

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**FABIANE LUNARDI**

VALIDAÇÃO DA MENSURAÇÃO DA EXPLOSÃO RESPIRATÓRIA EM  
GRANULÓCITOS HUMANOS NORMAIS E LEUCÊMICOS INDUZIDA  
POR ZYMOSAN E ÉSTER DE FORBOL PELA TÉCNICA DE  
CITOMETRIA DE FLUXO

Florianópolis  
2004

**FABIANE LUNARDI**

VALIDAÇÃO DA MENSURAÇÃO DA EXPLOSÃO RESPIRATÓRIA EM  
GRANULÓCITOS HUMANOS NORMAIS E LEUCÊMICOS INDUZIDA  
POR ZYMOSAN E ÉSTER DE FORBOL PELA TÉCNICA DE  
CITOMETRIA DE FLUXO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia na Universidade Federal de Santa Catarina, visando a  
obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia

**Orientador: Prof. Dr. José Hermênio Cavalcante Lima Filho**

**Co-orientador: Prof. Dr. Jamil Assreuy**

Florianópolis  
2004

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor José Hermênio Cavalcante Lima Filho pela oportunidade que me foi dada para a realização deste trabalho.

Ao Professor Jamil Assreuy, meu co-orientador e amigo. Meu eterno agradecimento pela confiança em mim depositada e sobretudo pela maneira simples e paciente com que me apoiou nos momentos de maior dificuldade.

A Adriana que esteve sempre presente para me auxiliar como uma excelente profissional e amiga.

A professora Maria Cláudia pela gentileza de ter cedido o taxol para a realização de vários experimentos.

Ao HEMOSC pelo apoio e manutenção do funcionamento de vários serviços essenciais a esta pesquisa, em especial ao Setor de Marcadores Celulares e de Coleta de sangue.

A amiga Renata, pelo auxílio na execução de vários dos experimentos apresentados aqui, além da paciência e atenção que a mim dedicou.

As colegas Dodô e Marilene, pelo cantinho de bancada, pelas lâminas coradas etc.

A Professora Sônia pela atenção e contribuição com suas sugestões e correções.

A amiga Dani Leite, pelas valiosas informações que muito me auxiliaram na realização destes experimentos.

As colegas Fabíola, Débora, Mariza, e especialmente a Sílvia, que sempre me receberam de braços abertos em seu laboratório com muito carinho e atenção.

Aos colegas: Sílvia, Marco Rótulo, Joanita e Analia pelo total apoio e incentivo à pesquisa.

Aos colegas do Fracionamento em especial a minha amiga: Patrícia - você apareceu com toda a certeza na hora certa, e foi essencial para que eu pudesse concluir este trabalho.

A minha família pela maneira simples e amável com que sempre me aconchegou e incentivou.

Ao meu marido Juliano pelo incentivo, ensinamentos, orientação, apoio, dedicação e até pelas broncas, que foram sem dúvida nenhuma essenciais para o meu aprendizado e conclusão deste trabalho. Posso dizer que as palavras serão sempre insuficientes para traduzir os meus agradecimentos.

A todos os amigos da farmacologia que me ouviram inúmeras vezes nos momentos difíceis e sempre me apoiaram e incentivaram.

A imprescindível colaboração de todos os doadores de sangue e pacientes que hoje fazem parte deste trabalho.

## SUMÁRIO

Agradecimentos.....	i
Lista de Abreviaturas.....	v
Lista de Figuras.....	vii
Resumo.....	viii
Abstract.....	ix
1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - OBJETIVOS.....	17
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 - Compostos e reagentes.....	18
3.2 - Seleção e obtenção das amostras de sangue.....	18
3.3 - Lise dos eritrócitos.....	19
3.4 - Obtenção de leucócitos por sedimentação com dextrana.....	20
3.5 - Medida da explosão respiratória em granulócitos.....	21
3.5.1 - Princípio do ensaio.....	21
3.5.2 - Incorporação do DCFH-DA.....	22
3.5.3 - Estimulação dos granulócitos.....	23
3.5.4 - Medida da intensidade de fluorescência.....	24
3.6 - Avaliação morfológica dos granulócitos estimulados.....	25
3.7 - Avaliação da viabilidade celular.....	25
3.8 - Participação do $Ca^{2+}$ na explosão respiratória dos granulócitos.....	26
3.9 - Participação do citoesqueleto na explosão respiratória dos granulócitos.....	26
3.10 - Participação da proteína quinase C na explosão respiratória dos granulócitos.....	27
3.11 - Preparo das soluções.....	27
3.11.1 - Compostos.....	27
3.11.2 - Solução de lise.....	28
3.11.3 - Solução balanceada de sais de Hank (HBSS).....	28
3.11.4 - Solução de dextrana 1% (P/V).....	28
3.11.5 - Solução salina tamponada com fosfato (PBS).....	29
3.11.6 - Preparo da suspensão de zymosan.....	29

3.11.7 - Líquido de Türk.....	29
3.12 - Análise estatística.....	29
4 - RESULTADOS.....	30
4.1 - Efeito de diferentes métodos de eliminação de eritrócitos na avaliação da explosão respiratória em granulócitos normais.....	30
4.2 - Efeitos de diferentes estímulos na explosão respiratória de granulócitos.....	33
4.2.1 - Curva temporal da explosão respiratória de granulócitos frente a diferentes estímulos.....	38
4.2.2 – Influencia do número de partículas de zymosan utilizado para cada leucócito na indução da explosão respiratória.....	40
4.3 - Participação do $Ca^{+2}$ extracelular na explosão respiratória.....	42
4.4 - Avaliação do envolvimento do citoesqueleto na explosão respiratória induzida por PMA ou por zymosan em granulócitos.....	44
4.4.1 - Participação dos microfilamentos de actina.....	44
4.4.2 - Participação dos microtúbulos.....	46
4.5 - Avaliação da participação da proteína quinase C em granulócitos estimulados com diferentes estímulos.....	49
4.6 - Avaliação da explosão respiratória em granulócitos de pacientes leucêmicos.....	51
4.6.1 - Explosão respiratória em leucócitos de pacientes leucêmicos, sendo as células obtidas pelo procedimento de lise com cloreto de amônio..	51
4.6.2 - Explosão respiratória em leucócitos de pacientes leucêmicos, sendo as células obtidas pelo procedimento de sedimentação diferencial com dextrana.....	53
5 - DISCUSSÃO.....	55
5.1 - Considerações metodológicas.....	55
5.2 - Mecanismos moleculares.....	61
5.3 - Leucemias.....	71
6 - CONCLUSÕES .....	74
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	75

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AF	- Autofluorescência
BIM I	- Bisindolilmaleimida I
C5a	- Fator C5a do complemento ativado
CR3	- Receptor de complemento tipo 3
DAG	- Diacilglicerol
DCFH	- Diclorofluoresceína
DCFH-DA	- Diacetato de diclorofluoresceína
DCF-oxi	- Diclorofluoresceína oxidada
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DGC	- Doença granulomatosa crônica
DHR-123	- Dihidrorodamina-123
ER	- Explosão respiratória
EROs	- Espécies reativas do oxigênio
ERNs	- Espécies reativas do nitrogênio
EPM	- Erro padrão da média
EGTA	- Ácido N,N,N',N' etilenoglicol- <i>bis</i> ( $\beta$ -aminoetil) tetraacético
FMLP	- N-Formil-metionil-leucil-fenilalanil
FL1	- Filtro para fluorescência verde
FSC	- Detector de dispersão lateral
GTP	- Trifosfato de guanosina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- Peróxido de hidrogênio
HOCl <sup>-</sup>	- Ácido hipocloroso
HNO <sub>2</sub>	- Ácido nitroso
HNO <sub>3</sub>	- Ácido nítrico
HIV	- Vírus de imunodeficiência humana
HBSS	- Solução balanceada de sais de Hank
HTLV	- Vírus T-linfotrópicos humanos
IP3	- Trifosfato de inositol
LTB-4	- Leucotrieno B4
LPS	- Lipopolissacarídeo bacteriano
LMC	- Leucemia mielóide crônica
LMA	- Leucemia mielóide aguda

LLA	– Leucemia linfóide aguda
MPO	– Mieloperoxidase
MLCK	– Quinase de cadeia leve de miosina
NADPH	– Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NH <sub>4</sub> Cl	– Cloreto de amônio
NO•	- Óxido nítrico
NO <sub>2</sub>	- Dióxido de nitrogênio
N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	- Tetróxido di-nitrogênio
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	– Ânion nitrito
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	– Ânion nitrato
NOS	– Óxido nítrico sintase
ONOO <sup>-</sup>	– Ânion peroxinitrito
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	– Ânion superóxido
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	– Molécula simples de oxigênio
•OH	– Radical hidroxil
PMA	– Éster de forbol miristato acetato
PAF	– Fator de agregação plaquetária
PIP <sub>2</sub>	– Fosfoinositol bifosfato
PI3k	– Fosfoinositídeo 3 quinase
PLA <sub>2</sub>	– Fosfolipase A2
PLA <sub>2c</sub>	– Fosfolipase A2 citosólica
PLC	– Fosfolipase C
PBS	– Solução salina tamponada com fosfato
PHOX	– Oxidase fagocítica
PAF	– Fator de ativação plaquetária
PKA	– Proteína quinase tipo A
PKC	– Proteína quinase tipo C
PKG	– Proteína quinase tipo G
PMN	– Polimorfonuclear
SOD	– Superóxido dismutase
SSC	– Detector de dispersão frontal
TNF- $\alpha$	– Fator de necrose tumoral tipo $\alpha$
Zym	– Zymosan

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fagocitose e destruição bacteriana.....	04
Figura 2 – Produção de EROs e de ERNs durante a explosão respiratória em granulócitos.....	08
Figura 3 – Princípio do ensaio de oxidação da DCFH.....	22
Figura 4 – Efeito de diferentes procedimentos de eliminação de eritrócitos na explosão respiratória de granulócitos estimulados com PMA ou zymosan .....	32
Figura 5 – Morfologia de leucócitos em diferentes situações experimentais.....	34
Figura 6 – Registro típico do citômetro de fluxo mostrando os diferentes tipos leucocitários, separados por tamanho e granulosidade.....	35
Figura 7 – Histogramas de fluorescência da explosão respiratória de leucócitos estimulados, avaliada pela oxidação do composto fluorescente DCFH.....	37
Figura 8 – Curva temporal da explosão respiratória de granulócitos estimulados com PMA ou com zymosan.....	39
Figura 9 – Explosão respiratória de granulócitos dependente do tempo de estimulação e número de partículas de zymosan/célula.....	41
Figura 10 – Efeito do EGTA na intensidade de fluorescência causada por PMA ou zymosan em granulócitos normais.....	43
Figura 11 – Efeito da citocalasina D na intensidade de fluorescência produzida pela oxidação do DCFH em granulócitos normais.....	45
Figura 12 – Efeito da colchicina na intensidade de fluorescência produzida pela oxidação do DCFH em granulócitos normais.....	47
Figura 13 – Efeito do taxol na intensidade de fluorescência produzida pela oxidação do DCFH em granulócitos normais.....	48
Figura 14 – Efeito da inibição da proteína quinase C pelo BIM I na intensidade de fluorescência produzida pela oxidação do DCFH em granulócitos normais.....	50
Figura 15 – Curva temporal da explosão respiratória de granulócitos normais e de pacientes leucêmicos estimulados com PMA (160 nM).....	52
Figura 16 – Explosão respiratória em granulócitos de indivíduos saudáveis e leucêmicos. Os granulócitos foram estimulados com PMA (Painel A) e com zymosan (Painel B).....	54

## RESUMO

Pacientes leucêmicos são vítimas de infecções consideradas responsáveis por um alto índice de mortalidade. Pelo menos parte deste quadro parece decorrer da relativa ineficiência da resposta imune inata. Uma das principais características deste sistema é a capacidade dos granulócitos combaterem os agentes infecciosos através da fagocitose e destruição dos microorganismos. Um dos principais mecanismos de citotoxicidade dos granulócitos decorre da sua capacidade de ativar o mecanismo da explosão respiratória (ER), no qual são formadas espécies reativas de oxigênio (EROs) de elevada citotoxicidade. Considerando que a determinação da capacidade dos granulócitos de exibir uma ER adequada é de grande valor para o auxílio no diagnóstico e no prognóstico de doenças que afetem esta função fisiológica, neste trabalho investigamos a ER de granulócitos normais e leucêmicos. A ER foi avaliada pela medida em citômetro de fluxo, da oxidação da diclorofluoresceína, cuja fluorescência aumenta na presença de peróxido de hidrogênio, uma das principais EROs formadas pela ER. No presente estudo, foi comparado o uso de dois estímulos, um de fase fluida (éster de forbol, PMA) e um de fase sólida (zymosan). Além disso, foi estudada a importância do cálcio extracelular, do citoesqueleto e da proteína quinase C na ER causada pelos dois estímulos. Finalmente, avaliou-se a ER em granulócitos de pacientes leucêmicos. Inicialmente, desenvolvemos um método alternativo de retirada dos eritrócitos, que consiste na sedimentação diferencial dos eritrócitos com dextrana. Os granulócitos obtidos por este novo método mostraram ER com os dois tipos de estímulos. A retirada de cálcio extracelular não afetou a ER causada pelo PMA, mas inibiu a ER pelo zymosan. Com relação ao citoesqueleto, a integridade dos microfilamentos de actina foi essencial para a ativação da ER com zymosan, mas não para o PMA. Em relação aos microtúbulos, foi observado um padrão inverso. A ER induzida pelo PMA foi totalmente dependente da proteína quinase C, enquanto a ER induzida pelo zymosan independe desta quinase. Comparados a indivíduos normais, granulócitos de pacientes leucêmicos consistentemente exibiram uma reduzida ER (cerca de 50%) para os dois tipos de estímulos, independente do tipo de leucemia aguda. Portanto, o emprego deste ensaio usando os dois tipos de estímulos, permite que seja avaliado o processo de ER, tornando esta metodologia útil tanto para ensaios clínicos, como para o estudo experimental desta função leucocitária.

## ABSTRACT

Leukemia patients are prone to repeated infections. At least part of this condition can be attributable to a deficient innate immunity. One of the main components of the innate immunity is the ability of granulocytes to combat infectious agents through phagocytosis and killing. One of the main mechanisms responsible for the killing is the respiratory burst (RB), in which are formed reactive oxygen species (ROS) highly cytotoxic. Thus, taking into account that the evaluation of granulocyte ability to mount a proper RB is of diagnostic and prognostic value for such patients, in this work we have evaluated the RB in granulocytes obtained from healthy individuals and patients bearing acute leukemia. RB was assessed in a flow cytometer by the oxidation of a dichlorofluorescein, which fluoresces in the presence of hydrogen peroxyde, one of the main ROS produced during the RB. Two stimuli were used, a fluid one (phorbol ester, PMA) and a particulate one, zymosan. Besides, it was studied the influence of extracelullar calcium, the cytoskeleton and, protein kinase C dependence. Finally, RB was evaluated in cells from leukemia patients. Initially, we employed an alternative method to remove red blood cells, which interferes with the fluorescence by the usage of differential sedimentation with dextran. Granulocytes thus obtained mounted a normal RB for the two stimuli. Calcium removal did not affect PMA-induced RB, but inhibited zymosan-induced RB. Microfilament integrity was essential for zymosan but not for PMA, whereas microtubule depolymerization affected PMA, but not zymosan. PMA-induced RB was totally dependent on protein kinase C, whereas RB for zymosan was not. When compared to normal individuals, granulocytes from leukemia patients showed a reduction of 50% in their RB. Thus, the use of both stimuli allows to study RB, making this method useful for the study both granulocyte responses in the clinical and the experimental settings.

## 1 – INTRODUÇÃO

Nossa sobrevivência em um ambiente repleto de microorganismos seria precária, não fosse o fato de termos vários mecanismos de defesa contra estes agentes. Os microorganismos têm alta capacidade de reprodução e representam um desafio para o corpo humano, que constitui um ambiente rico em recursos para que possam viver e se reproduzir. Mais ainda, por meio de mutações ou de seleção natural, estes seres são capazes de se adaptar aos ambientes mais hostis. Face a estas ameaças, o nosso e outros organismos empregam múltiplos mecanismos de defesa que se acumularam ao longo de milhares de anos de evolução de vertebrados e invertebrados (FAITLOWICZ, 1993).

Os mecanismos de defesa contra estes microagressores enquadram-se de uma maneira geral em duas categorias: mecanismos de imunidade inata, que compreendem componentes menos específicos, e mecanismos de imunidade adaptativa, que envolvem componentes de maior especificidade. Os mecanismos envolvidos na resposta imune inata compreendem quatro barreiras de defesa: física, fisiológica, inflamatória e fagocítica (GOLDSBY et al., 2003). As barreiras físicas atuam prevenindo a entrada de microorganismos no organismo. Estas barreiras compreendem a pele, os revestimentos epiteliais dos tratos respiratório, gastrointestinal e urogenital, assim como a presença de muco, enzimas, alterações de pH e flora bacteriana normal que, além de competir pelos nutrientes e pela fixação das bactérias patogênicas ao epitélio, pode produzir substâncias antibacterianas (PARHAM, 2001). As barreiras fisiológicas compreendem a manutenção da temperatura corporal, pH gástrico e uma série de mediadores químicos e moléculas

solúveis do sistema do complemento que podem atuar tanto através da lise de microorganismos como facilitando o processo de fagocitose (GOLDSBY et al., 2003).

Uma vez rompidas estas barreiras iniciais, os microorganismos penetram no tecido e replicam-se ativando os mecanismos de imunidade inata que desenvolvem um processo inflamatório no local infectado, envolvendo vários eventos vasculares e celulares (MACKAI; FRED; ROSEN, 2000; RANG; DALE; RITTER, 2001).

A reação inflamatória possui uma fase inicial com várias alterações vasculares, que apresenta uma dilatação inicial dos vasos sangüíneos e aumento do fluxo sangüíneo seguido pelo aumento da permeabilidade vascular e exudação de líquido, facilitando a migração celular para o tecido afetado (RANG; DALE; RITTER, 2001; SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004). Estes eventos da resposta inflamatória são iniciados por uma série de mediadores químicos que podem ser produzidos pelos microorganismos invasores, liberados das células danificadas pelo dano tecidual, gerados por enzimas plasmáticas ou ainda produzidos pelos leucócitos que participam da resposta inflamatória (GOLDSBY et al., 2003). Estes mediadores incluem componentes de quatro cascatas enzimáticas: sistema complemento, sistema de coagulação, fibrinolítico e das cininas que contribuem para a eliminação dos microorganismos invasores (RANG; DALE; RITTER, 2001).

Uma vez que os fagócitos (neutrófilos, eosinófilos e monócitos) encontram-se no sítio inflamatório atraídos em resposta a moléculas quimiotáticas, desenvolvem-se ali uma série de eventos bioquímicos (eventos celulares), tais como estimulação do sistema do complemento, fagocitose e a destruição de microorganismos (MACKAI; FRED; ROSEN, 2000; FAITLOWICZ, 1993). No entanto, este conjunto de eventos iniciais que formam a resposta imune inata, nem sempre é suficiente para conter a infecção. Quando esta resposta imune é insuficiente, a imunidade

adaptativa é ativada e a eficácia da resposta inata é aumentada, e diferente desta última, é capaz de produzir uma resposta extremamente específica contra os microorganismos (PARHAM, 2001). Este fato se deve principalmente a capacidade de produção de anticorpos específicos para cada tipo de antígeno com a ativação de linfócitos B, como também a capacidade de ativar linfócitos T. Estes linfócitos possuem importantes funções efetoras, que contribuem para a eliminação dos microorganismos (CALICH & VAZ, 2001). Os mecanismos de defesa imune inata envolvem a fagocitose e a conseqüente destruição dos microorganismos. Neste processo de defesa, os neutrófilos desempenham papel crucial (revisto em LIU et al., 2000). Para exercer este papel, os neutrófilos que estão no sangue periférico precisam ser inicialmente mobilizados ao local infectado através de agentes quimiotáticos. Uma vez atraídos por estes agentes, os neutrófilos (e demais granulócitos) aderem ao endotélio vascular, migram através da parede dos vasos sangüíneos atingindo os tecidos afetados, onde é iniciado o processo de fagocitose e morte celular (EEDEN et al, 1999).

O processo de fagocitose inicia-se com a fase de adesão da partícula ao fagócito, que emite pseudópodos ao redor da partícula. Os pseudópodos fundem-se formando uma câmara fechada envolvendo a partícula. Na seqüência, observa-se uma invaginação da câmara para o interior da cavidade citoplasmática e conseqüente liberação da membrana celular para formar um vacúolo fagocítico livre (fagossoma) no interior do citoplasma. O fagossoma, contendo o microorganismo recentemente capturado se funde com a membrana de lisossomas e grânulos citoplasmáticos (EL-MALLEM & FLETCHER, 1979; BORREGARD & COWLAND, 1997). Os lisossomas contêm lisozimas, esterases, peroxidases (mieloperoxidase) e fosfatases ácidas. Os grânulos secundários também fundem-se com o fagossoma e

outras enzimas e proteínas, como a lactoferrina são liberadas no interior do fagossoma (LORENZI, 1992; BORREGARD & COWLAND, 1997). Esta bateria de enzimas e proteínas liberadas dos grânulos citoplasmáticos iniciam a digestão dos microorganismos. Um segundo mecanismo exterminador, consiste na lesão oxidativa ocasionada pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas pelos fagócitos durante a explosão respiratória (ER) que atua concomitantemente com as enzimas na destruição dos microorganismos (Figura 1; ELBIN & GOUGEROT-POCIDALO, 1996). A ER recebe esta designação porque quando os fagócitos são ativados, iniciam um processo metabólico, que leva à um extraordinário aumento do consumo de oxigênio por estas células (FAITLOWICZ, 1993; KARLSSON & DAHLGREN, 1999).

