS. De importância também é o conhecimento se o retorno da polaridade a membrana celular restauraria sua resposta a modulação da apoptose.

Embora não seja possível na prática clínica reproduzir uso de meios com tão baixa quantidade de cálcio ou uso de ouabaína, os PMN perdem parcialmente a polaridade da membrana ao sofrerem degranulação, quando perdem carga negativa (Demaurex *et al.*, 1993). Sabendo que os estímulos inflamatórios levam precocemente e de forma concomitante a degranulação e perda da suscetibilidade a morte celular programada, é possível aventar uma correlação entre os eventos. Talvez a falha de resposta dos PMN a mecanismos de indução da apoptose durante a SIRS esteja relacionada a despolarização da membrana plasmática.

A despeito de saber-se que a apoptose pode ser modulada, com uma aceleração ou retardo em sua expressão, esta regulação que pode ser efetuada por substâncias exógenas ou endógenas, por alguns processos celulares e que há necessidade de ativação de vias intracelulares a fim de desencadear os mecanismos de produção protéica a partir de material cromossômico, ainda há muito a ser esclarecido sobre o assunto.

Os fenômenos que regem a resposta inflamatória são complexos e ainda mantêm-se incompletamente compreendidos pelos investigadores. É possível que o aprofundamento no estudo do comportamento da morte celular programada em neutrófilos traga contribuição para sua compreensão, permitindo interferir na expressão da mesma, modulando-a e com isso evitando uma série de efeitos indesejáveis observados na SIRS.

## 7. CONCLUSÕES

Nas condições de trabalho apresentadas, é possível concluir com um nível de 95% de segurança que:

I – PMN cultivados em meio com baixa  $[Ca^{++}]$  não modificam sua taxa de apoptose basal;

II – PMN cultivados em meio com baixa  $[Ca^{++}]$  não apresentam a redução da apoptose mediada por LPS;

III – Esta ação permissiva na modulação da apoptose mediada por LPS é exercida de forma inespecífica por cátions divalentes (cálcio, estrôncio ou manganês);

IV – PMN cultivados em meio com outras substâncias (ouabaína) que levam a despolarização da membrana plasmática também deixam de apresentar a modulação da apoptose mediada por LPS;

V – A regulação da perda da L-selectina dos PMN mediada pelo LPS não sofre influência da concentração de cálcio no meio de cultura;

VI – PMN cultivados em condições que levam a despolarização da membrana plasmática apresentam diminuição da quantidade de Caspase-3, particularmente em sua forma precursora.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aochiba K, Yasui S, Mitsutoshi H, Tamaoki J, Nagai A. Role of p38-mitogen-activated protein kinase in spontaneous apoptosis of human neutrophils. *J Immunol* 1999; 162:1692-1700.

Baran J, Guzik K, Hryniewicz W, Ernst M, Flad HD, Pryjma J. Apoptosis of monocytes and prolonged survival of granulocytes as a result of phagocytosis of bacteria. *Infect Immun* 1996; 64:4242-4248.

Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, Lisa F. Mitochondria and cell death - mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochemistry* 1999; 264:687-701.

Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP ET ALL. ACCP/SCCM Consensus Conference. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 1992; 101:1644-1655.

Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of aminophospholipid translocase. *J Biol Chem* 1997; 272:26159-65.

Burg ND, Pillinger MH. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. *Clin Immunol* 2001; 99:7-17.

Callahan TE, Marins J, Welch WJ, Horn J. Heat shock attenuates oxidation and accelerates apoptosis in human neutrophils. *J Surg Research* 1999; 85:317-322.

Chacon-Cruz E, Oelberg DG, Davis P, Buescher ES. Membrane depolarization and depletion of intracellular calcium stores are associated with delay of apoptosis in human neutrophils. *J Leukoc Biol* 1998; 64:759-766.

Chilvers ER, Cadwallader K A, Reed BJ, White JF, Condliffe AM. The function and fate of neutrophils at the inflamed site: prospects for therapeutic intervention. *J Royal College of Physicians* 2000; 34:68-74.

Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 1992; 80:2012-2020.

Condliffe AM, Kitchen E, Chivel ER. Neutrophil priming: pathophysiological consequences and underlying mechanisms. *Clin Sci* 1998; 94:461-71.

Coutinho HB, Robalinho TI, Coutinho VB, Amorim MAS, Furtado AF, Ferraz A, Ferraz E, Walker F, King G, Sewell HF, Wakelin D. Intra-abdominal sepsis: an immunocytochemical study of the small intestine mucosa. *J Clin Pathol* 1997; 50:294-298.

Cox G, Austin RC. Dexamethasone-induced suppression of apoptosis in human neutrophils requires continuous stimulation of new protein synthesis. *J Leukoc Biol* 1997; 61:224-230.

Crocket-Torabi E. Selectins and mechanisms of signal transduction. *J Leukoc Biol* 1998; 63:1-14.

Davies EV, Hallet MB. High micromolar  $\text{Ca}^{2+}$  beneath the plasma membrane in stimulated neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 248:679-683.

Demaurex N, Scherenzel J, Jaconi ME, Lew DP, Krause KH. Proton channels, plasma membrane potential, and respiratory burst in human neutrophils. *Eur J Haematol* 1993; 51:309-12.

Dhanajay C, Dickerson C, Munster AM, Whinchurch RA. Inhibition of apoptosis in polymorphonuclear neutrophils from burn patients. *J Leukoc Biol* 1996; 59:835-839.

Duke RC, Ojcius DM, Young JD. Cell suicide in health and disease. *Sci Am* 1996; 275:80-87.

Duncheon MR. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J of Physiology* 2000; 529:57-68.

Ertel W, Keel M, Buergi U, Hartung T, Imhof H, Trentz O. Granulocyte colony-stimulating factor inhibits neutrophil apoptosis at the local site after severe head and thoracic injury. *J Trauma* 1999; 46:784-793.

Flora-Filho R, Zilberstein B. Apoptosis: programmed cell death. *Arq Bras Cir Dig* 1996; 11:72-77.

Frasch SC, Nick JA, Fadok VA, Bratton DL, Worthen GS, Henson PM. p38 mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent intracellular signal transduction pathways leading to apoptosis in human neutrophils. *J Biol Chem* 1998; 273:8389-8397.

Ginis I, Faller DV. Protection from apoptosis in human neutrophil is determined by the surface of adhesion. *Am J Physiol* 1997; 272:c295-309.

Gottlieb RA. Mitochondria: execution central. *FEBS Letters* 2000; 482:6-12.

Gunter TE, Buntinas L, Sparagna G, Eliseev R, Gunter K. Mitochondrial calcium transport mechanisms and functions. *Cell Calcium* 2000; 28:285-296.

Haslett C. Resolution of acute inflammation and the role of apoptosis in the tissue fate of granulocytes [editorial]. *Clin Sci* 1992; 83:639-648.

Hauser CJ, Fekete Z, Adams JM, Garced M, Livingston DH, Deitch EA. PAF-mediated  $Ca^{2+}$  influx in human neutrophils occurs via store-operated mechanisms. *J Leukocyte Biol* 2001; 69:63-68.

Hauser CJ, Fekete Z, Livingston DH, Goodman ER, Deitch EA. Major trauma enhances store operated calcium influx in human neutrophils. *J Trauma* 2000; 48:592-7.

Homburg CHE, Haas M, Borne AG, Verhoeven AJ, Reuteligsperger COM, Eoos D. Human neutrophil lose their surface Fc $\gamma$ RIII and acquire annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood* 1995; 85:532-540.

Jimenez MF, Watson RW, Parodo J, Evans D, Forster C, Steinberg M, Rotstein OD, Marshall JC. Dysregulated expression of neutrophil apoptosis in the systemic inflammatory response syndrome. *Arch Surg* 1997; 132:1263-1269.

Kahn J, Walcheck B, Migaki GI, Jutila MA, Kishimoto TK. Calmodulin regulates L-selectin adhesion molecule expression and function through a protease dependent mechanism. *Cell* 1998; 92, 809-18.