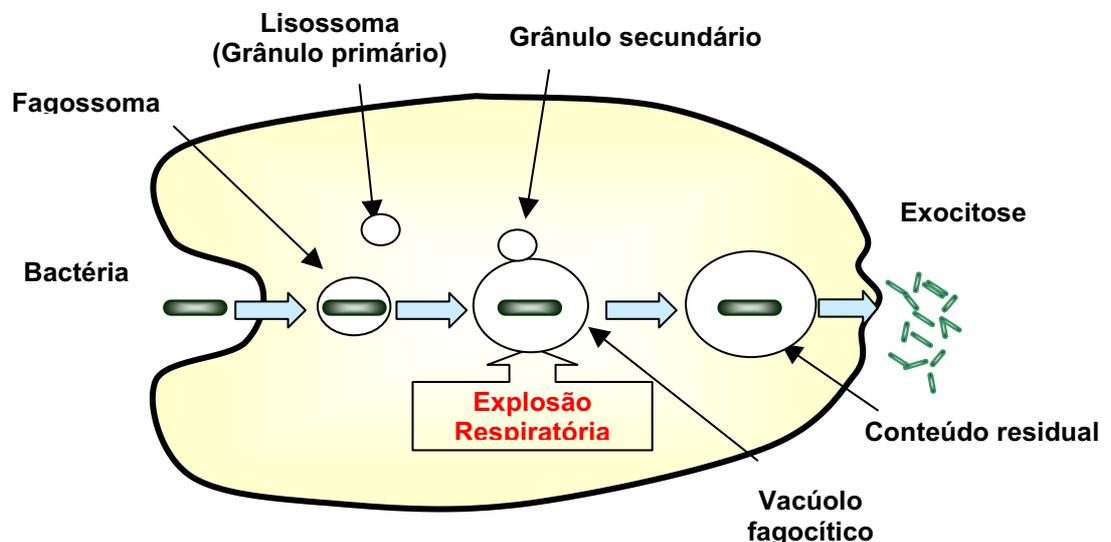


Figura 1- Fagocitose e destruição bacteriana. Modificada de HOFFBRAND et al., 2001.

A explosão respiratória é dependente da ativação da enzima NADPH-oxidase (revisado em BABIOR, 1999). A NADPH-oxidase em sua forma inativa é composta por

várias subunidades distribuídas no citosol; membrana plasmática e membrana de grânulos citoplasmáticos. A ativação da NADPH-oxidase requer o deslocamento de seus componentes que se apresentam distribuídos entre compartimentos celulares distintos, o que garante que a oxidase esteja inativa nas células em repouso (não estimuladas). A NADPH-oxidase ativa é composta por várias subunidades protéicas: p40<sup>PHOX</sup>, p47<sup>PHOX</sup>, p67<sup>PHOX</sup>, p22<sup>PHOX</sup>, gp91<sup>PHOX</sup> e citocromo b<sub>558</sub>. Três destas subunidades, a p40<sup>PHOX</sup>, a p47<sup>PHOX</sup> e a p67<sup>PHOX</sup> estão presentes no citosol como um complexo. Os outros componentes, estão localizados na membrana plasmática (aproximadamente 5%) e na membrana de grânulos intracelulares (aproximadamente 95%), onde elas aparecem como uma flavoproteína conhecida como citocromo b<sub>558</sub> (KARLSSON & DAHLGREN, 1999). A ativação requer a participação não somente destas subunidades, mas também de duas outras proteínas de baixo peso molecular ligantes de nucleotídeos de guanina, a Rac2, que em células em repouso está localizada no citoplasma e Rap1A, que está presente na membrana. Em resposta ao estímulo celular, o componente citosólico p47<sup>PHOX</sup> é fosforilado e o complexo citosólico inteiro migra para a membrana, aonde é associado com o citocromo b<sub>558</sub> para montar a forma ativa da NADPH-oxidase. A Rac2 liga-se a GTP (trifosfato de guanosina) e migra para a membrana com o complexo citosólico central enquanto a Rap1A é co-purificada com o citocromo (BABIOR, 1999). A NADPH-oxidase ativada é agora capaz de transferir elétrons e catalisar a redução do oxigênio molecular com gasto de NADPH. Quando a fagocitose ocorre, a membrana plasmática é internalizada como a parede do fagossoma, onde a membrana agora fica sendo a face interna desta vesícula fagocítica. Com esta localização, a enzima gera o superóxido, o primeiro produto da explosão respiratória, dentro do fagossoma. A fusão da membrana do fagossoma

com a membrana plasmática resulta também na liberação de superóxido no meio extracelular (KARLSSON & DAHLGREN, 1999; BABIOR, 2000).

Inúmeras EROs de elevada toxicidade são produzidas durante a explosão respiratória, entre elas o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical hidroxila ( $^{\bullet}OH$ ) e ácido hipocloroso ( $HOCl^{\cdot}$ ) (BABIOR, 2000). A maior parte do  $O_2^{\bullet-}$  produzido é dismutado em  $H_2O_2$ , de forma espontânea ou dismutado pela enzima superóxido dismutase (SOD; revisto em CONDLIFFE; KITCHEN; CHILVERS, 1998). Em contraste, o  $H_2O_2$  é estável e consegue acumular-se no interior do fagossoma. A partir do  $H_2O_2$  podem ser geradas inúmeras EROs bactericidas especialmente através da ação da mieloperoxidase (MPO; HAMPTON; KETTLE; WITERBOURN, 1998). A mieloperoxidase é uma peroxidase clássica, considerada a mais importante enzima respiratória dos neutrófilos, encontrada em grandes concentrações nas granulações primárias destas células (MACKAY; FRED, ROSEN, 2000). Esta enzima catalisa várias reações oxidativas, mas a de maior importância é aquela entre o  $H_2O_2$  e íons cloreto ( $Cl^-$ ) formando o  $HOCl^{\cdot}$ , um potente agente oxidante. O  $HOCl^{\cdot}$  é considerado o maior oxidante bactericida produzido pelos neutrófilos (FAITLOWICZ, 1993). Este agente oxidante pode reagir com o  $H_2O_2$  para produzir o oxigênio *singlet* ( $^1O_2$ ), estado excitado do oxigênio, cuja ação é ainda pouco investigada (HAMPTON; KETTLE; WITERBOURN, 1998). O  $HOCl^{\cdot}$  também pode reagir com o  $O_2^{\bullet-}$  para produção do radical  $^{\bullet}OH$  (HAUGEN et al., 1999). Este radical é uma espécie extremamente reativa, podendo causar ativação da peroxidação lipídica e modificações no DNA. O radical  $^{\bullet}OH$  também pode ser produzido a partir da reação do  $H_2O_2$  e um metal (ex.  $Fe^{+2} / Fe^{+3}$ ), (HAMPTON; KETTLE; WITERBOURN, 1998; Figura 2).

Outra via que vem ganhando relevância como efetora da atividade dos fagócitos é a via de produção do óxido nítrico ( $\text{NO}^*$ ), capaz de gerar espécies reativas do nitrogênio (ERNs; CONDLIFFE; KITCHEN; CHILVERS, 1998). O  $\text{NO}^*$  é produto do metabolismo da L-arginina por enzimas chamadas de NO sintases. Apesar de quimicamente simples, o NO pode afetar a transcrição de genes e, quando em altas doses, tem efeito citotóxico sobre bactérias, parasitas e células tumorais, possuindo papel central em processos inflamatórios e doenças infecciosas (EISERICH et al., 1998). Parte da toxicidade do NO é devido à sua capacidade de reação com oxigênio molecular. Esta reação desencadeia a formação de várias espécies reativas altamente oxidantes como o dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2$ ), ácidos nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) e nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) em equilíbrio com os respectivos ânion nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). A alta toxicidade do NO também pode ser atribuída a sua rápida reação com ânion superóxido, gerando o ânion peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), um potente oxidante capaz de causar peroxidação de lipídeos, reagir com metais e ser citotóxico para bactérias (POSSEL et al., 1997; Figura 2).

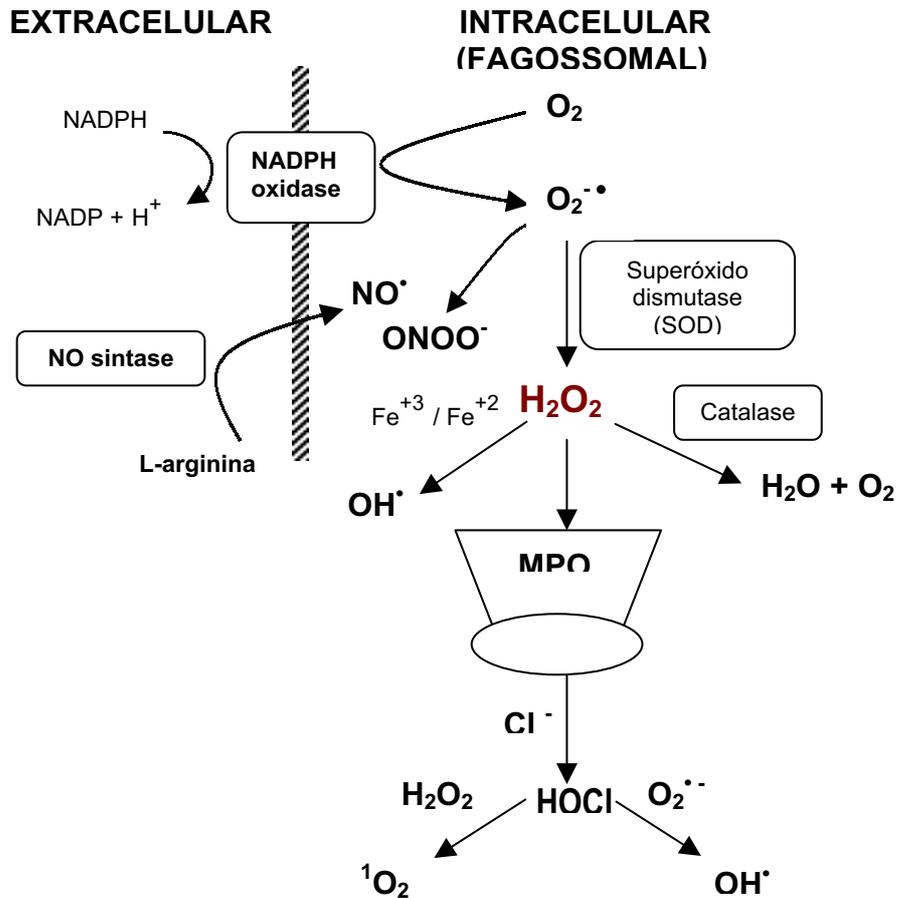


Figura 2 - Produção de EROs e de ERNs durante a explosão respiratória em granulócitos. Adaptada de HAMPTON; KETTLE e WITERBOURN, 1998.

A produção de EROs e ERNs através da explosão respiratória desempenha um papel crítico não só na atividade bactericida, como também na fungicida, além de potencializar a reação inflamatória (ELBIM & GOURGEROT-POCIDALO, 1996).

As EROs produzidas por neutrófilos ativados podem difundir-se além da célula produtora e lesar as células de tecidos próximos. Para limitar o possível dano tecidual, a ER é controlada por enzimas que inativam essas potentes moléculas oxidantes. Dentre elas, destacam-se a superóxido dismutase (SOD) que converte o ânion superóxido em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a catalase que degrada o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água e oxigênio (DEVI et al., 2000).

Além de microorganismos, como fungos e bactérias, outros estímulos como partículas de zymosan, partículas de látex, N-formil-metionil-leucil-fenilalanil (fMLP), ionóforos, ésteres de forbol, interleucina-8 (IL-8), fator de ativação plaquetária (PAF), fator C5a do sistema complemento, interleucina-1 (IL-1), leucotrieno B4, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) são capazes de ativar os fagócitos e desencadear o processo de ER (EEDEN et al, 1999). Existem vários mecanismos envolvidos na estimulação de ER incluindo, a dependência de cálcio, a fosforilação de proteínas e a reorganização do citoesqueleto. Estes mecanismos podem variar de acordo com o tipo de estímulo que induz a ER (KARLSSON & DALGREN, 2002; NAUSSEF et al, 1991; SCHOPF et al., 1984). Outro ponto que pode variar na indução da ER é a dependência da ativação de receptores de membranas por diferentes estímulos. Por exemplo, vários investigadores demonstram a atuação independente da ligação com receptores de ésteres de forbol (tipo PMA) e dos ionóforos (TREVES et al., 1987; AL-MOHANNA; PETTIT; HALLETT, 1997). Por outro lado, a estimulação com fMLP atua através da ligação com receptores de superfície (SKLAR et al., 1985). Assim, o estudo comparativo envolvendo diferentes estímulos na tentativa de descobrir as diferentes vias de sinalização celular envolvidas na ativação dos fagócitos é área ativa de investigação. Porém, a ativação dos fagócitos para indução da explosão respiratória é dependente da ativação da enzima NADPH-oxidase independentemente do tipo de estímulo utilizado (BABIOR, 2000). A importância da NADPH-oxidase na geração da ER fica clara em pacientes portadores de doença granulomatosa crônica (DGC). Os pacientes portadores desta doença, sofrem inúmeros processos infecciosos muitas vezes letais, decorrentes de defeitos em subunidades protéicas do sistema NADPH oxidase (p22<sup>PHOX</sup>, p47<sup>PHOX</sup> ou p67<sup>PHOX</sup>), que impedem a ocorrência do processo de ER (TORRES & COATES, 1999). Passos

importantes na ativação da NADPH-oxidase são a fosforilação da p47<sup>PHOX</sup> (especialmente pela PKC) e a subsequente translocação do p47<sup>PHOX</sup> e do p67<sup>PHOX</sup> para a membrana plasmática (que parece depender do citoesqueleto) (NAUSEEF et al., 1991).

As diferentes atividades do citoesqueleto dependem de três diferentes tipos de filamentos protéicos, a saber, filamentos de actina (microfilamentos), filamentos de tubulina (microtúbulos) e filamentos intermediários (ALBERTS et al., 2002). Os microfilamentos se localizam logo abaixo da membrana celular (região cortical) e os microtúbulos estão em maior número junto ao centríolo, próximo ao núcleo da célula. A actina pode se apresentar em duas formas, actina monomérica globular (G-actina) e filamentos poliméricos de actina (F-actina) (TORRES & COATES, 1999). Durante a ativação celular com estímulos como fMLP, C5a, zymosan opsonizado, IgG (imunoglobulina tipo G) e LPS (lipopolissacarídeo bacteriano), a actina-G polimeriza para actina-F que se acumula na região cortical da célula (PACKMAN & LICHTMAN, 1990). A montagem da actina no citoesqueleto é uma das primeiras e mais sensíveis respostas funcionais dos neutrófilos. Eventos do citoesqueleto perto da superfície da célula podem regular respostas funcionais como adesão e deformabilidade, além de fornecer força mecânica para a mobilidade dos neutrófilos, fagocitose, trânsito de grânulos e geração de superóxido (TORRES & COATES, 1999). Além da actina existem outras proteínas nas células que modulam o alongamento dos microfilamentos de actina, como a profilina, a acumentina e a gelsolina (LORENZI, 1992).

Por sua vez, a ação destas e de várias outras proteínas depende da concentração iônica do cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ). Assim, o  $\text{Ca}^{+2}$  é considerado um importante regulador da função das proteínas presentes na região cortical dos neutrófilos. Por

exemplo, quando a concentração do  $\text{Ca}^{+2}$  é alta, microfilamentos tendem a alongar-se, enquanto que quando a concentração é reduzida, esses filamentos desagregam-se (LORENZI, 1992; EEDEN et al, 1999). À custa dessas modificações no tamanho e também pela localização dos filamentos de actina junto a membrana, a célula locomove-se em direção ao agente invasor e o fagocita (LORENZI, 1992). Defeitos nos microfilamentos de actina vêm sendo vinculados ao aumento da susceptibilidade a processos infecciosos mostrados em crianças, bem como em pacientes com queimaduras ou com síndrome mielodisplásica (EEDEN et al, 1999).

Outro aspecto importante em relação a transdução do sinal de ativação da ER é aquele que envolve a participação de quinases. Por exemplo, inibidores não-seletivos da proteína quinase tipo C (PKC), tais como a estaurosporina, K252a ou calfostina C, foram capazes de reduzir a produção de superóxido em neutrófilos humanos estimulados com PMA ou zymosan (LEVY et al., 1994). Outro estudo mostra que um inibidor seletivo da PKC bloqueia a produção de ânion superóxido induzida pelo PMA (HAZAN et al., 1997).

O estudo destes mecanismos é de grande importância, uma vez que inúmeras complicações envolvendo um aumento na susceptibilidade a processos infecciosos foram documentadas (MACKAI; FRED; ROSEN, 2000; GARFIA; GARCÍA-RUIZ; SOLÍS-HERRUZO, 2004; ELBIM & GOUGEROT-POCIDALO, 1996). Um aumento descontrolado na produção de EROs é considerado um componente importante na patogênese de diversas doenças, como na angústia respiratória aguda, lesão de isquemia/reperfusão, artrite reumatóide e aterosclerose (MACKAI; FRED; ROSEN, 2000). Entretanto, além dos problemas decorrentes de uma ER descontrolada, uma deficiência na produção de EROs durante este processo também tem sido evidenciada. Este fato tem sido considerado em pacientes com

cirrose hepática (GARFIA; GARCÍA-RUIZ; SOLÍS-HERRUZO, 2004) e portadores da síndrome de imunodeficiência adquirida (HIV; ELBIM & GOUGEROT-POCIDALO, 1996).

Sabendo que a presença de processos infecciosos é considerada a principal causa de morte e maior fonte de morbidade e mortalidade em pacientes com leucemias agudas (POWELL et al., 1986), alguns autores vêm estudando a possível causa desta imunodeficiência nestes pacientes. EL-MALLEM & FLETCHER, (1979), mostraram que neutrófilos de pacientes com leucemia mielóide crônica (LMC), com conteúdo normal de mieloperoxidase, são pouco eficientes na sua capacidade de eliminação de microorganismos invasores tipo *Candida guilliermondii*. Assim, sugeriu-se que este defeito possa estar relacionado à falhas na degranulação do conteúdo de peroxidases dos grânulos primários ou devido a defeitos na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Outro estudo, ainda, mostra que vários outros fatores podem estar envolvidos no estado de imunodeficiência destes pacientes que apresentam múltiplas infecções, que se estabelecem com a evolução progressiva da doença não tratada. Menciona-se a redução no número e/ou na função de linfócitos e neutrófilos como indutores da imunodeficiência destes pacientes. Vários fatores podem estar relacionados com este estado, como por exemplo, a produção de citocinas imunossupressoras, e a invasão de órgãos imunocompetentes, como a medula óssea e linfonodos por uma proliferação descontrolada de células comprometidas pela leucemia (ELBIM & GOUGEROT-POCIDALO, 1996). Além disso, desordens na fagocitose e metabolismo oxidativo também são mencionadas como possíveis responsáveis pelo aumento da susceptibilidade a processos infecciosos que estes pacientes apresentam (MACKAI; FRED; ROSEN, 2000; GARFIA; GARCÍA-RUIZ; SOLÍS-HERRUZO, 2004).

Segundo a FAB (*French-American-British Cooperative Group*), as leucemias podem ser classificadas quanto ao tecido em que se desenvolvem em linfóides ou mielóides, e quanto ao quadro patológico em agudas ou crônicas (BAIN, 1990). Além disso, vários subtipos de leucemias podem ser definidos pela predominância da população celular leucêmica (linfóide ou mielóide) juntamente com uma variedade de características morfológicas, histoquímicas, imunofenotípicas, citogenéticas e moleculares (MILLER & GRODMAN, 1998). De acordo com estas características, a leucemia linfóide pode ser classificada em três subtipos: L1, L2 e L3, enquanto a leucemia mielóide é classificada em sete subtipos: M1 à M7 (LORENZI, 1992). As leucemias crônicas são caracterizadas pela proliferação celular acelerada, porém mantendo sua capacidade de diferenciação e maturação celular, podendo desenvolver-se vagarosamente durante períodos que variam entre 10 a 20 anos (HOFFBRAND & PETTI, 2001). As leucemias agudas em contraste, caracterizam-se pela alta capacidade de proliferação e deficiente capacidade de diferenciação celular. Neste caso, o desequilíbrio entre a proliferação e maturação destas células resulta em um rápido acúmulo de células imaturas na medula óssea e no sangue periférico (MILLER & GRODMAN, 1998). A leucemia aguda, quando não tratada, é freqüentemente fatal em um período que varia entre semanas a meses de desenvolvimento da doença (HOFFBRAND & PETTI, 2001).

Os principais sinais clínicos das leucemias agudas decorrem do acúmulo de células jovens anormais na medula óssea prejudicando ou impedindo a produção dos eritrócitos, plaquetas e leucócitos. Acredita-se que em decorrência disso, os pacientes apresentam anemia, hemorragias e múltiplas infecções, que se estabelecem com a evolução progressiva da doença (MILLER & GRODMAN, 1998).

As infecções que acometem estes pacientes leucêmicos são freqüentemente de origem bacteriana (p.ex. bacilos gram-negativos) acometendo particularmente a pele, faringe e região perianal (BARACAT; FERNANDES; SILVA, 2000). Infecções virais (especialmente herpéticas), fúngicas ou por protozoários também são freqüentes, e podem tornar-se generalizadas (HOFFBRAND & PETTI, 2001). Estudos mostram que até 23% do tempo de internação dos pacientes portadores de leucemias agudas são gastos com o tratamento de infecções (BODEY; RODRIGUEZ; CHANG, 1978). Estes fatos ressaltam a importância da integridade dos mecanismos de defesa do organismo contra processos infecciosos que são freqüentes não só nas leucemias agudas, mas em vários outros estados patológicos já mencionados, devido à presença de anormalidades durante o desenrolar dos múltiplos mecanismos de defesa do organismo (MACKAI; FRED; ROSEN, 2000).

Como já mencionado, muitos são os estudos que vem avaliando a ER de granulócitos polimorfonucleares (PMN) (DUSI et al., 1996; ELBIM & GOURGEROT-POCIDALO, 1996; KARLSSON & DAHLGREN, 1999; LIU et al., 2000). No entanto, este processo é bastante complexo, uma vez que envolve uma variedade bastante grande de enzimas e espécies reativas que podem interferir na eliminação ou prevenção do processo infeccioso. Este estudo é especialmente importante em pacientes portadores de leucemias agudas, uma vez que estes freqüentemente apresentam um estado de imunodeficiência grave, acompanhado de quadros infecciosos recorrentes. Neste aspecto, Powell et al. (1996) sugerem que este estado de imunodeficiência se deve a severa neutropenia decorrente do tratamento quimioterápico que permite a aquisição de infecções que podem ser muitas vezes fatais. Este fato é reforçado com a observação de Hoffbrand e Petti (2001) que

demonstram a recuperação das infecções após o retorno da mielopoiese (recuperação neutrofílica) depois do tratamento quimioterápico.

Diante do exposto, fica clara a necessidade de avaliação destes aspectos da resposta imune inata, assim como a padronização de ensaios que permitam a medida da produção destas espécies reativas. Para isso a citometria de fluxo em conjunto com a utilização de sondas moleculares como a diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) tem se apresentado como uma excelente ferramenta. Este método permite o estudo da ER em fagócitos, sendo estas células avaliadas como células individuais (LEHMANN; SORNES; HALSTENSEN, 2000). Esta técnica também se diferencia das demais, especialmente por permitir a identificação e quantificação de subpopulações de PMN mesmo quando a contagem de leucócitos total for baixa no sangue periférico, o que permite que os testes sejam realizados com pequeno volume de amostra (EEDEN et al, 1999).

Apesar de vários trabalhos iniciais utilizarem a oxidação da DCFH para avaliação da produção de peróxido de hidrogênio, alguns autores recentemente sugerem que esta sonda também pode ser oxidada por outras espécies reativas, tais como o  $\text{NO}^\bullet$  e o  $\text{ONOO}^-$  (POSSEL et al., 1997; HAUGEN et al., 1999; IMIRICH & KOBZIK, 1997). Para melhor elucidação das atividades neutrofílicas em pacientes portadores de leucemias agudas, POWELL e colaboradores (1986) avaliaram a ER através da oxidação da sonda DCFH estimulada por PMA em PMN individuais através da técnica de citometria de fluxo. Este estudo demonstrou que existem subpopulações de granulócitos que quando estimuladas, podem responder normalmente, serem hipoativas (possuir atividade oxidativa abaixo do normal) ou hiperativas (possuir resposta oxidativa acima do normal). Todos os pacientes com aumento da resposta oxidativa dos PMN sobreviveram. Em contraste, apenas 1%

dos pacientes que demonstraram redução da resposta oxidativa (hipoatividade) sobreviveu (POWELL et al., 1986).

Portanto, o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e padronização da técnica de citometria de fluxo através da oxidação da DCFH para avaliar a capacidade de produção de EROs, em particular  $H_2O_2$ , durante a indução da ER em granulócitos normais e de pacientes com leucemias agudas. Estes resultados podem vir a contribuir para a avaliação prognóstica e auxiliar o tratamento profilático dos pacientes mencionados, uma vez que a profilaxia é freqüentemente realizada com antibióticos independentemente da presença de processos infecciosos. Além do que, o tratamento quimioterápico é considerado de alta agressividade, e geralmente diminui muito o número de células de defesa (granulócitos), tornando os pacientes ainda mais susceptíveis ao desenvolvimento dos processos infecciosos.

Diante do exposto, fica clara a importância de estudar o processo de ER em pacientes portadores de leucemias agudas para melhorar a qualidade de vida destes pacientes. Além disto, estabelecer padrões de normalidade para auxiliar o entendimento das vias de sinalização celular envolvidas na ER, contribuindo desta forma no esclarecimento das deficiências presentes nestes mecanismos de defesa, que são responsáveis pelo desenvolvimento de processos infecciosos que muitas vezes comprometem a vida humana.

## **2 - OBJETIVOS**

### **2.1 – Objetivo geral**

– Comparar a explosão respiratória induzida por éster de forbol e zymosan em granulócitos de indivíduos saudáveis e de pacientes portadores de leucemias agudas.

### **2.2 – Objetivos específicos**

- Padronizar o teste de oxidação da diclorofluoresceína por citometria de fluxo durante a explosão respiratória em granulócitos estimulados com éster de forbol e zymosan;
- Estudar a transdução de sinal em granulócitos de indivíduos saudáveis avaliando a participação do  $Ca^{+2}$  extracelular e da proteína quinase C durante a explosão respiratória induzida por éster de forbol e zymosan;
- Avaliar o envolvimento do citoesqueleto de granulócitos de indivíduos saudáveis durante a explosão respiratória induzida por éster de forbol e zymosan;
- Relacionar a ocorrência do processo fagocítico com a explosão respiratória em granulócitos normais estimulados com o estímulo particulado, zymosan;
- Selecionar o melhor estímulo (zymosan ou PMA) da explosão respiratória para a instalação de rotinas laboratoriais auxiliares no acompanhamento prognóstico e tratamento profilático dos pacientes portadores de leucemias agudas.

### **3 - MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 - Compostos e reagentes**

Os seguintes compostos e reagentes foram utilizados neste estudo: 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), acetato miristato de forbol (PMA), colchicina, citocalasina D, zymosan, azul de trypan, dextrana (peso molecular 250 kDa), bisindoilmaleimida I (BIM I). Estes foram obtidos junto a Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA). A Heparina (5000 UI/mL) foi gentilmente doada pelo Laboratório Cristália do Brasil (São Paulo, SP) e o Taxol (Paclitaxel; 6 mM), foi obtido dos Laboratórios Parke-Davis do Brasil (São Paulo, SP). Os demais sais e reagentes foram obtidos das melhores fontes comerciais disponíveis.

#### **3.2 - Seleção e obtenção das amostras de sangue**

Para a realização deste estudo foram utilizadas 83 amostras de sangue de indivíduos saudáveis (doadores de sangue) e 12 amostras de pacientes leucêmicos. Todas as amostras foram fornecidas pelo Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado de Santa Catarina (HEMOSC).

As amostras de indivíduos saudáveis de 20 a 50 anos de idade de ambos os sexos foram obtidas após a doação voluntária de sangue ao HEMOSC. Foram coletados 10 mL de sangue total por venopunção em tubos contendo heparina (5 UI/mL) como anticoagulante após consentimento prévio dos doadores. As amostras foram submetidas à realização de exames sorológicos para detecção de sífilis, hepatites B e C, vírus T-linfotrópicos humanos tipo I (HTLV-I) e tipo II (HTLV-II), e

doença de Chagas. Foram selecionadas somente amostras que apresentaram resultados negativos para estes testes. Outros critérios de exclusão foram presença de infecções e uso de medicamentos. Estas informações obtidas dos indivíduos saudáveis não foram confirmadas por exames clínicos.

Dos pacientes leucêmicos, foram obtidas amostras de cerca de 5-10 mL de sangue que constituíam sobras das amostras retiradas para o diagnóstico, acompanhamento do quadro clínico, ou doação voluntária. As amostras de pacientes leucêmicos foram coletadas e selecionadas de acordo com o tipo de leucemia aguda (mielóide ou linfóide). Não houve tentativa de padronizar os subtipos de leucemias, nem características mais detalhadas sobre a forma de tratamento a que eles estavam sendo submetidos.

A pesquisa foi esclarecida aos doadores de sangue e pacientes com o auxílio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido exigido e aprovado (Processo número 212/2002) pelo Comitê de Ética em Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

### **3.3 - Lise dos eritrócitos**

A lise dos eritrócitos foi realizada para evitar possíveis interferências ocasionadas pela hemoglobina na oxidação do DCFH-DA (OHASHI et al., 2002) e para impedir que a contaminação eritrocitária prejudicasse o reconhecimento das subpopulações celulares pelo citômetro de fluxo (VUORTE et al., 2001). A amostra de sangue foi aliquoteada em 5 tubos contendo 500 µL de sangue total por tubo. A cada tubo foram adicionados 4 mL de solução de lise mantida a 4°C. As amostras foram homogeneizadas por inversão e deixadas em repouso durante 10 minutos à

temperatura ambiente, sendo então centrifugadas a 400 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense em 4 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) mantida a 4°C. As amostras foram centrifugadas novamente a 400 x g por 10 minutos e em seguida foram lavadas com PBS. O sedimento foi ressuspense em solução balanceada de sais de Hank (HBSS) mantida a 4°C. A suspensão celular foi centrifugada novamente a 400 x g por 10 minutos, e ressuspensa em 1 mL de HBSS. As amostras dos 5 tubos foram misturadas em um único tubo, formando uma suspensão celular única. A suspensão celular foi homogeneizada e uma alíquota desta foi diluída em líquido de Türk (1:20) para a contagem do número total de leucócitos presentes na amostra. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer, e em seguida a concentração destas células foi ajustada para  $3 \times 10^6$  leucócitos/mL com HBSS.

#### **3.4 - Obtenção de leucócitos por sedimentação com dextrana**

Dois mililitros de dextrana 1% (v/v) foram adicionados a 8 mL de sangue. As amostras foram homogeneizadas por inversão e mantidas em repouso, inclinadas em um ângulo de aproximadamente 45° em temperatura ambiente por 45 minutos para a sedimentação dos eritrócitos. Após este período, foi possível visualizar nitidamente a separação das células sanguíneas em duas camadas. Os eritrócitos se apresentaram na camada inferior e o plasma rico em leucócitos na camada superior da suspensão celular. O plasma rico em leucócitos foi aspirado cuidadosamente, transferido para outro tubo e centrifugado a 400 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspense em 2 mL de HBSS. Em seguida, uma alíquota desta suspensão celular foi diluída (1:20) em

líquido de Türk para contagem do número total de leucócitos. A contagem destas células foi realizada em câmara de Neubauer, e em seguida a concentração foi ajustada de modo a conter  $3 \times 10^6$  leucócitos/mL com HBSS.

### **3.5 – Medida da explosão respiratória em granulócitos**

#### **3.5.1 - Princípio do ensaio**

O princípio do ensaio baseia-se na introdução da sonda não-fluorescente 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) no interior das células, provendo um substrato oxidável (DCFH). O DCFH-DA é um composto estável não-fluorescente lipofílico que facilmente atravessa a membrana das células. Dentro da célula, enzimas citosólicas (esterases) desacetilam o DCFH-DA para formar a 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH) a qual, devido a sua polaridade, fica confinada no citoplasma. Espécies reativas de oxigênio geradas durante a explosão respiratória oxidam o DCFH formando a 2',7'-diclorofluoresceína oxidada (DCFoxi), que possui fluorescência verde, com emissão em 510-530 nm. A fluorescência verde produzida pela formação de DCFoxi é proporcional à capacidade oxidativa da célula. Desta forma a intensidade da fluorescência intracelular se torna uma medida dos metabólitos oxidativos produzidos pelas células, em particular  $H_2O_2$  (Figura 3; BASS et al., 1983).

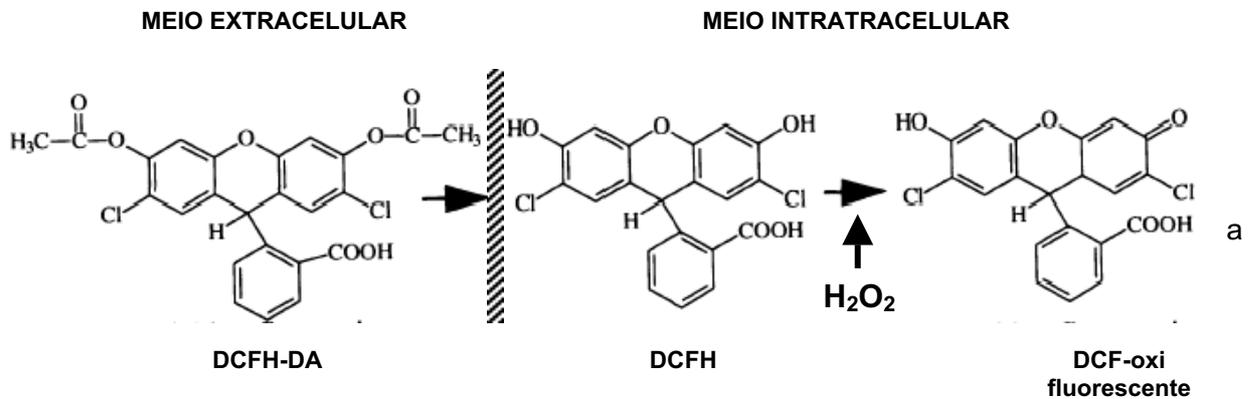


Figura 3. Princípio do ensaio de oxidação da DCFH, que pode ser oxidada pelo  $H_2O_2$  ao DCFoxi fluorescente (Adaptada de ROBINSON, 1998).

### 3.5.2 – Incorporação do DCFH-DA

Para a incorporação da DCFH-DA no interior das células, 5  $\mu\text{L}$  (concentração final 100  $\mu\text{M}$ ) da solução estoque foram adicionadas a alíquotas de 500  $\mu\text{L}$  contendo  $3 \times 10^6$  leucócitos/mL, que foram incubadas durante 15 minutos a  $37^\circ\text{C}$  no escuro. Ao término deste período, uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  da suspensão celular foi retirada e diluída em HBSS (500  $\mu\text{L}$ ) para servir como controle negativo. O controle permitiu o ajuste dos eventos negativos e demarcação da área no registro do citômetro em que os granulócitos concentram-se para a posterior leitura da amostra no citômetro de fluxo (Figura.6).

### 3.5.3 - Estimulação dos granulócitos

Uma vez que a explosão respiratória pode ser ativada por uma variedade de estímulos solúveis e particulados para a produção de espécies reativas de oxigênio, avaliamos a resposta dos granulócitos a um estímulo fluido (PMA) e um estímulo particulado (zymosan). O PMA é um conhecido indutor da explosão respiratória em granulócitos e foi utilizado inicialmente para medida da máxima excitação das células e padronização do método. Em seguida, partículas de zymosan (parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*), foram testadas como estímulo nas mesmas condições em que o PMA foi avaliado para a verificação da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na ER de granulócitos diante de possíveis alterações que pudessem ser ocasionadas pela fagocitose destas partículas.

Para a realização desta avaliação, após a leitura do controle negativo na ausência de estímulo (tubo 1), uma alíquota da suspensão celular contendo  $3 \times 10^6$  leucócitos/mL (tubo 2) foi estimulada com PMA (na concentração final de 160 nM) e outra alíquota (tubo 3) foi estimulada com zymosan (5 partículas para cada célula). A suspensão celular foi incubada com PMA ou zymosan em diferentes períodos de tempo (15, 30 e 45 minutos). Nestes pontos, alíquotas de 100 µL foram retiradas dos tubos e diluídas em solução de HBSS (500 µL) para a leitura no citômetro de fluxo no filtro de fluorescência verde (FL1). Quando do uso de zymosan como estímulo, foi necessária a adição de 5% (v/v) de plasma contendo mínima quantidade de plaquetas à suspensão celular antes da adição do estímulo. Este plasma foi obtido com a centrifugação de aproximadamente 500 µL de sangue autólogo  $480 \times g$  durante 10 minutos. A adição do plasma visou garantir a opsonização do zymosan para facilitar a fagocitose por parte dos granulócitos.

### 3.5.4 Medida da intensidade de fluorescência

–

A intensidade de fluorescência foi medida através de citômetro de fluxo (FACScalibur – Becton Dickinson, São Paulo, SP) equipado com laser de argônio de 15 mW resfriado a ar e operando em 488 nm. O uso deste equipamento foi gentilmente autorizado pelo Laboratório de Marcadores Celulares do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado de Santa Catarina (HEMOSC).

Uma vez que leucócitos possuem tamanhos e densidades de organelas bem distintas, a população dos granulócitos a ser estudada foi demarcada manualmente de acordo com os parâmetros de granulosidade (SSC) e tamanho (FSC). Após a demarcação da área de aquisição dos granulócitos, o detector de dispersão dianteira (FSC) foi ajustado em E00. O detector de dispersão lateral (SSC) foi ajustado através da visualização do histograma de cada amostra para que o controle negativo permitisse a visualização das respostas positivas que foram representadas em escala logarítmica. Além destes parâmetros, foi estabelecido como critério para a aquisição das amostras o número de eventos (partículas e células). Foi estabelecida a contagem de 10.000 eventos por tubo na área demarcada (área em que os granulócitos se apresentam). Assim, a média de intensidade de fluorescência relativa produzida durante a explosão respiratória pela oxidação do DCFH foi coletada através do filtro de fluorescência verde (FL1).

### **3.6 – Avaliação morfológica dos granulócitos estimulados**

Ao mesmo tempo em que foi separada uma alíquota de células estimuladas para a medida da intensidade de fluorescência, também foi separada uma segunda alíquota para a análise morfológica das células através de um microscópio óptico equipado com câmara fotográfica (Nikon Eclipse E400, São Paulo, SP). Após a estimulação das células com PMA ou zymosan (ou sem estímulo, no caso dos controles negativos), foram produzidos citocentrifugados (realizado com uma centrífuga *Cytospin*) das células. Em cada citocentrifugado foram utilizados 200  $\mu\text{L}$  de uma suspensão celular contendo  $1,5 \times 10^6$  células/mL e 100  $\mu\text{L}$  de plasma. As lâminas foram subseqüentemente coradas pelo método de May-Grünwald-Giemsa. A observação das lâminas permitiu que a fagocitose das partículas de zymosan pelos granulócitos fosse visualizada.

### **3.7 - Avaliação da viabilidade celular**

Este teste foi realizado com o objetivo de determinar a porcentagem de células viáveis na suspensão celular após a realização dos experimentos e verificar a toxicidade dos reagentes e drogas utilizadas. A avaliação da viabilidade celular foi realizada com a utilização do corante de exclusão Azul de Trypan que permite verificar a integridade da membrana celular. Cinquenta microlitros da suspensão celular foram misturados a 5  $\mu\text{L}$  do corante. Esta suspensão permaneceu incubada com o corante por um período de 3 a 5 minutos. Aproximadamente 10  $\mu\text{L}$  das células expostas ao corante foram observadas em câmara de Neubauer em microscópio óptico. As células viáveis apresentaram-se refringentes, enquanto as

células inviáveis permitiram a passagem do corante através da membrana celular, corando-se em azul (MISHELL & SHIIGI, 1980). A determinação da porcentagem de células viáveis foi calculada com a fórmula:

$$\text{Porcentagem de células viáveis} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células viáveis (não coradas)}}{\text{n}^\circ \text{ de células viáveis} + \text{n}^\circ \text{ de células inviáveis}} \times 100$$

### **3.8 - Participação do Ca<sup>2+</sup> na explosão respiratória dos granulócitos**

Com o objetivo de avaliar a participação do cálcio durante o processo de explosão respiratória dos granulócitos foi utilizado o EGTA (ácido N,N,N',N'etilenoglicol-*bis* ( $\beta$ -aminoetil) tetraacético) nas concentrações de 1 e 2,5 mM. O EGTA é um quelante de cálcio extracelular. Para a realização desta medida, após a incorporação do DCFH-DA, o EGTA foi adicionado à suspensão celular 2 minutos antes da adição dos estímulos, PMA ou zymosan. No final deste período, uma alíquota de cada tubo foi diluída em HBSS e lida imediatamente no citômetro de fluxo, como descrito anteriormente.

### **3.9 – Participação do citoesqueleto na explosão respiratória dos granulócitos**

Para avaliar a participação do citoesqueleto durante o processo de explosão respiratória, as células foram incubadas com diferentes compostos interferentes do citoesqueleto antes da ativação dos granulócitos com PMA ou zymosan. Os compostos usados foram citocalasina D (0,1; 1 e 10  $\mu$ M), um agente despolimerizante de microfilamentos, a colchicina (3; 10 e 30  $\mu$ M) e o taxol (30 e 100  $\mu$ M), estes últimos agentes despolimerizantes de microtúbulos. Os compostos foram adicionados à suspensão celular junto com o DCFH-DA, e permaneceram durante

30 minutos a 37°C antes da ativação das células. Após este período, PMA (tubo 1) ou zymosan (tubo 2) foram adicionados às células e novamente incubados a 37°C por mais 30 minutos. No final deste período, uma alíquota de cada tubo foi diluída em HBSS e lidas imediatamente no citômetro de fluxo, como descrito anteriormente.

### **3.10 - Participação da proteína quinase C na explosão respiratória dos granulócitos**

Para avaliar o envolvimento da proteína quinase C no mecanismo de sinalização celular de granulócitos durante a ER, as células foram tratadas com BIM I, um inibidor seletivo de proteína quinase C. O BIM I foi incubado com a suspensão celular junto com o DCFH-DA durante 30 minutos antes da ativação dos granulócitos com os diferentes estímulos (PMA e zymosan). Após este período, PMA (tubo 1) ou zymosan (tubo 2) foram adicionados à suspensão celular e novamente incubados a 37°C por mais 30 minutos. No final deste período, uma alíquota de cada tubo foi diluída em HBSS e lidas imediatamente no citômetro de fluxo, como descrito anteriormente.

### **3.11 - Preparo das soluções**

#### **3.11.1 - Compostos**

Para preparo da solução estoque, o DCFH-DA foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) para gerar uma solução de 10 mM e estocado em alíquotas de 50 µL à -20°C. A solução estoque de PMA (160 µM) foi preparada em PBS estéril e estocada à -20°C em alíquotas de 50 µL. Citocalasina D foi dissolvida em DMSO para gerar uma a solução estoque de 10 mM e armazenada em alíquotas à -20°C. Antes da

realização dos experimentos, esta solução foi diluída em PBS. O BIM I foi dissolvido em DMSO, para gerar a solução estoque de 5 mM e estocado à -20°C. Esta solução foi diluída em PBS imediatamente antes da realização dos experimentos. A colchicina foi dissolvida em PBS para originar a solução estoque de 2,5 mM e armazenada à -20°C. Finalmente, a solução estoque de EGTA a 50 mM foi diluída em PBS antes da realização dos experimentos.

### **3.11.2 - Solução de lise**

A solução de lise de eritrócitos foi preparada em nosso laboratório e contém (mM final)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (150 mM),  $\text{NaHCO}_3$  (10 mM) e EDTA dissódico (1 mM). A solução foi diluída em água destilada, esterilizada por filtração e armazenada em geladeira.