Keel M, Ungethun U, Steckholzer U, *et al.* Interleukin-10 counterregulates proinflammatory cytokine-induced inhibition of neutrophil apoptosis during severe sepsis. *Blood* 1997; 90:3356-3363.

Kettritz R, Gaido ML, Haller H, Luft FC, Jennette CJ, Falk RJ. Interleukin-8 delays spontaneous and tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated apoptosis of human neutrophils. *Kidney International* 1998; 53:84-91.

Kobaiashi E, Yamauchi H. Interleukin-6 and a delay of neutrophil apoptosis after major surgery. *Arch Surg* 1997; 132:209-210.



Kuan N, Passaro JR E. Apoptosis: programmed cell death. Arch Surg 1998; 133:773-775.

Liles C, Dale DC, Klebanoff SJ. Glucocorticoids inhibit apoptosis of human neutrophils. Blood 1995a; 86:3181-3188.

Liles C, Dale DC, Klebanoff SJ. Regulation of apoptosis in neutrophils – FAS track to death? J Immunology 1996; 155:3289-3291.

Majander A, Wikstrom M. The plasma membrane potential of human neutrophils: role of ion channels and the sodium/potassium pump. Bioch Biophys Acta 1989; 980:139-145.

Majno G, Joris, I. Apoptosis, Oncosis and Necrosis. Am J Pathol 1995; 146:315.

Manaster J, Chezar J, Shurtz-Swirski R, Shapiro G, Tendler YL, Kristal B, Shasha SM, Sela S. Heparin induces apoptosis in human peripheral blood neutrophils. Br J Haematol 1996; 94:48-52.

Marshall JC, Nathens AB. The gut in critical illness: evidence from human studies. Shock 1996; 6:S10-16.

Marshall JC, Watson RW. Programmed Cell Death (apoptosis) and resolution of systemic inflammation. Surg Biol for the Clin 1997; 40:169-174.

Mahomed AG, Anderson R. Activation of human neutrophils with chemotactic peptide, opsonized zymosan and the calcium ionophore A23187, but not with phorbol ester, is accompanied by efflux and store-operated influx of calcium. *Inflammation* 2000; 24:559-69.

McCloskey TW, Oyaizu N, Coronesi M, Pahwa S. Use a flow cytometric assay to quantitative apoptosis in human lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; 71:14-18.

Middelhoven PJ, Van BJ, Kleijer M, Roos D, Hordijk P. Actin polymerization induces shedding of FcγRIIIb (CD16) from human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 255: 568-574.

Morris MR, Doull IJM, Hallet MB. Osmotically induced cytosolic free Ca<sup>2+</sup> changes in human neutrophils. *Bioch Bioph Acta* 2001; 1538:20-7.

Murray J, Barbara JAJ, Dunkley SA, Lopez AF, Van Ostad X, Condliffe AM, Dransfield I, Hallett C, Chilvers ER. Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-α: requirement for TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis in vitro. *Blood* 1997; 90:2772-2783.

Nathens AB, Marshal JC. Sepsis, SIRS, and MODS: what's in a name. *World J Surg* 1996; 20:386-391.

Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 1991; 139:271-276.

Oberholzer C, Oberholzer A, Claire-Salzler M, Moldawer LL. Apoptosis in sepsis: a new target for therapy. *FASEB J* 2001; 15:879-92.

Ogura H, Tanaka H, Koh T, Hashiguchi N, Kuwagata Y, Hosotsubo H, Shimazu T, Sugimoto H. Priming, second-hit priming, and apoptosis in leucocytes from trauma patients. *J Trauma* 1999; 46:774-783.

Pettit EJ, Hallett MB. Nonuniform distribution of  $Ca^{2+}$  uptake sites within human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279:337-340.

Rizzuto R, Bernardi P, Pozzan T. Mitochondria as all-round players of the calcium game. *J Physiology* 2000; 529:37-47.

Rodeberg DA, Babcock GF. Role of calcium during lipopolysaccharide stimulation of neutrophils. *Infection Immunity* 1996; 64:2812-16.