### **3.11.3 - Solução balanceada de sais de Hank (HBSS)**

A solução de HBSS (5,4 mM KCl, 0,3 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4,2 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1,3 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,6 mM  $\text{MgSO}_4$ , 137 mM NaCl e 5,6 mM D-glucose), teve o pH ajustado em 7,4, e foi complementada com 15 UI/mL de heparina. A solução foi esterilizada por filtração e armazenada em geladeira.

### **3.11.4 – Solução de dextrana 1% (p/v)**

A solução de dextrana (250 kDa de peso molecular) foi preparada em PBS contendo 15 UI/mL de heparina. Foi esterilizada por filtração e armazenada em geladeira.

### **3.11.5 – Solução salina tamponada com fosfato (PBS)**

Esta solução foi preparada em nosso laboratório e continha (em mM), 137 NaCl; 2,7 KCl e 1,5 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e ajustada para pH 7.4. Foram adicionados 15 UI/mL de heparina, a solução foi esterilizada por filtração e armazenada em geladeira.

### **3.11.6 – Preparo da suspensão de zymosan**

A suspensão de zymosan foi preparada dispersando-se zymosan (Sigma) ou fermento biológico Fleischmann<sup>®</sup> em PBS para uma concentração final de 20 mg/mL. A solução foi autoclavada e armazenada em geladeira. Imediatamente antes do uso, uma alíquota foi lavada 3 vezes com PBS e ressuspensa em PBS. Experimentos preliminares mostraram que não há diferença entre as duas formas de zymosan (dados não mostrados). Nesta concentração, a suspensão de zymosan tem cerca de 10<sup>9</sup> partículas/mL.

### 3.11.7 Líquido de Türk

Uma solução de ácido acético em água destilada (2% v/v) foi preparada e a ela adicionados alguns cristais de azul de metileno para deixá-la com uma coloração azul-piscina suave. A solução foi armazenada em geladeira.

### 3.12 - Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média de intensidade de fluorescência produzida  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de 3-24 diferentes doadores por ponto experimental. Estes dados foram calculados a partir dos histogramas do programa *ProCOUNT* que acompanha o citômetro de fluxo. Para análise estatística foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste *t* de Bonferroni ou o teste *t* de Student não-pareado. Um valor de *p* menor que 0.05 foi considerado estatisticamente significativo.

## **4 – RESULTADOS**

### **4.1 - Efeito de diferentes métodos de eliminação de eritrócitos na avaliação da explosão respiratória em granulócitos normais**

A eliminação dos eritrócitos foi realizada para que fosse possível a visualização da população a ser estudada no citômetro de fluxo e para eliminar possíveis interferências na oxidação do DCFH que pudessem ser ocasionadas pela presença de hemoglobina. Com este objetivo, dois métodos para a eliminação de eritrócitos foram testados. O primeiro método foi realizado com a utilização da solução de cloreto de amônio, capaz de lisar os eritrócitos presentes na amostra. O segundo método foi realizado com a utilização de dextrana, que possibilitou a separação dos eritrócitos da amostra através da sedimentação destas células, enquanto os leucócitos permanecem no sobrenadante.

A avaliação morfológica dos granulócitos obtidos através dos dois métodos revelou que as células foram melhor preservadas no procedimento com dextrana, enquanto que o procedimento de lise alterou a morfologia celular (Figura 5).

Uma vez obtidos, os granulócitos foram estimulados a realizar a explosão respiratória com dois tipos de estímulos. O primeiro, o PMA, é caracterizado como fase fluida, já que ele é capaz de permear a membrana celular. O segundo estímulo, o zymosan, é um estímulo particulado e como tal, tem que ser fagocitado. Os dois estímulos foram comparados em relação aos métodos de obtenção dos leucócitos. A estimulação com PMA (160 nM) provocou um aumento na intensidade de fluorescência, usada como índice da indução da explosão respiratória (ver mais detalhes no Item 3.2). A explosão respiratória induzida por PMA não foi diferente para os dois métodos de eliminação de eritrócitos (Figura 4).

Por outro lado, o zymosan induziu o aumento da explosão respiratória nos leucócitos obtidos pelo método da dextrana, mas falhou em estimular os leucócitos obtidos pelo método de lise, apesar da fagocitose ter ocorrido (Figura 5, Painéis E e F). Portanto, a obtenção de leucócitos livres de hemácias com dextrana foi o método escolhido para ser utilizado no restante deste trabalho.

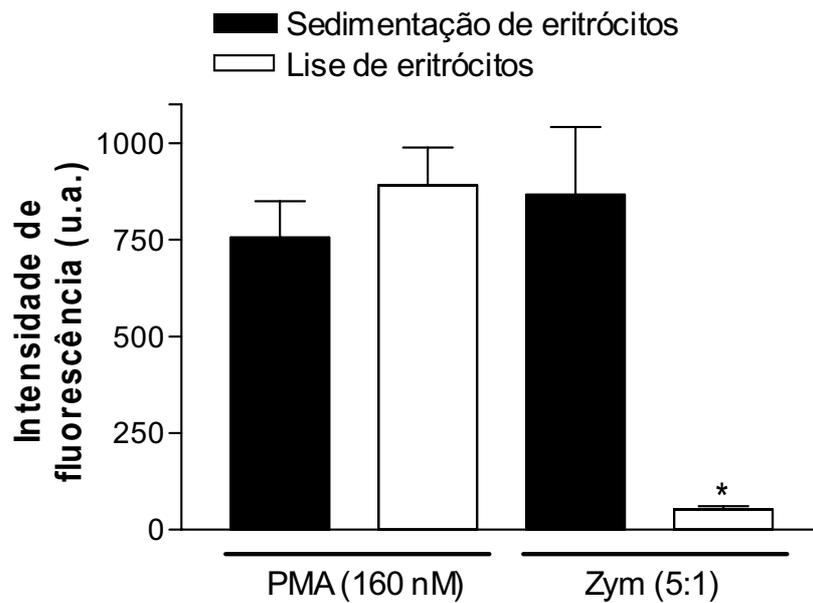


Figura 4 - Efeito de diferentes procedimentos de eliminação de eritrócitos na explosão respiratória de granulócitos ( $3 \times 10^6$  células/mL) estimulados com PMA (160 nM) ou zymosan (5 partículas/célula). Leucócitos obtidos utilizando o procedimento de lise de eritrócitos com cloreto de amônio (barras abertas) ou o procedimento de separação dos eritrócitos com dextrana 1% (barras fechadas) foram ativados e a leitura da fluorescência (em unidades arbitrárias, u.a.) foi feita após 30 minutos à 37°C. Cada barra representa a média  $\pm$  erro padrão da média de 13 a 19 amostras. \* $p < 0.05$  quando comparado ao ponto controle (tempo zero min), ANOVA seguido pelo teste t modificado de Bonferroni.

## **4.2 - Efeitos de diferentes estímulos na explosão respiratória de granulócitos**

A adição de PMA aos leucócitos causou alterações morfológicas visíveis a microscopia óptica, quando comparados a células sem tratamento algum (Figura 5). A adição de zymosan foi acompanhada da rápida ingestão das partículas, facilmente visíveis no interior dos neutrófilos. Embora não tenhamos feito uma quantificação mais rigorosa, cada granulócito ingere uma média de 4-6 partículas e pelo menos 90% destas células fagocitaram o zymosan (Figura 5, Painéis E e F).

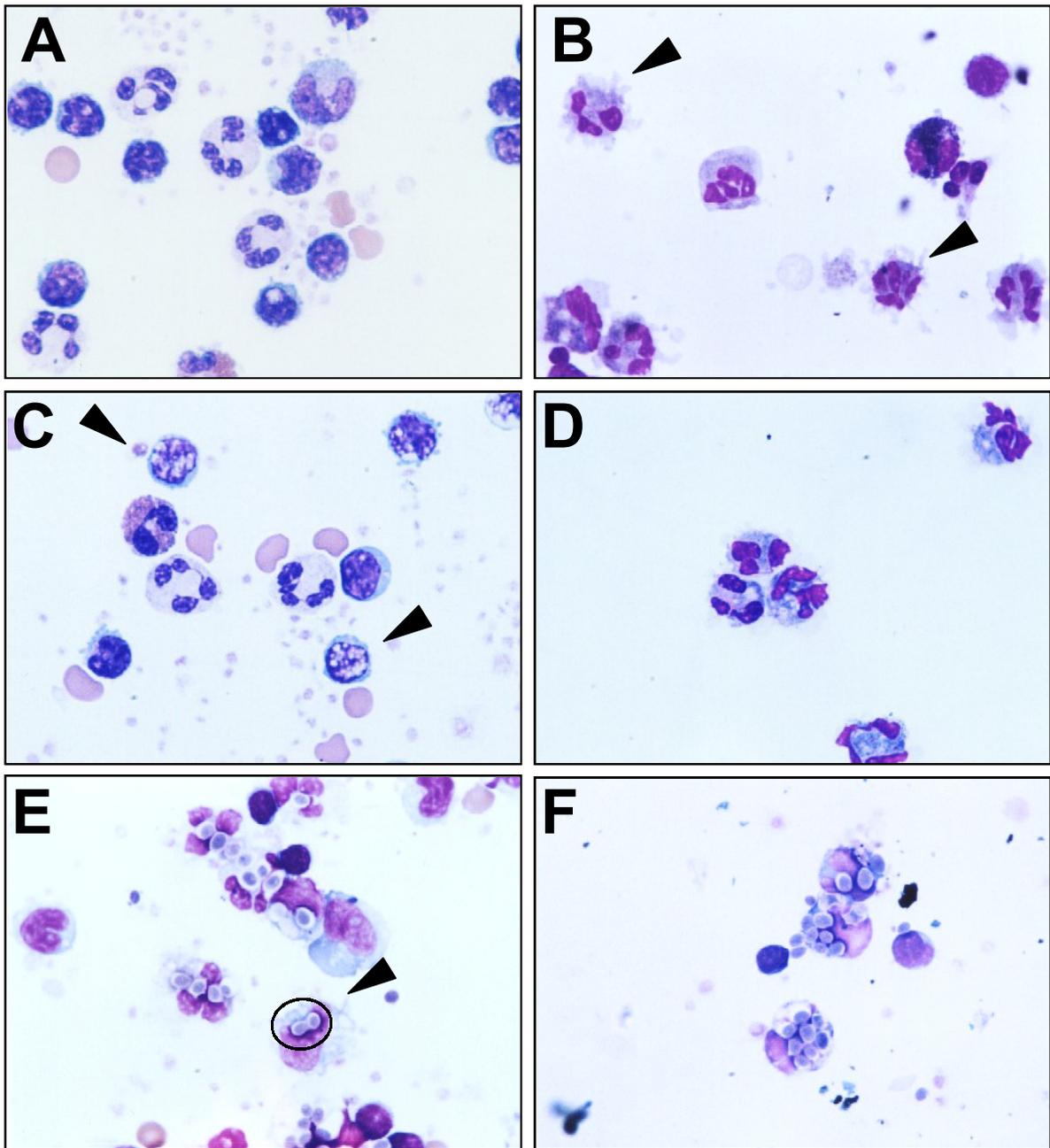


Figura 5 – Morfologia de leucócitos em diferentes situações experimentais. A: células obtidas com sedimentação diferencial com dextrana; B: células obtidas com lise de eritrócitos; C e D: células obtidas com dextrana e incubadas com PMA (160nM) por 30 minutos; E e F: células obtidas com dextrana e incubadas com zymosan (5 partículas/célula) por 30 minutos. As cabeças de setas indicam no Painel B: alterações importantes na morfologia com redução do volume celular, vacuolização e “enrugamento” da membrana; nos Painéis C e D: vacuolização abundante no núcleo e no citosol e células com aparência normal e no Painel E: duas partículas de zymosan no interior de neutrófilos, circundadas pela elipse. Coloração May-Grünwald-Giemsa.

A Figura 6 mostra a caracterização da área correspondente aos granulócitos em um registro típico do citômetro de fluxo, onde pode ser verificado que os granulócitos constituem uma população relativamente bem definida após a remoção dos eritrócitos (área circundada em vermelho).

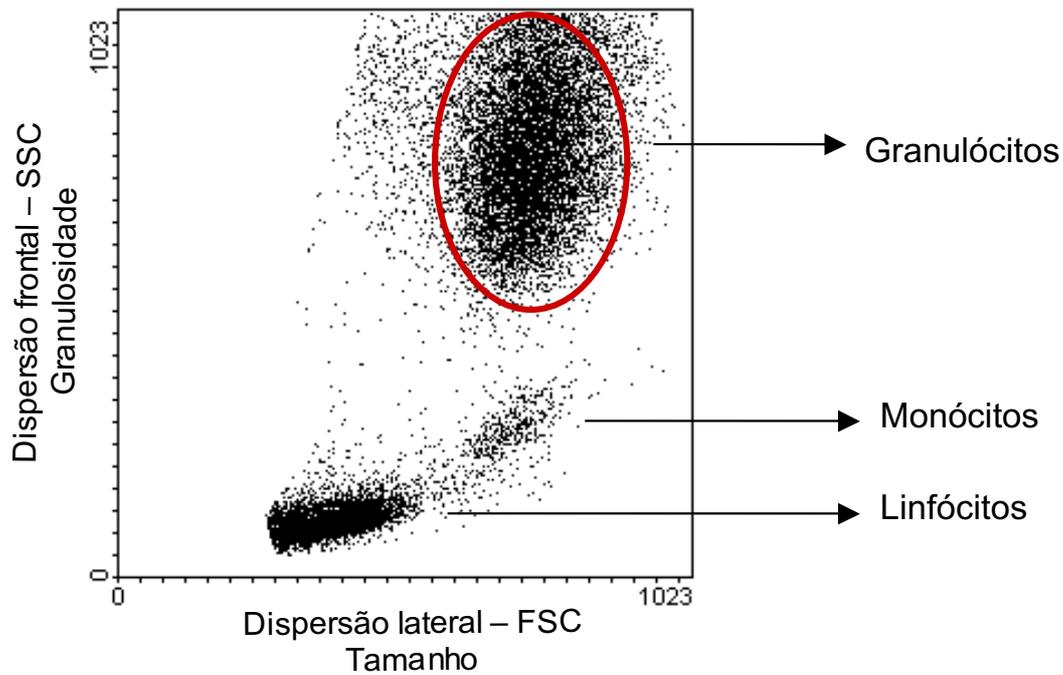


Figura 6 - Registro típico do citômetro de fluxo mostrando os diferentes tipos leucocitários, separados por tamanho e granulosidade. Cada ponto equivale a uma célula. Os granulócitos foram localizados de acordo com os parâmetros de granulosidade e tamanho das células. Os leucócitos foram obtidos pelo método de sedimentação diferencial com dextrana 1%. Na área circundada em vermelho, percebe-se que a população de granulócitos constitui a maioria das células e está bem separada das demais populações celulares. Nos demais experimentos deste trabalho, o equivalente da área em vermelho foi usado para a quantificação da fluorescência.

A Figura 7, Painel A, mostra o histograma de fluorescência dos granulócitos estimulados com PMA. Pode ser nitidamente observado que a fluorescência cresce temporalmente, com deslocamento da curva normal para maior intensidade de fluorescência, com um aumento da ordem de 3 unidades logarítmicas na intensidade de fluorescência.

Quando o estímulo utilizado foi o zymosan, percebe-se um comportamento similar ao PMA mas com algumas diferenças (Figura 7, Painel B). Por exemplo, nota-se uma maior dispersão das curvas de intensidade de fluorescência, indicando que nem todas as células exibem intensidades semelhantes de fluorescência. Isto provavelmente está relacionado ao fato de que o número de partículas sendo fagocitadas não é o mesmo para todas as células.

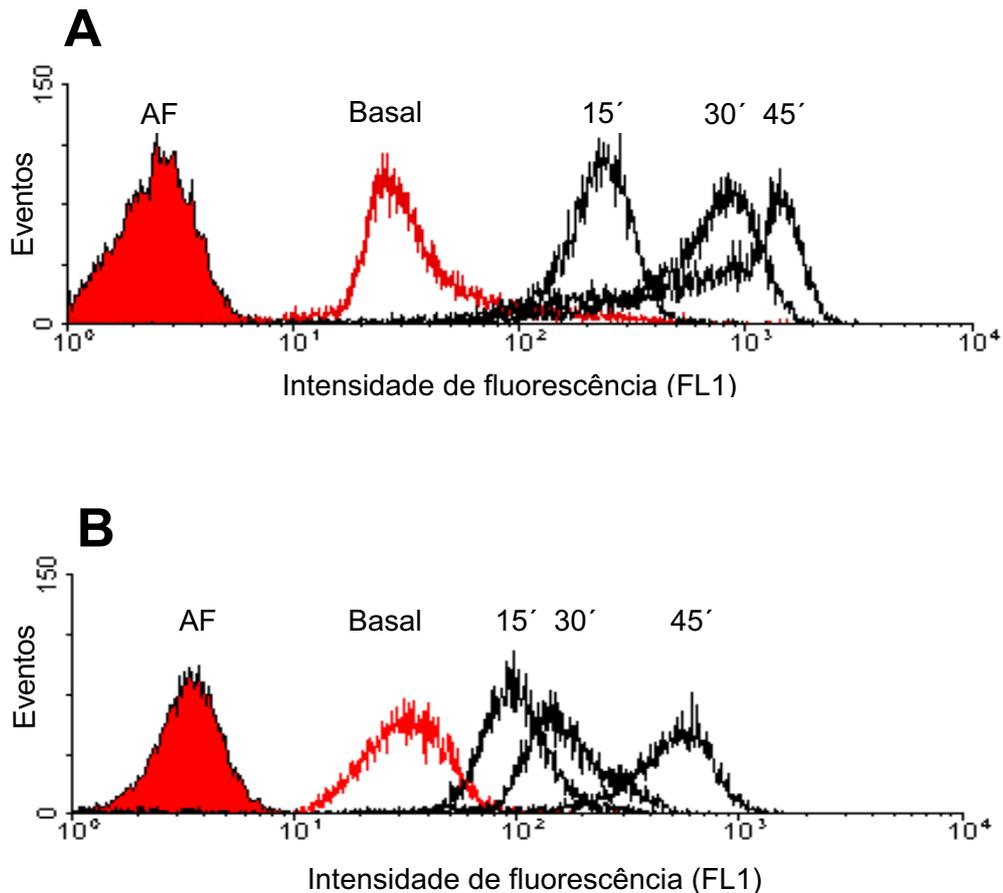


Figura 7 - Histogramas de fluorescência da explosão respiratória de granulócitos estimulados, avaliada pela oxidação do composto fluorescente DCFH. Os leucócitos foram obtidos por sedimentação diferencial de eritrócitos com dextrana 1%, lavados, ressuspensos em HBSS contendo heparina e 5% de plasma autólogo, ajustados para  $3 \times 10^6$  células/mL. Uma alíquota foi avaliada para auto-fluorescência (AF). O restante da suspensão foi incubada com DCFH-DA (como descrito em Métodos) por 15 minutos, uma alíquota desta suspensão foi avaliada para fluorescência (basal) das células não estimuladas. Ao restante da suspensão foi adicionado PMA (160 nM; Painel A) ou zymosan (5 partículas/célula; Painel B) e alíquotas foram medidas nos tempos de 15, 30 e 45 minutos após a adição dos estímulos. Observar que a fluorescência final é cerca de 2-3 ordens de grandeza superior aos valores basais.

#### **4.2.1 - Curva temporal da explosão respiratória de granulócitos frente a diferentes estímulos**

Como pode ser visto na Figura 8, Painel A, a adição de PMA (160 nM) aos granulócitos obtidos pelo método da dextrana, induziu um aumento tempo-dependente na intensidade de fluorescência produzida pela oxidação da DCFH pelo  $H_2O_2$  produzido, usado como índice de indução da explosão respiratória. A intensidade de fluorescência atingiu valor máximo ao redor de 30 minutos após estimulação e permaneceu constante pelos próximos 15 minutos. Embora não mostrada, a intensidade de fluorescência decai lentamente em períodos de tempo posteriores. A resposta obtida com a estimulação dos granulócitos com zymosan atingiu valores de intensidade de fluorescência similares aos vistos com o PMA (Figura 8, Painel B), embora a cinética tenha sido mais lenta. Portanto, este grupo de experimentos mostra que há uma clara dependência temporal da intensidade da fluorescência produzida por estímulos solúveis ou particulados em granulócitos humanos. As diferenças cinéticas devem ser devidas a diferentes mecanismos de sinalização celular envolvidos na indução da explosão respiratória, dependendo do estímulo empregado.

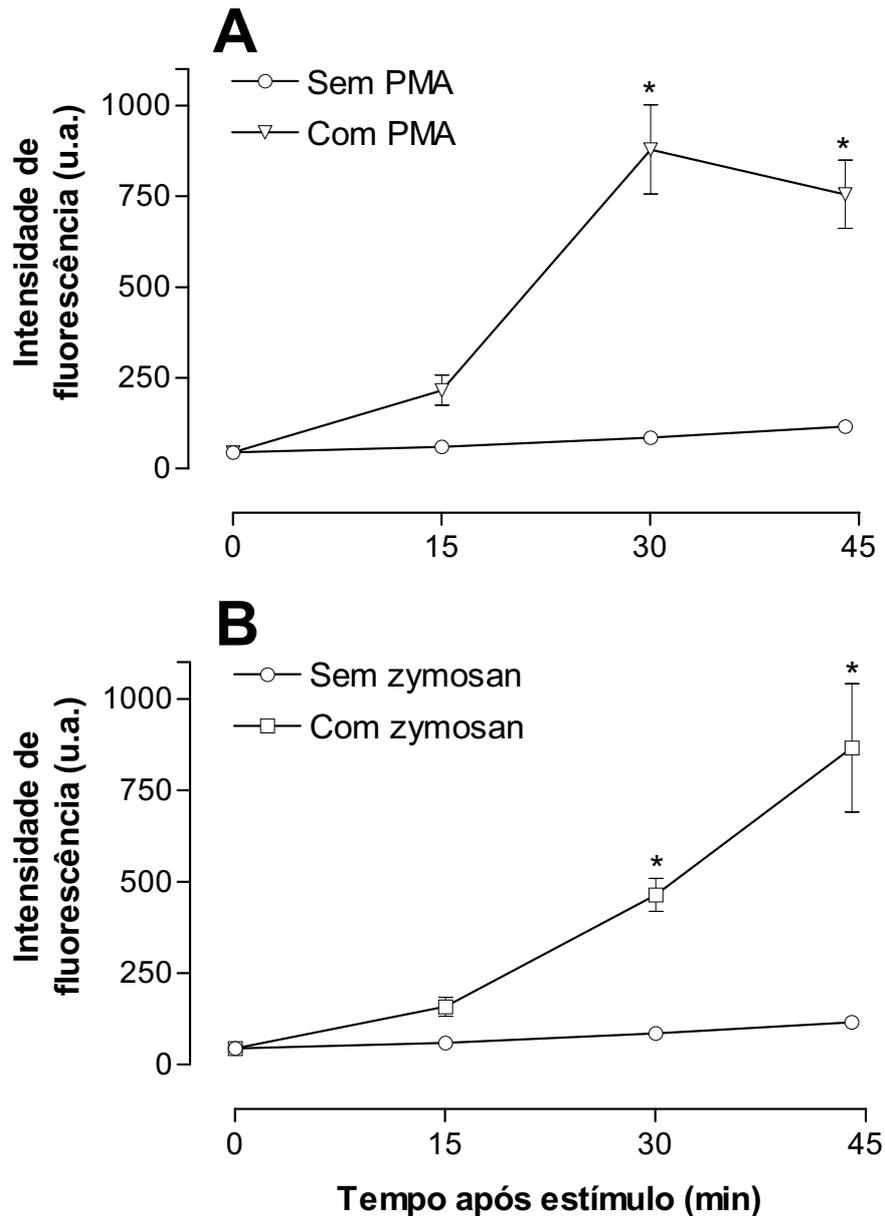


Figura 8 - Curva temporal da explosão respiratória de granulócitos ( $3 \times 10^6$  cél/mL) estimulados com PMA (160 nM; Painel A) ou com zymosan (5 partículas/célula; Painel B). Os granulócitos foram pré-incubados com DCFH-DA (100  $\mu$ M) durante 15 minutos a 37°C (tempo zero), antes da adição dos estímulos. Alíquotas das amostras estimuladas foram retiradas para a leitura da intensidade de fluorescência nos diferentes tempos indicados. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão da média de 8 a 24 doadores saudáveis. \*  $p < 0.05$ , diferença estatisticamente significativa entre amostras estimuladas e não-estimuladas (ANOVA seguida pelo teste t modificado por Bonferroni).

#### **4.2.2 - Influencia do número de partículas de zymosan utilizado para cada leucócito na indução da explosão respiratória**

Como pode ser visto na Figura 9, houve uma nítida dependência entre aumento do número de partículas por leucócito e o aumento da intensidade de fluorescência produzida por estas células. A ativação de granulócitos realizada utilizando uma razão de duas partículas de zymosan para cada célula (2:1) e de cinco partículas de zymosan para cada célula (5:1) mostra que a última condição foi a mais adequada. O aumento do número de partículas/célula além deste ponto não induziu maior valor na intensidade de fluorescência (dados não mostrados) e dificultou a análise dos resultados pelo citômetro de fluxo.

A avaliação da dependência da concentração de PMA na explosão respiratória não foi realizada porque este valor já está bem estabelecido na literatura (BASS et al., 1983; SMITH; WEIDMANN, 1993; VUORTE; JANSSON e REPO, 1996).

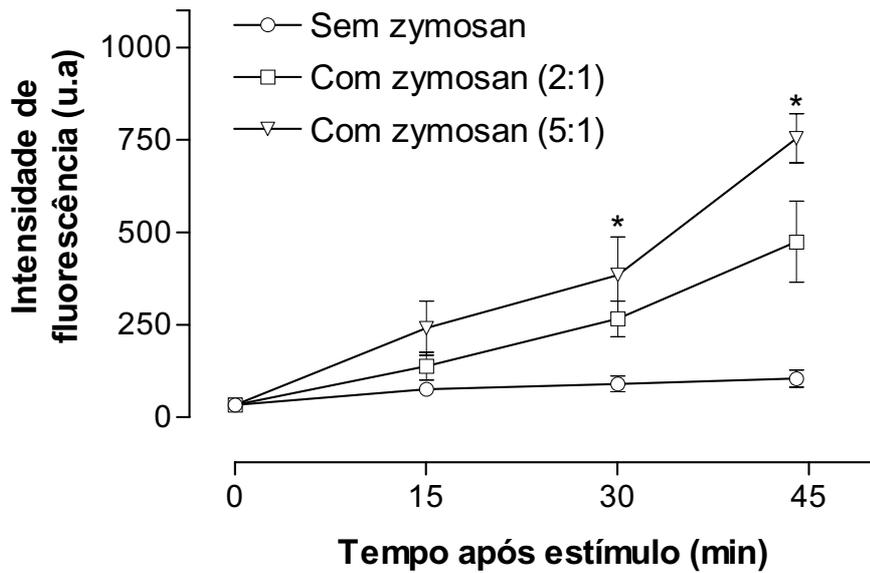


Figura 9 - Explosão respiratória de granulócitos ( $3 \times 10^6$  cél/mL) dependente do tempo de estimulação e número de partículas de zymosan/célula. Os eritrócitos foram eliminados com dextrana e os granulócitos incubados com DCFH-DA durante 15 minutos,  $37^\circ\text{C}$  antes da estimulação. Como estímulo foi utilizada a razão de 2 ou 5 partículas para cada célula. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão da média de 4 a 9 amostras. \* $p < 0.05$  para o grupo estimulado com razão de 2:1 quando comparado com o grupo estimulado com a razão de 5:1 (ANOVA seguida pelo teste t modificado por Bonferroni).

### 4.3 - Participação do $\text{Ca}^{+2}$ extracelular na explosão respiratória

As amostras foram incubadas a 37°C com DCFH-DA durante 15 minutos, e dois minutos antes da adição do estímulo (PMA ou zymosan), foi adicionado EGTA para fornecer concentrações finais de 1,0 ou de 2,5 mM. O EGTA na concentração de 1 mM não alterou a resposta produzida por granulócitos estimulados com PMA (Figura 10, Painel A), nem aqueles estimulados com zymosan (Figura 10, Painel B). No entanto, quando as células foram incubadas com 2,5 mM de EGTA, houve uma grande redução da intensidade de fluorescência nos granulócitos estimulados com zymosan. Por outro lado, o efeito estimulante do PMA pareceu independender da presença de cálcio extracelular.

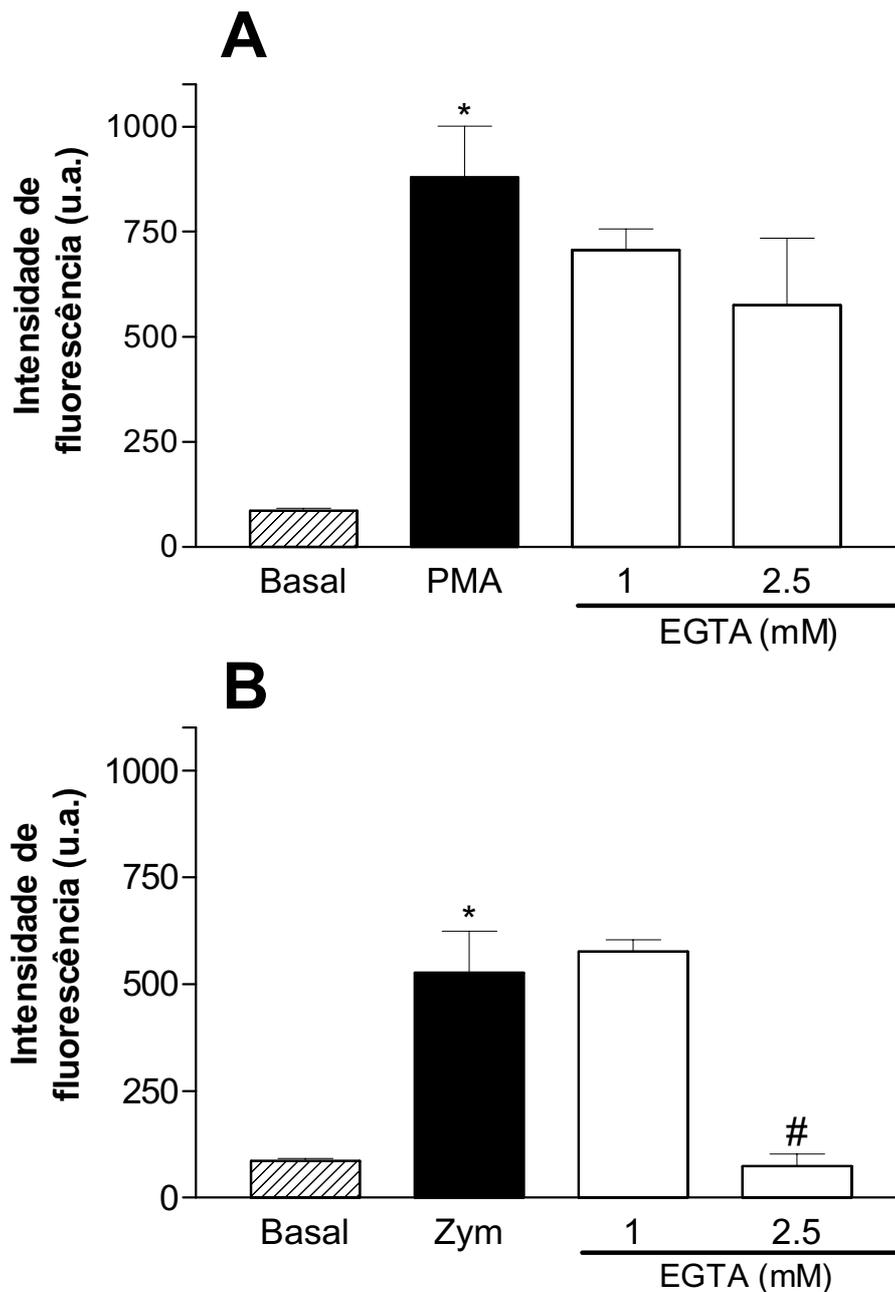


Figura 10 - Efeito do EGTA na intensidade de fluorescência causada por PMA ou zymosan em granulócitos normais. O EGTA foi adicionado nas concentrações indicadas 2 minutos antes da estimulação das células com PMA (160 nM; Painel A) ou com zymosan (5 partículas/célula; Painel B). A intensidade de fluorescência foi avaliada 30 minutos após a estimulação dos granulócitos, a 37°C. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão da média de 3 a 6 amostras. \*  $p < 0.05$ , diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo não estimulado (basal). #  $p < 0.05$ , diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo estimulado (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

#### **4.4 - Avaliação do envolvimento do citoesqueleto na explosão respiratória induzida por PMA ou zymosan em granulócitos normais**

##### **4.4.1 - Participação dos microfilamentos de actina**

Com o objetivo de avaliar a participação dos microfilamentos durante o processo de explosão respiratória em granulócitos, foi utilizado a citocalasina D, um agente despolimerizante da malha de microfilamentos. O tratamento dos granulócitos com citocalasina D nas concentrações de 0,1, 1 e 10  $\mu\text{M}$  causou alterações significativas na explosão respiratória induzida por PMA (Figura 11, Painel A) somente na maior concentração deste agente despolimerizante. Por outro lado, o aumento da intensidade de fluorescência causada por zymosan foi mais sensível a citocalasina, já causando redução significativa na concentração de 1  $\mu\text{M}$  (Figura 11, Painel B). O tratamento com a concentração de 10  $\mu\text{M}$  de Citocalasina D inibiu totalmente a explosão respiratória causada pelo zymosan nos granulócitos.

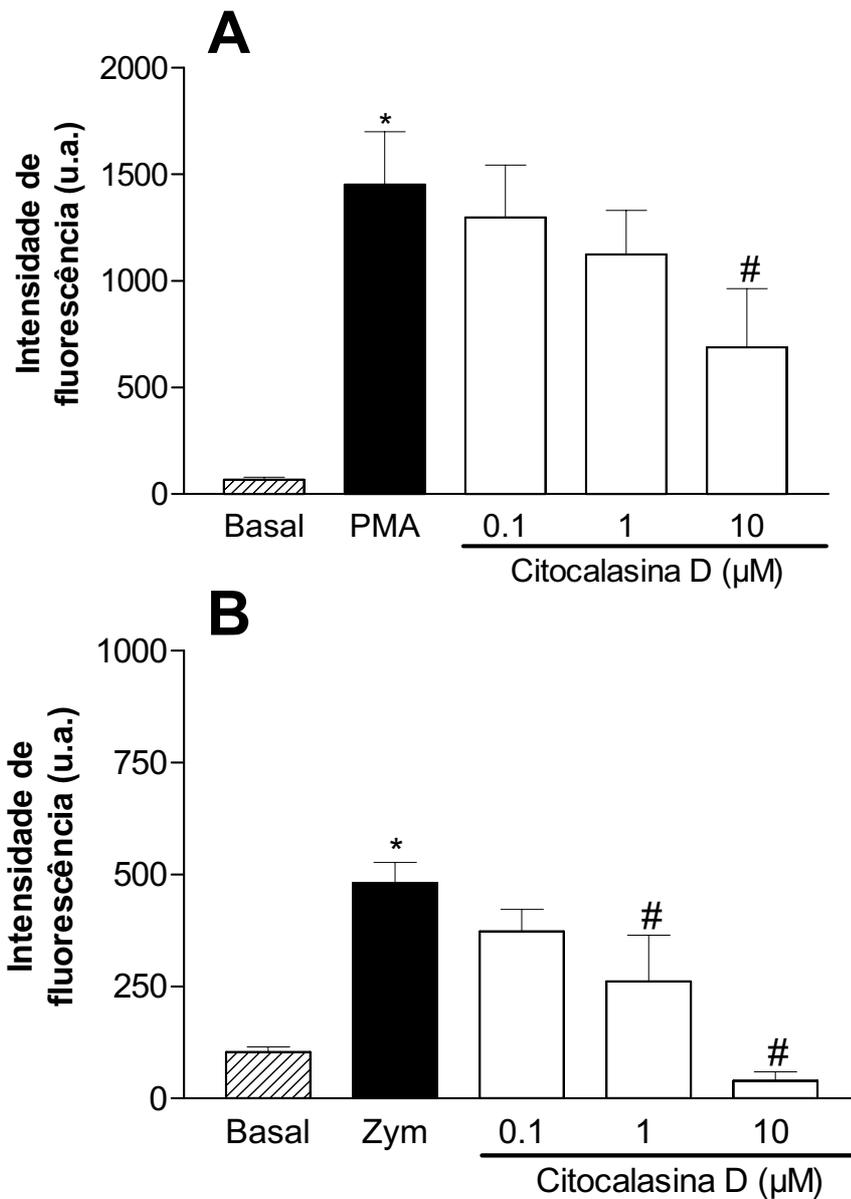


Figura 11 - Efeito da citocalasina D na intensidade de fluorescência produzida pela oxidação do DCFH em granulócitos normais. Citocalasina D foi adicionada juntamente com o DCFH-DA, 30 minutos antes da estimulação das células com PMA (160 nM; Painel A) ou com zymosan (5:1; Painel B). A fluorescência foi medida 30 minutos após a estimulação, a 37°C. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão da média de 3 a 6 amostras. \* $p < 0.05$ , diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo não estimulado (basal). # $p < 0.05$ , diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo estimulado (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

#### 4.4.2 Participação dos microtúbulos

A colchicina (um agente despolimerizante de microtúbulos, 3-30  $\mu\text{M}$ ) não alterou a explosão respiratória induzida seja por PMA ou por zymosan em granulócitos, sugerindo que os microtúbulos não são importantes para a indução da explosão respiratória nestas condições (Figura 12).

Com o objetivo de confirmar este achado, utilizamos outro agente despolimerizante de microtúbulos, o taxol (Figura 13). Como pode ser visto, apenas em concentrações muito elevadas (30 e 100  $\mu\text{M}$ ), pôde ser vista uma interferência na explosão respiratória. Portanto, estes dados confirmam a sugestão de que, caso haja alguma, a importância dos microtúbulos na explosão respiratória é pequena.

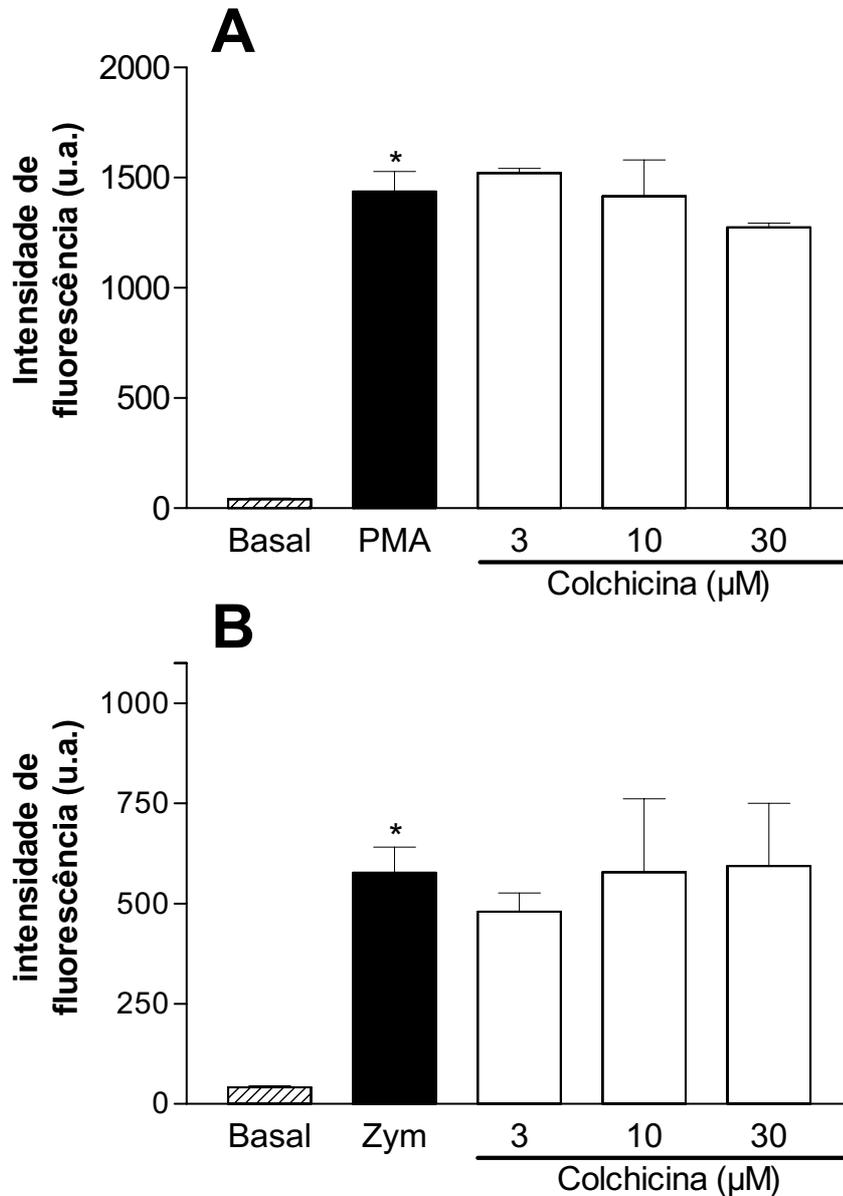


Figura 12 - Efeito da colchicina na intensidade de fluorescência produzida pela oxidação do DCFH em granulócitos normais. A colchicina foi adicionada juntamente com o DCFH-DA, 30 minutos antes da estimulação das células com PMA (160 nM; Painel A) ou com zymosan (5 partículas/célula; Painel B). A fluorescência foi medida 30 minutos após a estimulação, a 37°C. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão da média de 3 a 6 amostras. \* $p < 0.05$ , diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo não estimulado (basal) (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

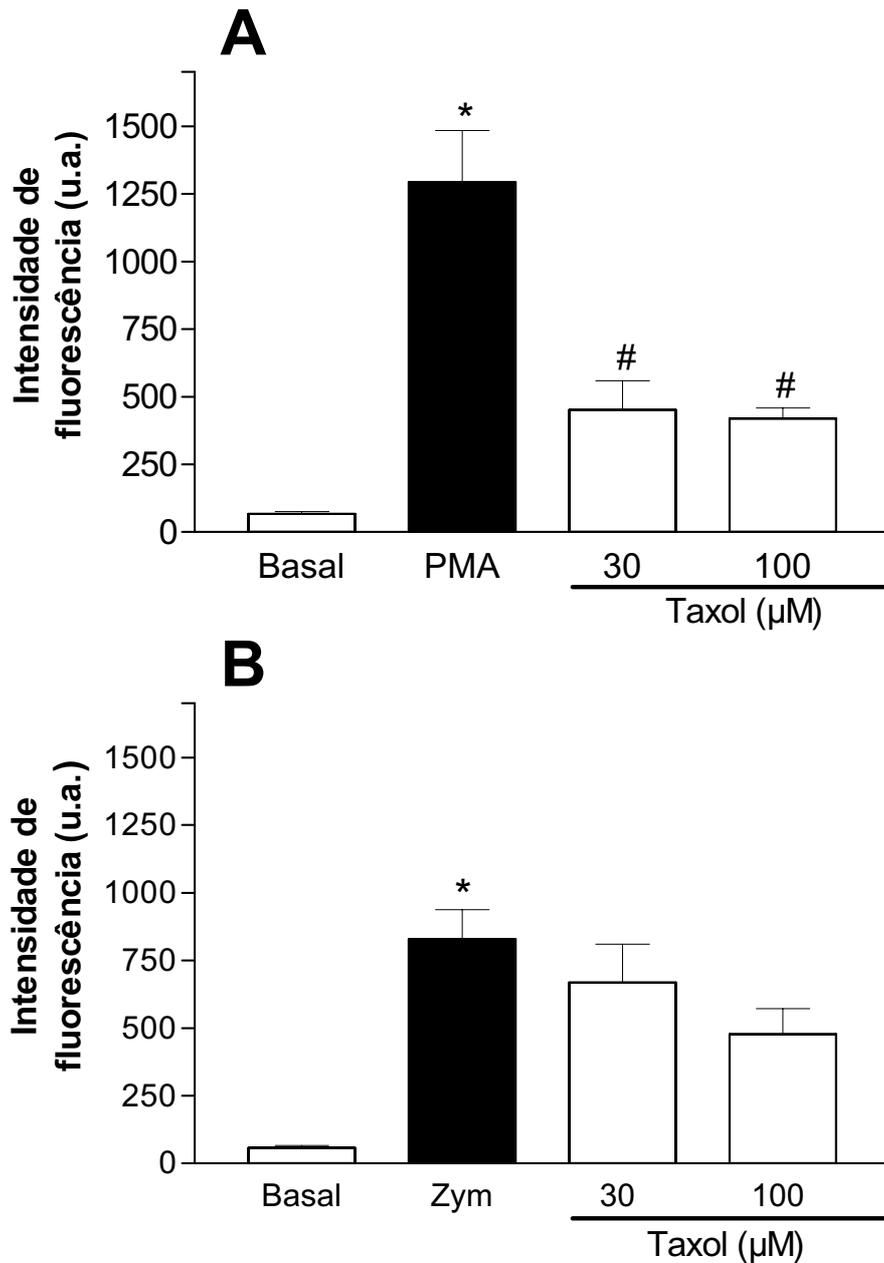


Figura 13 - Efeito do taxol na intensidade de fluorescência produzida pela oxidação do DCFH em granulócitos normais. O taxol foi adicionado juntamente com o DCFH-DA, 30 minutos antes da estimulação das células com PMA (160 nM; Painel A) ou com zymosan (5 partículas/célula ; Painel B). A fluorescência foi medida 30 minutos após a estimulação a 37°C. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão da média de 3 a 6 amostras. \* $p < 0.05$ , diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo não estimulado (basal). # $p < 0.05$ , diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo estimulado (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

#### **4.5 - Avaliação da participação da proteína quinase C em granulócitos normais estimulados com diferentes estímulos**

Está bem descrita na literatura a ativação da proteína quinase C pelo PMA, um análogo do diacilglicerol, que é o ativador endógeno desta classe de quinases. Assim sendo, comparamos o efeito da inibição destas quinases utilizando o BIM I, um inibidor seletivo da PKC, frente aos dois estímulos aqui utilizados. Como pode ser visto na Figura 14, Painel A, a explosão respiratória promovida pelo PMA foi efetivamente inibida por concentrações da ordem de 500 e 5000 nM de BIM I, coincidentes com a  $IC_{50}$  esperada para este inibidor (CABANI et al., 1996). Por outro lado este inibidor, na mesma faixa de concentração foi completamente ineficaz em alterar a explosão causada pelo zymosan (Figura 14, Painel B), indicando que pelo menos a classe de proteínas quinases C não parece estar envolvida na sinalização da explosão respiratória promovida por este estímulo.