Rose S, Illerhaus M, Wiercuski A, Mutscheler W, Marzi I. Altered calcium regulation and function of human neutrophils during multiple trauma. *Shock* 2000; 3:92-9.

Rosser BG, Gores GJ. Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology* 1995; 108:252-275.

Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Hallett C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. *J Clin Invest* 1989; 83:865-875.

Smith J. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol* 1994; 56:672-686.

Squier MKT, Sehenert AJ, Cohen JJ. Apoptosis in leukocytes. *J Leukoc Biol* 1995; 57:2-10.

Spector N. Manual para redação de teses, projetos de pesquisa e artigos científicos. 2<sup>o</sup> Edição. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan; 2001.

Spencer Netto FAC, Rizoli SB, Marshall JC, Ferraz EM. Estudo da taxa de apoptose em neutrófilos humanos expostos a solução salina hipertônica e lipopolissacarídeo. *Rev Med HU-USP* 2000; 10:3-12.

Spencer Netto FAC, Ferraz EM. Apoptose, neutrófilos e o cirurgião. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões* 2001; 28:56-61.

Spencer Netto FAC, Simms K, Kummer C, Parodo J, Marshall JC. Involvement of the phosphoinositide 3-kinase pathway in the inhibition of neutrophil (PMN) apoptosis in

clinical and experimental inflammation [abstract]. In: 1st Joint Meeting Surgical Infection Society-Europe; 2-4 de maio/2002; Madrid. Pag. 49. Abstract 27.

Tanji-Matsuba K, van Eeden SF, Saito Y, Okazawa M, Klut ME, Hayashi S, Hogg JC. Functional changes in aging polymorphonuclear leukocytes. *Circulation* 1998; 97:91-98.

Tasaka S, Hasagawa N, Ichizaka A. Pharmacology of acute lung injury. *Pulm Pharmacol Ther* 2002; 15:83-95.

Telford WG, King LE, Fraker PJ. Comparative evaluation of several DNA binding dyes in the detection of apoptosis-associated chromatin degradation by flow cytometry. *Cytometry* 1992; 13:137-143.

Thate U, Dahanukar S. Apoptosis: clinical relevance and pharmacological manipulation. *Drugs* 1997; 54:511-534.

Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 167:1456-1462.

Tortorella C, Piazzolla G, Spaccavento F, Pece S, Jirillo E, Antonaci S. Spontaneous and Fas-induced apoptotic cell death in aged neutrophils. *J Clin Immunol* 1998a; 18:321-329.

Tortorella C, Piazzolla G, Spaccavento F, Antonaci S. Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and cyclic AMP interaction on human neutrophil apoptosis. *Mediators of Inflammation* 1998b; 7:391-396.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Meth* 1995; 184:39-51.

Vieira HLA, Kroemer G. Pathophysiology of mitochondrial cell death control. *Cell Mol Life Sci* 1999; 56: 971-6.

Walcheck B, Kahn J, Fisher Jm, *et al.* Neutrophil rolling altered by inhibition of L-selectin shedding in vitro. *Nature* 1996, 380: 720-723

Walker BAM, Rocchini C, Boone RH, Ip S, Jacobson MA. Adenosine A<sub>2a</sub> receptor activation delays apoptosis in human neutrophils. *J Immunol* 1997; 158:2926-2931.

Watson RWG, Redmond HP, Wang JH, Boucher-Hayes D. Bacterial ingestion, tumor necrosis factor-alpha, and heat induce programmed cell death in activated neutrophils. *Shock* 1996a; 5:46-51.

Watson WG, Rotstein O, Nathens AB, Dackiw APB, Marshall JC. Thiolmediated redox regulation of neutrophil apoptosis. *Surgery* 1996b; 120:150-158.

Watson WG, Rotstein O, Jimenez M, Parodo J, Marshall JC. Augmented intracellular glutathione inhibits Fas-triggered apoptosis of activated human neutrophils. *Blood* 1997a; 89:4175-4181.