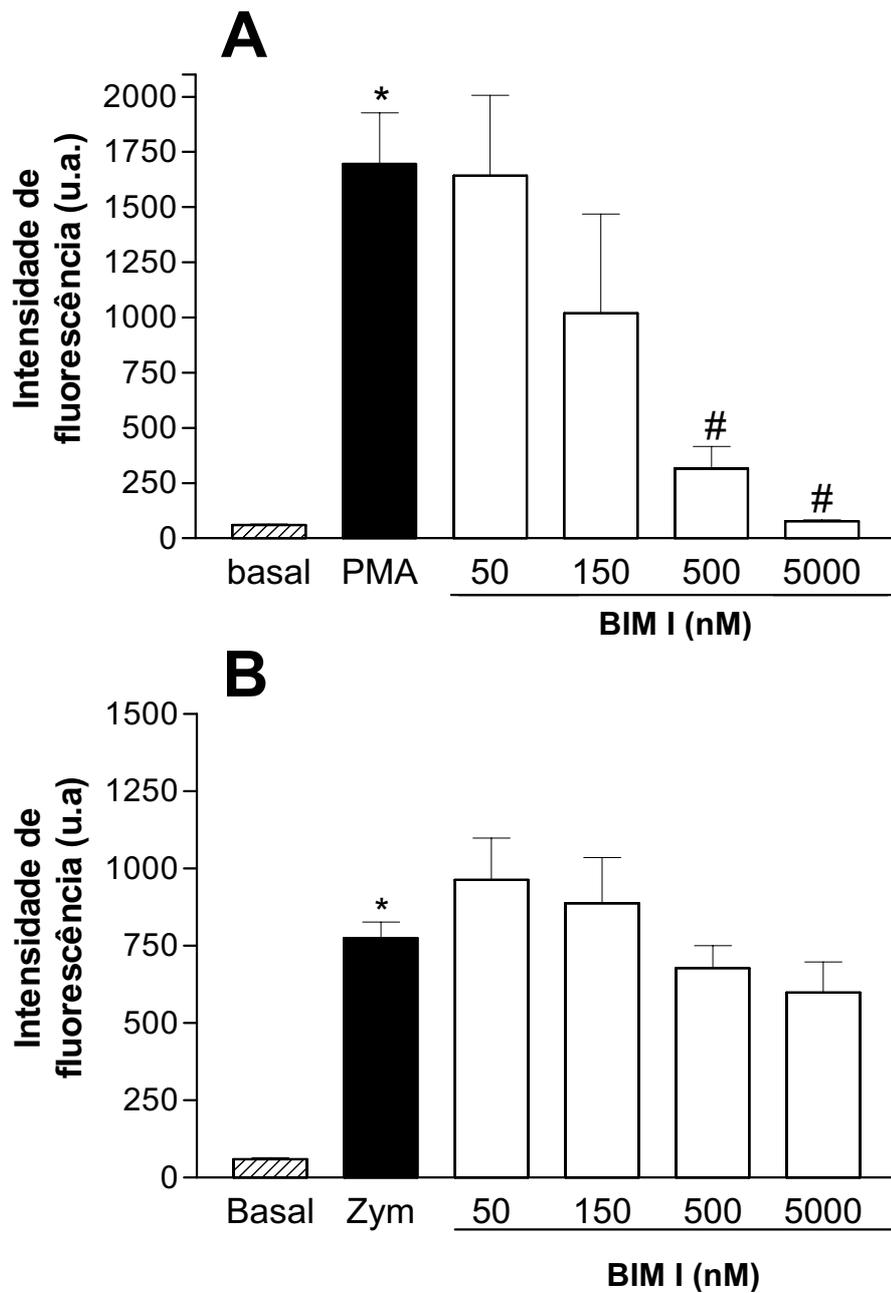


Figura 14 - Efeito da inibição da PKC pelo BIM I na intensidade de fluorescência produzida pela oxidação do DCFH em granulócitos normais. O composto BIM I foi adicionado juntamente com o DCFH-DA, 30 minutos antes da estimulação das células com PMA (160 nM; Painel A) ou com zymosan (5 partículas/célula Painel B). A fluorescência foi medida 30 minutos após a estimulação a 37°C. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão da média de 2 a 7 amostras. \* $p < 0.05$ , diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo não estimulado (basal). # $p < 0.05$ , diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo estimulado (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

## **4.6 - Avaliação da explosão respiratória em granulócitos de pacientes leucêmicos**

### **4.6.1 Explosão respiratória em leucócitos de pacientes leucêmicos, sendo as células obtidas pelo procedimento de lise com cloreto de amônio**

Para esta avaliação, amostras de seis pacientes (3 com leucemia linfóide aguda e 3 com leucemia mielóide aguda) foram avaliadas e comparadas com o resultado de 13 doadores saudáveis, através do procedimento de lise de eritrócitos e estimulação com PMA (160 nM). A Figura 15 mostra uma importante redução, da ordem de 50%, na intensidade de fluorescência produzida durante a explosão respiratória de granulócitos de pacientes portadores de leucemias agudas quando comparada à produção observada por granulócitos de doadores saudáveis.

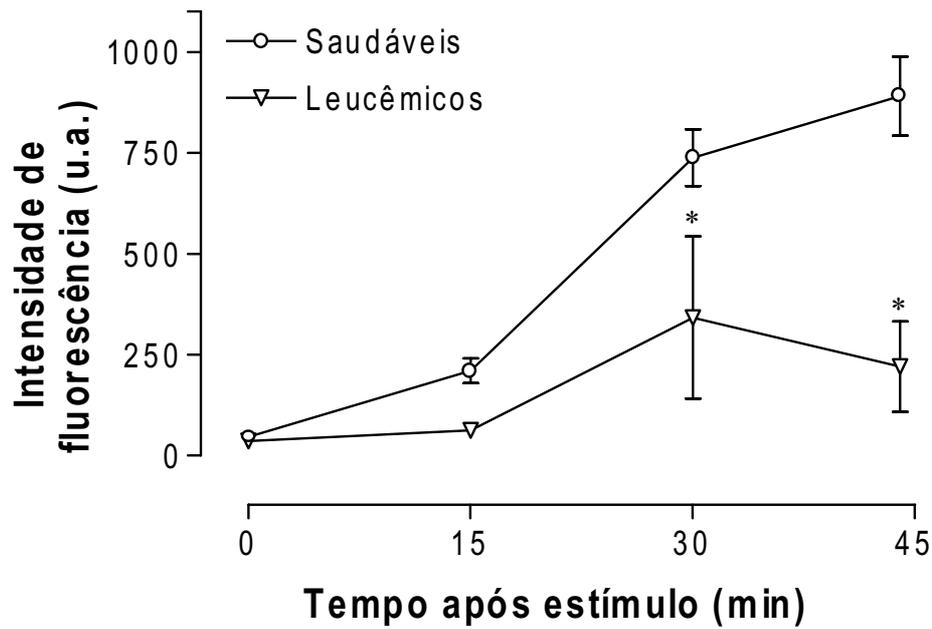


Figura 15 - Curva temporal da explosão respiratória de granulócitos normais e de pacientes leucêmicos estimulados com PMA (160 nM). Os leucócitos ( $3 \times 10^6$  células/mL) foram obtidos pelo procedimento de lise. A leitura da intensidade de fluorescência das amostras foi realizada nos diferentes tempos indicados. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão da média de 13 doadores saudáveis e 6 pacientes leucêmicos. \*  $p < 0.05$ , mostra diferença estatisticamente significativa entre granulócitos de pacientes leucêmicos e de doadores saudáveis (ANOVA seguida pelo teste t modificado por Bonferroni).

#### **4.6.2 Explosão respiratória em granulócitos de pacientes leucêmicos, sendo as células obtidas pelo procedimento de sedimentação diferencial com dextrana**

Para esta avaliação, amostras de cinco pacientes (4 com leucemia mielóide aguda e 1 com leucemia linfóide aguda) foram avaliadas e comparadas com o resultado de 5 doadores saudáveis. Os granulócitos foram separados com dextrana e estimulados com PMA (160 nM) ou zymosan (5:1). A Figura 16 mostra uma importante redução da intensidade de fluorescência produzida durante a explosão respiratória nos granulócitos de pacientes portadores de leucemias agudas em granulócitos estimulados com PMA como com as células estimuladas com zymosan. Diferentemente da intensidade de fluorescência produzida pelos indivíduos saudáveis, os granulócitos de pacientes leucêmicos apresentaram uma redução na resposta ao estímulo de cerca de 50%.

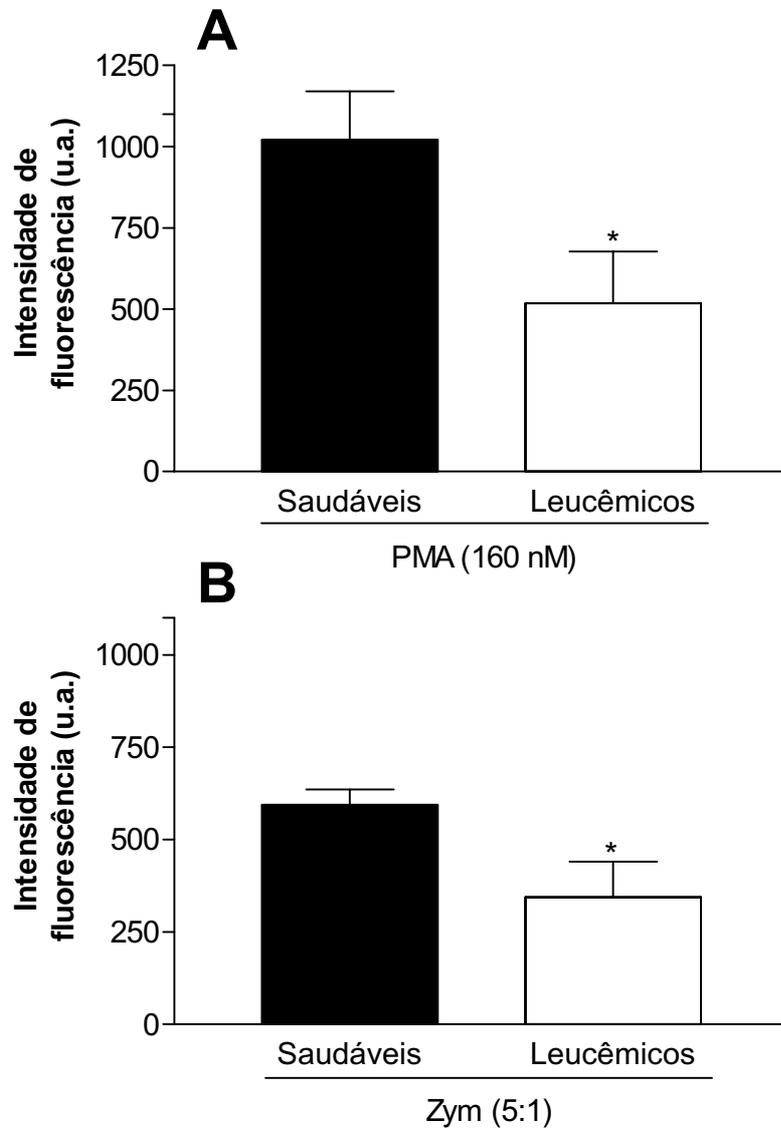


Figura 16 – Explosão respiratória em granulócitos ( $3 \times 10^6$  células/mL) de indivíduos saudáveis e leucêmicos. Os granulócitos foram estimulados com PMA (Painel A) e com zymosan (Painel B). A leitura da intensidade de fluorescência das amostras foi realizada após 30 minutos de estimulação. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão da média de 5 doadores saudáveis e 5 pacientes portadores de leucemias agudas. \*  $p < 0.05$ , mostra diferença estatisticamente significativa entre granulócitos de pacientes leucêmicos e granulócitos normais (teste t de Student, não pareado).

## 5 – DISCUSSÃO

### 5.1 - Considerações metodológicas

A função normal dos fagócitos (neutrófilos, eosinófilos e monócitos) é de fundamental importância nos mecanismos de defesa do hospedeiro. Para que os fagócitos possam exercer este importante papel, estes precisam aderir ao endotélio vascular, migrar através da parede dos vasos e tecidos intersticiais até o local da infecção e/ou inflamação (EEDEN et al., 1999). Em contato com os microorganismos invasores os fagócitos iniciam o processo de fagocitose, que ativa mecanismos não-oxidativos e oxidativos através dos quais o agente invasor será morto e digerido (SCROFERNEKER & POHLMANN, 1998).

Os mecanismos não-oxidativos envolvem principalmente a produção e ativação de enzimas lisossomais, lisozimas, defensinas e várias enzimas hidrolíticas que residem nos grânulos dos fagócitos com ação citotóxica e microbicida. Os macrófagos ativados também secretam fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), uma citocina que é citotóxica para algumas células tumorais (GOLDSBY et al., 2003). Milhares de grânulos citoplasmáticos fundem-se ao vacúolo fagocítico, levando assim o seu conteúdo ao lúmen desta vesícula. O pH do vacúolo fagocítico, que no início do processo é alcalino, 30 a 60 minutos após acidifica-se, tornando o meio adequado para a iniciação dos mecanismos oxidativos (FAITLOWICZ, 1993). Os mecanismos oxidativos por sua vez, estão relacionados à ativação de um processo metabólico chamado de “explosão respiratória”. Durante este processo, os fagócitos aumentam muito o consumo de oxigênio e produzem uma série de espécies reativas de oxigênio (EROs) e do nitrogênio (ERNs) (ROBINSON, 1998). O aumento do

consumo do oxigênio envolve a geração de maior quantidade de energia para fazer face à necessidade de maior atividade metabólica dos fagócitos. Entretanto, uma parte substancial deste consumo será utilizada por um complexo multi-proteico, conhecido como sistema NADPH-oxidase (KARLSSON & DAHLGREN, 2002). Este complexo fica localizado na membrana plasmática e na membrana de grânulos citoplasmáticos, e produz, a partir do oxigênio molecular, inúmeras espécies extremamente reativas. Dentre estas espécies reativas, destaca-se o  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^{\bullet}$ ,  $^1O_2$  e o  $HOCl^{\bullet}$  que formam um potente sistema de defesa já que todos são, em maior ou em menor grau, potentes agentes citotóxicos o que resulta na morte de microorganismos invasores (Figura 2; HAMPTON et al., 1998).

Os mecanismos oxidativos são essenciais para a defesa do organismo contra infecções, o que é claramente observado em pacientes portadores da doença granulomatosa crônica (DGC), em que uma falha na enzima NADPH-oxidase presente nos neutrófilos leva a uma deficiência na produção das espécies reativas de oxigênio (KARLSSON & DAHLGREN, 2002). Esta deficiência na ativação da explosão respiratória sujeita os pacientes portadores a repetidos processos infecciosos, freqüentemente letais. Ressalta-se que a quimiotaxia, a fagocitose e a degranulação dos neutrófilos permanecem conservadas nestes pacientes (CONDLIFFE et al., 1998). Por outro lado, o excesso da produção de espécies reativas no metabolismo oxidativo parece ser responsável, pelo menos em parte, pela lesão tecidual observada em diversas doenças como a asma, a artrite reumatóide, enfisema, síndrome de estresse respiratório agudo e aterosclerose, entre outras (BABIOR, 2000). Para limitar um possível dano celular ou tecidual resultante da ativação de tão potente sistema citotóxico, existem sistemas altamente eficientes de detoxificação das EROs. Dentre estes sistemas destacam-se a enzima

superóxido dismutase (SOD), que dismuta o ânion superóxido em água, a enzima catalase que transforma o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio e as enzimas do complexo glutathiona peroxidase, que ao manter altos níveis intracelulares de glutathiona (GSH) reduzida, permitem que este composto funcione como um excelente seqüestrador de EROs (JAKUBOWSKI & BARTOSZ, 2000; LIU et al., 2001).

A necessidade da avaliação dos mecanismos oxidativos tem ocasionado o desenvolvimento de várias metodologias para a medida da geração e liberação de EROs em fagócitos. Atualmente existe uma variedade de técnicas espectrofotométricas, fluorimétricas e quimioluminescentes que visam avaliar a explosão respiratória, quase sempre baseadas no monitoramento da geração das EROs. Entretanto, estes ensaios medem a atividade média de um grande número de células capazes de produzir EROs, ou seja, a resposta coletiva da suspensão celular analisada, assumindo que os fagócitos fazem parte de uma população homogênea. Porém, esta suposição nem sempre é válida uma vez que trabalhos indicam que até mesmo os polimorfonucleares normais podem responder de maneira heterogênea, o que sugere a existência de diferentes funcionalidades entre subpopulações de PMN circulantes (ROBINSON, 1995). Além disso, com o uso destas metodologias é difícil distinguir se a localização da produção de EROs ocorre no compartimento intra ou extracelular. Para melhor avaliação destas questões, a citometria de fluxo tem demonstrado ser uma excelente ferramenta. A citometria de fluxo, em conjunto com a utilização de sondas moleculares reativas aos EROs, pode medir a produção de espécies reativas de oxigênio exclusivamente no meio intracelular e em células individuais. A vantagem disso é que a quantificação da produção de  $H_2O_2$  durante a explosão respiratória será efetuada principalmente naquele compartimento mais

relevante para a ação citotóxica, isto é, a atividade resultante do complexo NADPH-oxidase que reveste o fagolisossomo. Várias sondas moleculares como a dihidrorodamina-123 (DHR-123), o dihidroetídio (DHE) e a diclorofluoresceína (DCFH) são sensíveis a mudanças oxidativas nas células (LEHMANN, 2000).

Para avaliarmos a produção de EROs neste estudo, selecionamos o ensaio de oxidação da sonda DCFH-DA. Esta medida da produção de EROs (principalmente peróxido de hidrogênio) no interior da célula ocorre porque esta sonda possui um grupamento éster em sua estrutura que confere a ela uma característica lipofílica que permite o fácil acesso da molécula ao interior das células (ROBINSON, 1998) Uma vez no interior da célula, enzimas citosólicas (esterases) desacetilam o DCFH-DA para formar o produto não-fluorescente DCFH, o qual devido a sua polaridade fica preso no interior da célula (Figura 3; BASS et al., 1983).

A produção de  $H_2O_2$  oxida o DCFH a DCFoxi, que possui fluorescência verde e que pode ser facilmente medida a 510-550 nm no citômetro de fluxo (SZEJDA et al, 1984). Desta forma, a intensidade de fluorescência produzida se torna uma medida dos metabólitos oxidativos produzidos pelas células, em particular o  $H_2O_2$  (BASS et al, 1983). Uma evidência a favor desta afirmativa consistiu do achado que azida, um inibidor da mieloperoxidase e da catalase, causou um aumento substancial na fluorescência das células incubadas com DCFH-DA, confirmando que o  $H_2O_2$  é a principal espécie responsável pela oxidação da DCFH (BASS et al, 1983; SMITH & WEIDEMANN, 1993). O sinal fluorescente emitido pelo DCFoxi pode ser captado enquanto a viabilidade das células for mantida, pois uma vez que a membrana citoplasmática seja lesionada, o DCFoxi é rapidamente eliminado da célula. Logo, o acompanhamento da viabilidade celular foi realizado no final de cada experimento, pois a diminuição da viabilidade ou a ausência de células viáveis

poderia mostrar resultados falso-negativos na produção da intensidade de fluorescência produzida, decorrente da produção de  $H_2O_2$ . Desta maneira, podemos dizer que nossos resultados não foram influenciados pela presença de células inviáveis, e excluir resultados falso-negativos, pois 98% das células se apresentaram viáveis. Como dito, a detecção da oxidação da DCFH através por citometria de fluxo tem inúmeras vantagens sobre outros métodos na avaliação da explosão respiratória: 1) pode ser utilizada em combinação com outra sonda fluorescente que possua um comprimento de onda diferente, permitindo investigar parâmetros multifuncionais simultaneamente; 2) um pequeno número de células é suficiente para a realização das medidas propostas neste trabalho, facilitando a avaliação de amostras de crianças e pacientes neutropênicos; 3) o aumento da fluorescência do DCFoxi em resposta a oxidação intracelular pode ser monitorada somente quando as células são viáveis, uma vez que as células foram selecionadas de acordo com os parâmetros de granulosidade e tamanho; e 4) permite a detecção de EROs produzidas exclusivamente no interior das células.

Embora a técnica de oxidação do DCFH seja considerada bastante eficiente, vários autores sugerem que esta sonda possa ser oxidada não somente pelo  $H_2O_2$  como também pelo NO e pelo  $ONOO^-$  (JAKUBOWSKI & BARTOZ, 2000). Em experimentos não-mostrados, avaliamos a possível presença de nitrito, um metabólito estável do NO, em células estimuladas com PMA. Como não encontramos nitrito, sugerimos que os fagócitos não produzem NO em quantidades detectáveis. Considerando que o ânion  $ONOO^-$  só ocorre na presença simultânea de ânion superóxido e de NO (DUSSE, 1997), a ausência de NO fortemente sugere que o que foi medido neste trabalho foi o  $H_2O_2$ . Apesar do grande interesse nas espécies reativas do nitrogênio como o NO e  $ONOO^-$  pelo seu grande potencial citotóxico, a

presença de NO só foi bem documentada em células de macrófagos murinos em resposta a citocinas (HAMPTON; KETTLE; WITERBOURN, 1998). Neutrófilos humanos isolados do sangue periférico não produzem espécies reativas de nitrogênio em espaços de tempo tão curtos quanto aqueles utilizados neste trabalho, que foram da ordem de 60 minutos no máximo (FIERRO et al., 1996).

Uma das poucas desvantagens do método da DCFH é a necessidade da eliminação dos eritrócitos das amostras. Este procedimento é necessário uma vez que um grande número de eritrócitos pode prejudicar o reconhecimento das subpopulações celulares pelo citômetro de fluxo, além de que alguns autores demonstram que a presença do grupamento heme da hemoglobina pode oxidar a sonda (DCFH) ocasionando resultados falso-positivos, além de que a quebra deste grupamento pode liberar ferro que por sua vez é capaz de reagir com o  $H_2O_2$  formando o radical  $OH^*$  (OHASHI, et al, 2002). Para evitar estas possíveis interferências, dois métodos para a eliminação dos eritrócitos das amostras foram avaliados: eliminação dos eritrócitos através da hemólise com  $NH_4Cl$  ou a eliminação física dos eritrócitos através da sua sedimentação diferencial causada pela dextrana. Ambos os métodos permitiram a obtenção de um número suficiente de leucócitos (maior que  $5 \times 10^6$  leucócitos/mL) com uma grande proporção de granulócitos nas amostras (maior que 90%). Entretanto, a análise morfológica de células obtidas após o método de lise revelou irregularidades na membrana plasmática, apesar da manutenção da viabilidade celular no momento da leitura das amostras (Figura 4). Por outro lado, a eliminação dos eritrócitos através da sedimentação destas células com dextrana produziu uma melhor preservação da morfologia celular (Figura 5). As alterações morfológicas, além da demora deste procedimento talvez justifiquem a ausência de resposta da ER das células estimuladas com estímulos particulados

(zymosan), uma vez que o mesmo necessita ser fagocitado para induzir o processo de explosão respiratória nos granulócitos. Por outro lado, a resposta ao estímulo fluido não foi influenciada pelo método de lise, possivelmente porque o PMA é lipofílico e capaz de facilmente permear a membrana celular, não necessitando do maior envolvimento da membrana celular. Portanto, a obtenção de leucócitos livres de hemácias através da utilização de dextrana foi o método escolhido para a realização do restante deste trabalho.

## **5.2 - Mecanismos moleculares**

Uma importante característica dos fagócitos é sua habilidade em responder a diferentes estímulos para que o processo de ER seja iniciado. Os fagócitos podem ser ativados por estímulos endógenos como a interleucina 8 (IL-8), leucotrieno B4 (LTB4), fator de ativação plaquetária (PAF), fator C5a do sistema complemento, interleucina 1 (IL-1), e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), ou por estímulos exógenos como o fMLP, bactérias opsonizadas, partículas de zymosan opsonizadas, ionóforos e ésteres de forbol, como o PMA (EEDEN et al, 1999). Em nossos estudos, avaliamos a produção de espécies reativas de oxigênio frente a dois diferentes estímulos exógenos: o PMA, um estímulo fluido e o zymosan, um estímulo particulado. O PMA é um conhecido indutor da ER e de fato foi eficiente na indução deste processo em granulócitos, apresentando a máxima produção de EROs após 30 minutos de estimulação, com uma queda na produção após este período. Já o zymosan apresentou resposta semelhante ao PMA aos 45 minutos após a estimulação. Experimentos preliminares demonstraram que após 60 minutos da exposição ao zymosan a intensidade de fluorescência decai lentamente.

Diferentemente do PMA, o zymosan apresentou uma cinética mais lenta entre os 15 e 45 minutos após a estimulação.

A seleção dos estímulos depende da natureza do problema que precisa ser abordado. O PMA vem sendo utilizado para identificar deficiências na ER em células isoladas de pacientes com DGC, assim como auxiliar a avaliação deste processo em vários outros estados patológicos que podem estar relacionados com a produção exagerada ou deficiente de EROs (BASS ET AL 1986; SMITH & WEIDEMANN, 1993). Além da aplicação clínica, Heath et al. (1992), mostraram que algumas de respostas fisiológicas como a exercícios físicos (natação e ciclismo) e estresse psicológico também podem se apresentar alteradas e contribuir para o aumento da susceptibilidade ao desenvolvimento de infecções respiratórias durante períodos de treinamento prolongados. Em nosso estudo, o acompanhamento morfológico em microscopia óptica das células estimuladas com zymosan mostrou que há uma clara relação entre a produção de EROs e a ingestão de partículas durante o processo fagocítico. Esta observação deixou claro que a ER estimulada com zymosan é dependente do processo fagocítico, ao contrário do PMA que opera em fase fluida. Estas diferenças nos apontam na direção que, a escolha do estímulo depende da função granulocítica que se quer avaliar. Com o objetivo de auxiliar o diagnóstico da DGC em ensaios de rotina laboratorial, a melhor escolha seria a utilização do PMA, uma vez que uma ER diminuída poderia ser decorrente de deficiências que impeçam a fagocitose e não decorrentes de uma deficiência na produção de EROs através da ER. As diferenças cinéticas observadas entre o zymosan e o PMA devem ser devidas aos distintos mecanismos de sinalização celular que levam a explosão respiratória, dependendo do estímulo empregado.

Para investigarmos as vias de sinalização celular envolvidas nos dois estímulos, os seguintes pontos foram investigados: a participação do cálcio, do citoesqueleto e da PKC durante a explosão respiratória.

Trabalhos citam que existem vários mecanismos em termos de requerimento de cálcio e participação de microfilamentos do citoesqueleto (KARLSSON & DAHLGREN, 2002; NAUSEEF et al, 1991). O cálcio é um conhecido regulador da função neutrofílica. Para investigar a participação do cálcio frente aos dois diferentes estímulos, utilizamos o EGTA, um quelante de cálcio extracelular. Os resultados sugerem que as vias de sinalização para indução da ER são diferentes para cada um destes estímulos. A estimulação pelo zymosan envolve a participação do cálcio extracelular, enquanto a estimulação pelo PMA parece não depender tanto da presença deste íon. Este achado sugere que a liberação do cálcio estocado nas organelas intracelulares pode não ter sido suficiente para a ativação das células com o zymosan, e que provavelmente ocorre um influxo do cálcio extracelular para que esta ativação pelo zymosan possa acontecer. Tais estoques intracelulares por sua vez parecem ser suficientes para garantir o funcionamento do PMA.

Diferentes estímulos podem desencadear o processo de explosão respiratória por diferentes vias de sinalização celular. Estes estímulos podem agir em receptores encontrados na membrana de neutrófilos, levando à produção de vários segundos mensageiros responsáveis pela ativação de várias cascatas de sinalização celular (GARFIA; GARCIA-RUIZ; SOLIS-HERRUZO, 2004). Alguns dos segundos mensageiros formados são o diacilglicerol (DAG) e o trifosfato de inositol (IP3), gerados pela hidrólise de fosfolipídios de membrana (especialmente o fosfatidilinositolbifosfato – PIP<sub>2</sub>) pela ação da enzima fosfolipase C. O IP3 aumenta os níveis citoplasmáticos de cálcio, enquanto o DAG estimula subtipos específicos

de PKC (TWOMEY et al., 1990). Interessantemente, alguns estudos demonstram que inibidores da PKC reduzem a produção de espécies reativas, incluindo o ânion superóxido, por fagócitos estimulados com TNF- $\alpha$  (DUSI et al., 1996) e PAF (NIWA et al., 1996).

O PMA é um análogo funcional do DAG (CASTAGNA et al., 1982). Este éster de forbol e o DAG causam um grande aumento na afinidade da PKC pela membrana, o que serve para recrutar esta quinase para aquele compartimento. Ambos os ligantes regulam a atividade da PKC através do mesmo mecanismo. Entretanto eles podem ter efeitos biológicos diferentes por pelo menos dois motivos. Primeiro, o recrutamento à membrana e a ativação iniciada por DAG ocorre em um período de curta duração e é transiente, uma vez que o DAG é rapidamente metabolizado. O PMA ao contrário, não é prontamente metabolizado o que resulta na ativação constitutiva da PKC. Segundo, o PMA é duas vezes mais potente que o DAG (em base molar), no recrutamento da PKC para a membrana celular (NEWTON, 2001). Nossos resultados estão de acordo com outros relatos da literatura que demonstram que o PMA induz o processo de ER ativando diretamente a PKC (OHNO & NISHIZUKA, 2002). Porém, além da PKC, existem pelo menos cinco tipos alternativos de proteínas que possuem alta afinidade pelo receptor de ligação do DAG ou PMA, incluindo proteína quinase D, DAG quinase  $\gamma$  e subtipos de RasGRP, Munc13 e quimerinas (BROSE & ROSENMUND, 2002). Entretanto, os presentes resultados demonstraram que a PKC deva ser o principal alvo para a ação do PMA pois o BIM I, um inibidor seletivo da ativação da PKC foi capaz de bloquear substancialmente a oxidação da DCFH em células estimuladas pelo PMA.

Embora crítica para o efeito do PMA, a sinalização celular através da PKC parece não ser essencial para o zymosan. De fato, nossos resultados demonstraram

que a utilização do BIM I não foi capaz de bloquear a oxidação da DCFH causada por este estímulo. Este resultado demonstra que a ativação da ER em granulócitos induzida pelo zymosan não é dependente da PKC.

Em contraste ao PMA, a via de transdução pela qual o zymosan atua ainda não foi completamente esclarecida. Liu et al. (2000) relatam que a fagocitose e morte bacteriana parecem ocorrer eficientemente quando na presença de anticorpos IgG (imunoglobulina G, uma opsonina), cuja porção Fc interage com receptores presentes nos neutrófilos. Também tem sido descrito que a função de neutrófilos mediada por receptor Fc são completamente dependentes da presença de receptores de complemento tipo 3 (CR3). Jaconi et al. (1993) demonstraram que o bloqueio de CR3 por anticorpos monoclonais anti-C3bi, diminuíram substancialmente a fagocitose de células estimuladas com zymosan opsonizado. Outro estudo, entretanto, testou este mesmo efeito e não observou alterações na fagocitose de neutrófilos estimulados com zymosan (LIU et al., 2000). Recentemente, Halevy-Hazan, Seger e Levy (2000), sugeriram que a via de transdução de sinal iniciada pelo zymosan em neutrófilos humanos pode ocorrer através da ativação da fosfolipase A<sub>2</sub> citosólica (PLA<sub>2</sub>C), de maneira dependente da tirosina quinase, mostrando que a estimulação da PLA<sub>2</sub> pelo zymosan é mediada por receptor Fc gama (Fc<sub>γ</sub>Rs) e não por receptores do complemento para a proteína C3b. Finalmente, também é relatada que a atuação do zymosan através de receptores acoplados a proteína G, estimulando a hidrólise e fosforilação de PIP<sub>2</sub> via PLC (fosfolipase C) e PI3K (fosfoinositídeo 3 quinase) (GARFIA;GARCIA-RUIZ; HERRUZO, 2004).

O estudo de Levy et al. (1994) demonstrou que a incubação de alguns inibidores não seletivos da PKC (tais como a estaurosporina, K252a ou calfostin C)

foram capazes de reduzir a produção de superóxido em neutrófilos humanos estimulados com PMA ou zymosan. Entretanto, concentrações muito baixas destes inibidores foram necessárias para inibir a resposta ao PMA, quando comparadas àquelas necessárias para afetar a estimulação pelo zymosan. Estes achados podem ser atribuídos ao fato de que estes inibidores possam estar funcionando de maneira não seletiva, já que eles também inibem outras quinases tais como a PKA (proteína quinase A), PKG (proteína quinase G) e a MLCK (quinase de cadeia leve de miosina) (JACOBSON et al., 1995; KASE et al., 1987). Outro estudo demonstrou que o inibidor seletivo da PKC, o BIM I, não alterou o aumento da produção de ânion superóxido causada pelo zymosan, em concentração que bloqueia o mesmo efeito produzido pelo PMA (HAZAN et al., 1997). Os dados do presente estudo confirmam estes dados da literatura, demonstrando que o inibidor seletivo da PKC, o BIM I (ativo na faixa de 500 e 5000 nM), bloqueou seletivamente o aumento na resposta de oxidação do DCFH produzida com o PMA, sem entretanto, alterar as respostas causadas pelo zymosan. Portanto, nossos resultados e de outros deixam clara a existência de distintas vias de sinalização para que diferentes estímulos possam ativar a NADPH oxidase e conseqüentemente produzir espécies reativas de oxigênio durante a explosão respiratória. Mais ainda, enfatizam que apesar da potência demonstrada pelo PMA, este estímulo não retrata fielmente o que ocorre fisiologicamente em relação à atividade dos fagócitos, cuja explosão respiratória depende da fagocitose, isto é, a fagocitose e a ER só tem sentido fisiológico como elementos que trabalham juntos.

A NADPH oxidase é composta por 7 subunidades que se encontram distribuídas entre o citosol e a membrana celular e membrana de grânulos e vesículas intracelulares (fagossoma). Entre as subunidades citosólicas, a Rac2

encontra-se livre no citoplasma enquanto três destes componentes, o p40<sup>PHOX</sup>, o p47<sup>PHOX</sup> e o p67<sup>PHOX</sup> encontram-se no citosol como um complexo (BABIOR,1999). Na membrana encontram-se as subunidades p22<sup>PHOX</sup> e gp91<sup>PHOX</sup> que aparecem como uma flavoproteína conhecida como citocromo b<sub>558</sub>, além da subunidade Rap1A, que também está localizada na membrana e que pode ser copurificada com o citocromo b<sub>558</sub>. Quando o fagócito é ativado, o componente citosólico p47<sup>PHOX</sup> é fosforilado e o complexo citosólico inteiro migra para a membrana, onde se associa ao citocromo b<sub>558</sub> para montar a forma ativa da oxidase (BABIOR, 2000; KARLSSON & DAHLGREN, 2002).

Entretanto, o mecanismo de translocação destes fatores do citosol para a membrana não está bem estabelecido, assim como o possível papel do citoesqueleto na translocação destas subunidades citosólicas para ativação da NADPH-oxidase e início da explosão respiratória.

O citoesqueleto é uma estrutura altamente dinâmica que se reorganiza continuamente, sendo o responsável direto por movimentos tais como o deslocamento das células sobre um substrato e movimentos intracelulares tais como transporte de organelas no citoplasma (ALBERTS et al., 2002). O citoesqueleto controla a localização espacial de complexos protéicos e organelas, bem como fornece vias de comunicação entre elas. Sabendo que as diferentes atividades do citoesqueleto dependem de diferentes tipos de filamentos protéicos, a saber filamentos de actina (microfilamentos), de tubulina (microtúbulos) e os filamentos intermediários, neste trabalho avaliamos a participação dos principais filamentos (de actina e tubulina) na ativação da ER.

A exposição de neutrófilos a fatores quimiotáticos inicia uma série de respostas biológicas que incluem mudanças de forma, projeções de membrana,

motilidade celular, fagocitose, entre outras, e que são dependentes da montagem e reorganização de microfilamentos de actina (LORENZI, 1992; TORRES & COATES, 1999). Apesar da importância do conteúdo de microfilamentos de actina, os detalhes moleculares de sinalização, montagem e reorganização ainda não são completamente claros.

Para avaliar a participação dos microfilamentos utilizamos a citocalasina D, um composto capaz de despolimerizar os microfilamentos de actina, 10 vezes mais potente que a freqüentemente utilizada citocalasina B (TORRES & COATES, 1999). A citocalasina D foi mais potente e eficaz em inibir a explosão respiratória causada pelo zymosan quando comparado ao PMA. A citocalasina na concentração de 1  $\mu\text{M}$  inibiu parcialmente enquanto na concentração de 10  $\mu\text{M}$ , aboliu a ação do zymosan. Por outro lado, a maior concentração de citocalasina testada (10  $\mu\text{M}$ ) reduziu somente parcialmente a resposta do PMA. Estes resultados confirmam que a integridade dos microfilamentos de actina é essencial para a produção de espécies reativas de oxigênio como o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , na explosão respiratória estimulada com partículas de zymosan. Provavelmente, este efeito ocorreu porque a citocalasina D inibiu a capacidade fagocítica das células e a fagocitose, que fisiologicamente, antecede a ER. Estes dados estão de acordo com trabalho da literatura que demonstra a importância da integridade dos microfilamentos de actina para a produção da explosão respiratória (GRANFELDT & DAHLGREN, 2001). Ainda que pouca e somente em doses mais altas de citocalasina, a resposta inibitória na explosão respiratória causada por PMA indica que os microfilamentos parecem ter alguma importância neste estímulo. Neste caso, a citocalasina D poderia estar inibindo outras funções associadas aos microfilamentos como por exemplo, a redistribuição de receptores da membrana, o deslocamento de organelas no

citoplasma e o acoplamento de complexos multi-proteicos. Neste sentido, está documentado que a elevação dos níveis intracelulares de DAG (ou a administração de seu análogo, o PMA), pode induzir a polimerização de microfilamentos de actina, o que sugere que a remodelagem de microfilamentos em células ativadas pode ser indiretamente ativada pela PKC (DOWNEY et al., 1992).

Além dos microfilamentos, exploramos o efeito de compostos que conhecidamente afetam a função dos microtúbulos na explosão respiratória dos fagócitos. As ferramentas farmacológicas que utilizamos foram o taxol e a colchicina. O taxol é extraído de uma árvore, *Taxus brevifolia*, e tem recebido muita atenção por ser um medicamento com propriedades anticancerígenas. O taxol promove a polimerização de tubulina e estabiliza microtúbulos organizados, resultando então em um aumento da rede de microtúbulos com conseqüente “congelamento” das atividades celulares deles dependentes (SCHIFF; FANT; HORWITZ, 1979). A colchicina é outro medicamento bem conhecido que atua nos microtúbulos do citoesqueleto exercendo um efeito oposto ao do taxol. A colchicina é capaz de se ligar á subunidade  $\beta$  da tubulina, formando o complexo colchicina-tubulina que inibe a polimerização dos microtúbulos (DOWNEY et al, 1992).

Curiosamente, a ER não foi influenciada pelo taxol quando as células foram estimuladas com zymosan. Já a resposta das células tratadas com taxol e estimuladas com PMA, mostrou uma redução da produção de EROs na explosão respiratória que foi entretanto observada somente frente a concentrações (farmacológicas) muito elevadas deste reagente. A colchicina por sua vez não alterou a resposta na ER induzida tanto pelo PMA quanto pelo zymosan.

Estes resultados sugerem que as propriedades mecânicas possivelmente envolvidas durante o processo fagocítico e produção da explosão respiratória são

predominantemente reguladas pelos microfilamentos de actina, e que os microtúbulos parecem exercer uma limitada participação nestes processos. Apesar das evidentes interações entre os dois grupos de filamentos, existe descrição na literatura que demonstra que a desorganização dos microtúbulos ocasionada por estes compostos não repercute nos microfilamentos e não causa nenhuma mudança nas propriedades mecânicas das células (TSAI; WAUGH; KENG, 1998).

As diferenças observadas no nosso trabalho portanto, indicam a existência de mecanismos distintos envolvendo o citoesqueleto e a indução da explosão respiratória. Estes fatos indicam portanto que, para finalidades de auxiliar o prognóstico e escolha do tratamento profilático de pacientes portadores de leucemias agudas, há que se considerar a utilização de estímulos particulados, que devem retratar mais fielmente a resposta fisiológica e portanto devem ser mais adequados para a avaliação de distúrbios de função de granulócitos, assim como doenças relacionadas a defeitos na fagocitose e falhas no citoesqueleto. Mais ainda, nossos resultados mostram que para a avaliação da explosão respiratória, é importante a utilização do estímulo fluido (do tipo do PMA) em conjunto com um estímulo particulado. Desta forma, a resposta seria avaliada de maneira que poderia ser diferenciada a presença de uma ER alterada decorrente de deficiências na produção de EROs e/ou devida à presença de anormalidades que impeçam o desenvolvimento de um processo fagocítico normal. Esta sugestão se deve à observação realizada neste trabalho, onde os granulócitos que não fagocitaram as partículas de zymosan não foram capazes de induzir o processo de explosão respiratória indicando que uma diminuição da ER pode ser decorrente de alterações que impeçam a ocorrência da fagocitose e não devido a deficiências no processo de ER. A estimulação utilizando apenas o PMA como estímulo não permite a detecção

de alterações que impeçam a fagocitose, o que poderia proporcionar resultados falso-negativos da ER na presença de deficiências fagocíticas.