Watson WG, Rotstein O, Nathens AB, Parodo J, Marshall JC. Neutrophil apoptosis is modulated by endothelial transmigration and adhesion molecule engagement. *J Immunol* 1997b; 158:945-953.

Whyte MKB, Meagher LC, Macdermot J, Hallett C. Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. *J Immunol* 1993a; 150:5124-5134.

Whyte MKB, Hardwick SJ, Meagher LC, Savill JS, Haslett JS. Transient elevations of cytosolic free calcium retard subsequent apoptosis in neutrophils in vitro. *J Clin Invest* 1993b; 92:446-55.

Worthen GS, Downey GP. Mechanisms of neutrophil mediated injury. IN: *Acute respiratory distress in adults*. Chapman & Hall, London, 1993; 99-114.

Yousefi S, Green DR, Blaser K, Simon H. Protein-tyrosine phosphorylation regulates apoptosis in human eosinophils and neutrophils. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91:10868-10872.

## ANEXO I

### EXPERIMENTO I – EFEITO DO LPS NA APOPTOSE DE PMN EM BAIXA

#### CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO EXTRACELULAR

Data	Controle	Controle+LPS	Baixa[Ca]	Baixa[Ca]+LPS
28/08/01	46.500	22.450	37.900	39.300
29/08/01	36.350	27.300	50.950	49.600
30/08/01	46.650	24.550	39.200	36.900
01/09/01	57.400	42.250	51.050	50.500
02/09/01	41.650	15.550	38.550	42.700
03/09/01	36.700	24.200	54.850	37.150

### EXPERIMENTO II – EFEITO TEMPORAL DA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO

#### EXTRACELULAR NA APOPTOSE DE PMN

Data	Controle	Controle+LPS	Baixa[Ca]	Baixa[Ca]+LPS
11/09/01	35.300	28.050	32.050	26.900
15/09/01	45.000	27.700	51.350	28.700
16/09/01	32.550	17.550	26.600	14.700
21/09/01	44.650	34.800	51.100	32.600
24/09/01	35.150	21.600	41.650	16.600



EXPERIMENTO III - EFEITO DE CÁTIOS DIVALENTES NA RECONSTITUIÇÃO DO EFEITO DO LPS NA APOPTOSE DE PMN

Data	↓[Ca]	↓ [Ca]+LPS	Controle	Cont+ LPS	Sr	Sr+LPS	Mn	Mn+LPS
11/10	44.400	-	54.900	11.400	31.100	9.840	37.100	13.500
16/10	38.550	44.200	65.950	16.700	42.950	13.500	59.350	25.550
17/10	54.950	58.750	55.850	33.550	59.900	39.500	61.250	33.700
18/10	63.600	54.200	58.850	18.550	47.850	26.000	52.600	26.350
19/10	45.350	43.750	55.500	16.350	49.700	30.600	50.150	11.450

Observação: experimentos realizados em outubro de 2001; ↓ = baixa.

EXPERIMENTO IV - EFEITO DA DESPOLARIZAÇÃO DA MEMBRANA POR OUABAÍNA NA APOPTOSE DE PMN.

Data	Controle	Controle+ LPS	Ouabaína (1mM)	Ouabaína +LPS
21/10/01	36.800	25.500	42.400	34.200
22/10/01	52.800	6.130	38.100	51.370
23/10/01	22.500	6.130	20.950	34.700
24/10/01	66.850	18.750	57.350	53.200
29/10/01	53.200	6.510	34.400	35.600
13/11/01	42.800	14.150	56.700	48.650
16/11/01	50.500	19.600	63.900	60.400

EXPERIMENTO V - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO EXTRACELULAR  
A PERDA DA L-SELECTINA EM RESPOSTA AO LPS.

Data	Controle	Controle+ LPS	Baixa[Ca]	Baixa[Ca]+LPS
28/09/01	84.200	32.600	95.400	56.400
02/10/01	87.000	54.700	91.800	67.200
03/10/01	84.200	44.600	96.800	47.800
04/10/01	80.400	61.100	90.400	56.300
11/10/01	87.200	79.700	82.800	66.100