### 5.3 – Leucemias

Sabendo que a maior fonte de mortalidade de pacientes portadores de leucemias agudas são decorrentes de freqüentes processos infecciosos que acometem estes pacientes, estudamos a capacidade de produção de  $H_2O_2$  durante a ER na presença desta patologia. A resposta obtida com o estímulo particulado (zymosan) assim como com o estímulo fluido (PMA) se apresentou diminuída nestes pacientes. Este fato é de grande interesse uma vez que pode sugerir que a presença dos repetidos processos infecciosos pode ocorrer como conseqüência da deficiência da ER nos granulócitos destes pacientes leucêmicos.

Entretanto, existem vários resultados bastante heterogêneos na literatura. Powel et al. (1986) demonstraram um aumento na produção de  $H_2O_2$ , e poucos casos apresentando uma produção diminuída em células de pacientes leucêmicos (LLA e LMA) estimuladas com PMA. Porém, a presença de uma resposta diminuída nestes pacientes coincidiu com a maior taxa de mortalidade deste grupo quando comparado com os pacientes que apresentaram resposta aumentada. Outro trabalho demonstrou falhas na produção de  $H_2O_2$  intracelular em células de pacientes com LMC estimuladas com fMLP, porém uma resposta normal foi observada quando as células são estimuladas com PMA (SAMUELSSON et al., 1998). Também foi demonstrada a diminuição da produção de  $H_2O_2$  em células de pacientes portadores de leucemias mielóides crônicas (LMC) estimuladas com *Cândida guilliermondii* (EL-MAALEEM & FLETCHER, 1979). Estes últimos trabalhos

corroboram com nossos resultados, sugerindo mais uma vez que os estímulos particulados parecem ser mais fiéis para a avaliação da produção de  $H_2O_2$  quando a fagocitose ocorre normalmente. Além disso, a utilização do zymosan como estímulo também nos permite fazer uma avaliação do processo fagocítico através da visualização das células estimuladas em lâminas através de microscopia óptica. As diferenças encontradas na literatura podem ser decorrentes do tipo de leucemia, estágio da doença, tipo de tratamento e presença ou ausência de processos infecciosos, além das diferenças metodológicas. Além da doença em si, alterações das respostas de pacientes leucêmicos foram observadas quando do tratamento de infecções com antibióticos e drogas antiinflamatórias, que parecem contribuir para o aumento da produção de ânion superóxido (DEVI et al., 2000).

Diante do exposto, podemos sugerir que a imunodeficiência presente pode não ser causada só pela neutropenia decorrente do tratamento, mas também da deficiência destas células na produção de  $H_2O_2$  durante o processo de ER. Estes resultados podem ser de fundamental importância no acompanhamento prognóstico destes pacientes, e contribuir para o entendimento dos diferentes mecanismos que podem estar envolvidos nesta etapa de defesa imunológica do organismo contra os microorganismos invasores.

Nossos resultados podem ajudar a estabelecer testes de rotina em laboratórios clínicos para auxiliar o diagnóstico da doença granulomatosa crônica, e a avaliação prognóstica de pacientes portadores de leucemias agudas e, além disso, avaliar a ocorrência ou não do processo fagocítico. A literatura demonstra que a presença de uma ER deficiente pode ocorrer em outras patologias, como por exemplo em pacientes com cirrose hepática, hiperbilirrubinemia (ARAI et al., 2001), leucemias crônicas (EL-MAALLEM & FLETCHER, 1979). Outros fatores

determinantes, tais como ingestão de álcool, idade avançada, raça e excesso de exercícios físicos podem ocasionar uma produção diminuída de EROs (SIDDIQI et al., 2000; SMITH & WEIDMANN, 1993). Considerando que EROs podem exercer tanto um papel benéfico ao organismo como contribuir para efeitos danosos, é importante a existência de estudos e/ou métodos que sejam capazes de diferenciar anormalidades nas vias de sinalização celular e participação do citoesqueleto neste processo.

Finalmente, este trabalho também deixa várias perspectivas futuras interessantes para serem estudadas: a) avaliar a capacidade de produção de explosão respiratória induzida por bactérias e comparar com o resultado obtido com o zymosan e o PMA; b) avaliar a transdução de sinal em células leucêmicas e c) otimizar métodos para avaliar simultaneamente a fagocitose e morte bacteriana para instalação de rotinas laboratoriais.

## 6 - CONCLUSÕES

- Os granulócitos foram melhor preservados pelo método de eliminação dos eritrócitos com dextrana quando comparado ao método de lise por cloreto de amônio;
- Tanto o estímulo em fase fluida (PMA) quanto particulado (zymosan) foram capazes de induzir a ER, medida pela oxidação da sonda DCFH a um composto fluorescente, DCF;
- Os dois estímulos parecem utilizar mecanismos distintos para induzir a explosão respiratória;
- O cálcio extracelular não interferiu na ER causada pelo PMA, enquanto que o zymosan mostrou ser dependente do cálcio extracelular;
- A integridade dos microfilamentos de actina mostrou ser essencial para o funcionamento do zymosan, mas não do PMA;
- Já os microtúbulos são importantes para a indução da ER pelo PMA, mas não influenciaram esta resposta induzida pelo zymosan;
- Os resultados obtidos na avaliação dos microfilamentos indicam que a ER depende do processo fagocítico;
- A estimulação da ER pelo PMA foi dependente da proteína quinase C, enquanto o zymosan estimulou este processo de maneira independente desta quinase;
- Um estímulo particulado permite a avaliação simultânea do processo fagocítico e da ER mas, em caso de deficiências na fagocitose somente este tipo de estímulo não permite o estudo da ER, já que ambos os fenômenos ocorrem de maneira seqüencial;
- O emprego de ensaios usando os dois tipos de estímulos, permite que sejam avaliados tanto o processo de ER como a fagocitose, uma vez que o PMA atua de maneira independente do processo fagocítico;
- Os granulócitos de pacientes portadores de leucemias agudas mostraram uma ER deficiente, apesar da fagocitose ser normal, sugerindo que as inúmeras infecções que acometem estes pacientes estão relacionadas com uma menor explosão respiratória.

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-MOHANNA, F.A.; PETTIT, E.J.; HALLETT, M.B. Does actin polymerization status modulate Ca<sup>2+</sup> storage in human neutrophils? Release and coalescence of Ca<sup>2+</sup> stores by cytochalasins. **Experimental Cell Research**, v. 234, p. 379-387, 1997.

ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. 4 ed. Garland Science Publishing: New York, 2002.

ARAI, T.M.D.; YOSUNOBU, Y.M.D.; KAMIYA, J.; MASATO, N.M.D.; UESAKA, K.; YUASA, N.M.D.; ODA, K.M.D.; NIMURA, Y.M.D?. Bilirubin impairs bactericidal activity of neutrophils through an antioxidant mechanism *in vitro*. **Journal of Surgical Research**, v. 96, p.107-113, 2001.

BABIOR, B.M. NADPH oxidase: an uptake. **Blood**, v. 93, p. 1464-1476, 1999.

BABIOR, B.M. Phagocytes and oxidative stress. **American Journal of Medicine**, v.109, p.33-44, 2000.

BAIN, B.J.; **Leukemia Diagnosis** A Guide to the FAB classification. Gower Medical Publishing, Lindon, England, 1990.

BARACAT, F.F.; FERNANDES, H.J.; SILVA, M.J. **Cancerologia Atual**. São Paulo: Roca, 2000.

BASS, D.A.; PARCE, W.; DECHATELET, L.R.; SZEJDA, P. SEEDS, M.C.; THOMAS, M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. **Journal of Immunology**, v. 130, p. 1910-1917, 1983.

BASS, D.A.; OLBRAND, P.; SZEJDA, P.; SEEDS, M.C.; McCALL, C.E. Subpopulations of neutrophils with increased oxidative product formation in blood of patients with increased oxidative product formation in blood of patients with infection. **Journal of Immunology**, v. 136, p. 136-141, 1986.

BROSE, N.; ROSENMUND, C. Move over protein kinase C, you've got company: alternative cellular effectors of diacylglycerol and phorbol esters. **Journal of Cell Science**, v. 115, p.4399-4411, 2002.

BODEY, G.P.; RODRIGUEZ V.; CHANG H.Y. Fever and infection in leukemic patients. A study of 494 consecutive patients. **Cancer**, v. 41, p. 1610-1622, 1978.

BORREGAARD, N.; COWLAND, J.B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. **Blood**, v. 89, p. 3503-3521, 1997.

CABANI, A; GRESSIER, B; BRUNET, C. Effect of the protein kinase C inhibitor GF 109 203X on elastase release and burst of human neutrophils. **General Pharmacology**, v. 27, p. 1409-1414, 1996.

CALICH, V; VAZ, C. **Imunologia**, 2.ed. Livraria e Editora Revinter Ltda: São Paulo, p.1-405, 2001.

CASTAGNA, M.; TAKAI, Y.; KOZO, K.; SANO, K.; KIKKAWA, U.; NISHIZUKA. Direct activation of calcium-actived, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257. p. 7847-7851, 1982.

CONDLIFFE, A.M.; KITCHEN, E.; CHILVERS, E.R.; Neutrophil priming: pathophysiological consequences and underlying mechanisms. **Clinical Science**, n. 94, p. 461-471, 1998.

DEVI, G.S.; PRASAD, M.H.; SARASWATHI, I.; RAGHU, D.; RAO, D.N.; REDDY, P.P. Free radicals antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different types of leukemias. **Clinica Chimica Acta**, n. 293, p. 53-62, 2000.

DUSSE, L.M.S. Óxido nítrico: benéfico ou prejudicial?. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 29, p. 207-209, 1997.

DOWNEY, G.P.; CHAN, C. K.; LEA, P. TAKAI, A.; GRINSTEIN, S. Phorbol ester-induced actin assembly in neutrophils: role of protein kinase C. **Journal of Cell Biology**, v.116, p. 695-706, 1992.

DUSI, S.; BIANCA, V.D.; DOMINI, M. NADALINI, K.A.; ROSSI, F. Mechanisms of stimulation of the respiratory burst by TNF in nonadherent neutrophils. **Journal of Immunology**, v. 157, p. 4615-4623, 1996.

EEDEN, S.F.; KLUT, M.E; WALTER, B.A.M; HOGG, J.C. The use of cytometry to measure neutrophil function. **Journal of Immunological Methods**, v. 232, p.23-43, 1999.

EL-MAALLEM, H.; FLETCHER, J. Defective hydrogen peroxide production in chronic granulocytic leukemia neutrophils. **British Journal of Hematology**, v. 41, p.49-55, 1979.

ELBIM, C.; GOURGEROT-POCIDALO, M.A. Priming study of human phagocytes oxidative burst by using flow cytometry. **Hemathology and Cell Therapy**, v. 38, p. 527-535, 1996.

EISERICH, J.P.; HRISTOVA, M.; CROSS, C;E.; JONES, A.D.; FREEMAN, B.A.; HALLIWELL, B.; VLIET A.V. Formation of nitric-derived inflammatory oxidants by mieloperoxidase in neutrophils. **Nature**, v. 22, p. 393-397, 1998.

FAITLOWICZ, A.R. Neutrófilos: novos agentes nos seus mecanismos de ação e aplicações clínicas. **Revista Associação Médica Brasileira**, v. 39, p. 243-248, 1993.

FIERRO I.M.; BARJA-FIDALGO T.C.; CUNHA F.Q.; FERREIRA S.H. The involvement of nitric oxide in the anti-Candida albicans activity of rat neutrophils. **Immunology**, v. 89, p. 295-300, 1996.

GARFIA, C.; GARCÍA-RUIZ, I.; SOLÍS-HERRUZO, A. Deficient phospholipase C activity in blood polymorphonuclear neutrophils from patients with liver cirrhosis. **Journal of Hepatology**, v. 40, p. 749-756, 2004.

GOLDSBY, R.A.; KINDT, J.T.; OSBORNE, B.A.; KUBY, J. **Immunology**, 5 ed. W.H. Freeman and Company: New York, p.1-551, 2003.

GRANFELDT, D.; DAHLGREN, C. An intact cytoskeleton is required for prolonged respiratory burst activity during neutrophil phagocytosis. **Inflammation**, v. 25, p.165-169, 2001.

HAMPTON, M.B.; KETTLE, A.J.; WITERBOURN, C.C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood**, v. 92, p. 3007-3017, 1998.

HAZAN, I.; DANA, R.; GRANOT, Y.; LEVI, R. Cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> and its mode of activation in human neutrophils by opsonized zymosan. **Biochemical Journal**, v. 326, p. 867-876, 1997.

HAUGEN, T.S.; SKJONSBERG, O.H.; KÄHLER, H.; LYBERG, T. Production of oxidants in alveolar macrophages and leukocytes. **European Respiratory Journal**, v. 14, p. 1100-1105, 1999.

HALEVY-HAZAN, I.; SEGER, R.; LEVY, R. The requirement of both extracellular regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase for stimulation of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> activity by either Fc $\gamma$ R1IIIA or Fc $\gamma$ R1IIIB in human neutrophils. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 12416-12423, 2000.

HEATH, G.W.; MACERA, C.A.; NIEMAN, D.C. Exercise and upper respiratory tract infections: is there a relationship? **Sports Med.** v.14, p.353-356, 1992.

HOFFBRAND, A.V.; PETTI, J.E. **Hematologia Clínica Ilustrada**. São Paulo: Manole, p.1-550, 2001.

IMIRICH, A.; KOBZIK, L. Fluorescence-based measurement of nitric oxide synthase activity in activated rat macrophages using dichlorofluorescein. **Nitric Oxide**, v. 4, p. 359-369, 1997.

JACOBSON, P. B.; KUCHERA, A.M.; SCHACHTELE, C.; IMRE, K.; SCHRIER, D.J. Anti-inflammatory properties of Gö 6850: a selective inhibitor of protein kinase C. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 275, p. 995-1002, 1995.

JAKUBOWSKI, W.; BARTOSZ, G. 2,7-dichlorofluorescein oxidation and reactive oxygen species: what does it measure? **Cell Biology International**, v. 10, p. 757-760, 2000.

JACONI, M.E.; THELER, J.M.; SCHLEGEL, W.; LEW, P.D. Cytosolic Ca<sup>2+</sup> signals in single adherent human neutrophils: generation and functional role. **European Journal of Pediatrics**, v.152, p. 26-32, 1993.

KASE, H.; IWAHASHI, K.; NAKANISHI, S.; MATSUDA, Y.; TAKAHASHI, M.; MURAKATA, C.; SATO, A.; TOKIO, A.M. K-252 compounds, novel and potent inhibitors of protein kinase C and cyclic nucleotide-dependent protein kinases. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 142, p. 436-440, 1987.

KARLSSON, A.; DAHLGREN, C. Assembly and activation of the NADPH oxidase in granule membranes. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 4, p. 49-60, 2002.

KARLSSON, A.; DAHLGREN, C. Respiratory burst in human neutrophils. **Journal of Immunological Methods**, v. 232, p.3-14, 1999.

LEVY R.; DANA R.; LETO T.L.; MALECH H.L. The requirement of p47 phosphorylation for activation of NADPH oxidase by opsonized zymosan in human neutrophils. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1220, p. 253-260, 1994.

LEHMANN, A.K.; SORNES, S.; HALSTENSEN, A. Phagocytosis: measurement by flow cytometry. **Journal of Immunology Methods**, v. 243, p. 229-242, 2000.

LIU, Q.; SUZUKI, K.; KUDO, M.; KOWATARI, T.; UMEDA, T.; NAKAJI, S.; SUGAWARA, Effect of decaglycerol monooleat on phagocytosis and respiratory burst activity of human neutrophils: an *in vitro* study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p.423-428, 2000.

LIU, Q.; SHIMOYAMA, K.; SUZUKI, K.; UMEDA, T.; NAKAJI, S.; SUGAWARA, K. Effect of sodium butyrate on reactive oxygen species generation by human neutrophils. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 7, p.744-750, 2001.

LORENZI, T.F. **Manual de Hematologia Propedêutica e Clínica**, Rio de Janeiro: Medsi Editora Médica e Científica, 1992, p.1-500.

MACKAY, I.R.; FRED, S.; ROSEN, F.S. Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. **Advances in Immunology**, v. 343, p.1703-1712, 2000.

MISHELL, B.B.; SHIIGI, S.M. **Selected methods in cellular immunology**. New York: W. H. Freeman Company, p.1-469. 1980.

MILLER, K.B; GRODMAN, H.M. **Leukemia**. Oxford, Ed. Blackwell science, 3 ed., 1998.

NAUSEEF, W.M.; VOLPP, B.D.; Mc-CORMICK, S.; LEIDAL, K.G.; CLARK, R.A. Assembly of the neutrophil respiratory burst Oxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 5911-5917, 1991.

NIWA, Y.; OZAKI, Y.; KANO, T.; KURIZAKA, M. Production of superoxide and induction of scavenging enzymes in human leucocytes. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 79, p. 303-313, 1996.

NEWTON, A. Protein kinase C: structural and special regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. **Chemical Reviews**, v.101, p. 2353-2364, 2001.

OHASHI, T.; MIZUTANI, A; MURAKAMI, A; KOJO, S; ISHII, S. T. Rapid oxidation of dichlorodihydrofluorescein with heme and hemoproteins: formation of the fluorecein is independent of the geration of reactive oxygen species. **FEBS Letters**, v. 551, p. 21-27, 2002.

OHNO, S.; NISHIZUKA, Y. Protein kinase C isotypes and their specific functions: prologue. **Journal Biochemistry**, v. 132, p. 509-511, 2002.

PACKMAN C.H.; LICHTMAN M.A. Activation of neutrophils: measurement of actin conformational changes by flow cytometry. **Blood Cells**, v. 16, p.193-205, 1990.

POWELL, B. L.; OLBRANTZ, P.; BICKET, D.; BASS, D.A. Altered oxidative product formation in neutrophils of patients recovering from therapy for acute leukemia. **Blood**, v. 67, p. 1624-1630, 1986.

POSSEL, H.; NOACK, H.; AUGUSTIN, W.; KEILHOFF, G.; WOLF, G. 2,7-dihydrodichlorofluorescein diacetate as a fluorescent marker for peroxynitrite formation. **FEBS Letters**, v. 416, p. 175-178, 1997.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**, 4.ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, p. 1-703, 2001.

ROBINSON, J.P.; CARTER, W.O.; NARAYANAN, P. **Manual of Clinical Laboratory Immunology**, Funcional assays by flow cytometry. 2. ed. p. 1-1001, 1995.

ROBINSON, J. P. Oxygen and nitrogen reactive metabolites and phagocytic cells. In: Robinson J.P. and Babcoc G.F, Eds. **Phagocyte function: a guide for research and clinical evaluation**, Wiley-Liss: New York, p. 217-252, 1998.

SCHIFF, P.B ; FANT, J.; HORWITZ, S.B. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. **Nature**, v. 22, p. 665–667, 1979.

SAMUELSSON, J.; FORSLID, J.; HED, J.; PALMBLAD, J. Studies of neutrophil and monocyte oxidative responses in polycythaemia vera and related myeloproliferative disorders. **British Journal of Haematology**, v. 87, p. 464-470, 1994.

SCROFERNEKER, M.L; POHLMANN, P.R. **Imunologia Básica e Aplicada**, Porto Alegre: Sagra Luzzato,1998.

SCHOPF, R.E; MATTAR, J; MEYENBURG, W; SCHEINER, O; HAMMANN, K.P; LEMMEL, E.M. Measurement of the respiratory burst in human monocytes and polimorphonuclear leukocytes by nitro blue tetrazolium reduction and chemiluminescence. **Journal of Immunological Methods**, v. 67, p. 109-117, 1984.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, p. 385-405, 2004.

SIDDIQI, M.; GARCIA, Z.C.; STEIN, D.S.; DENNY, T.N.; SPOLARICS, Z. Relationship between oxidative burst Activity and CD11b expression in neutrophils and monocytes from healthy individuals: effects of race and gender. **Cytometry**, v. 46, p. 243-246, 2000.

SKLAR, L.A.; HYSLOP, P.A.; OADES, Z.G.; OMANN, G.M.; JESAITIS, A.J.; PAINTER, R.G.; COCHRANE, C.G. Signal transduction and ligand-receptor dynamics in the human neutrophil. Transient responses and occupancy-response relations at the formyl peptide receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 260, p. 11461-11467, 1985.

SMITH, J.A.; WEIDMANN, M.J. Further characterization of neutrophil oxidative burst by flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 162, p. 261-268, 1993.

SZEJDA, P.; PARCE, J.W.; SEEDS, M.S.; BASS, A.D. Flow cytometry quantitation of oxidative product formation by polymorphonuclear leukocytes during phagocytosis. **Journal of Immunology**, v.133, p. 3303-3307, 1984.

TORRES, M; COATES, D.T. Function of the cytoskeleton in human neutrophils and methods for evaluation. **Journal of Immunological Methods**, v. 232, p. 89-109, 1999.

TREVES S.; DI VIRGILIO F. VASELLI G.M.; POZZAN, T. Effect of cytochalasins on cytosolic-free calcium concentration and phosphoinositide metabolism in leukocytes. **Experimental Cell Research**, v. 168, p. 285-298, 1987.

TSAI, M.A.; WAUGH, R.E.; KENG, P.C. Passive mechanical behavior of human neutrophils: effect of colchicine and paclitaxel. **Biophysical Journal**, v. 74, p. 3282-3291, 1998.

TWOMEY, B.; MUID, R.E.; NIXON, J.S.; SEDGWICK, A.D.; WILKINSON, S.D.; DALE, M.M. The effect of new potent selective inhibitors of protein kinase C on the neutrophil respiratory burst. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 171, p. 1087-1092, 1990.

VUORTE, J.; JANSSON, S.E.; REPO H. Evaluation of red blood cell lysing solutions in the study of neutrophil oxidative burst by the DCFH assay. **Cytometry**, v. 43, p. 290-296, 2001.

VUORTE, J.; JANSSON, S.E.; REPO H. Standartization of a flow cytometric assay for phagocyte respiratory burst activity. **Scandinavian Journal of immunology**, v.43, p. 329-334, 1996.