

WILSON MITSUO TATAGIBA KUWABARA

***PARTICIPAÇÃO DO ESTRESSE DE RETÍCULO
ENDOPLASMÁTICO NO PROCESSO DE MORTE
CELULAR EM NEUTRÓFILOS DE RATOS DIABÉTICOS***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2013

WILSON MITSUO TATAGIBA KUWABARA

**PARTICIPAÇÃO DO ESTRESSE DE RETÍCULO
ENDOPLASMÁTICO NO PROCESSO DE MORTE
CELULAR EM NEUTRÓFILOS DE RATOS DIABÉTICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração:
Fisiologia Humana

Orientadora:
Dra. Tatiana Carolina Alba Loureiro

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Kuwabara, Wilson Mitsuo Tatagiba.

Participação do estresse de retículo endoplasmático no processo de morte celular de neutrófilos de ratos diabéticos / Wilson Mitsuo Tatagiba Kuwabara. – São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Tatiana Carolina Alba Loureiro.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Metabolismo e função de neutrófilos.

Versão do título para o inglês: The role of the endoplasmatic reticulum in the process of death of neutrophils from diabetic rats.

1. Neutrófilos 2. Diabetes mellitus 3. Reticulo endoplasmático
I. Loureiro, Profa. Dra. Tatiana Carolina Alba II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0124/2013

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Candidato(a): **Wilson Mitsuo Tatagiba Kuwabara.**

Título da Dissertação: **Participação do estresse de retículo endoplasmático no processo de morte celular de neutrófilos de ratos diabéticos.**

Orientador(a): **Profa. Dra. Tatiana Carolina Alba Loureiro.**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a / /, considerou

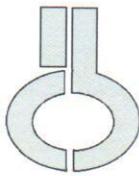
Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **109** nas fls. **108** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Tatiana Carolina Alba Loureiro**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Participação do stress de retículo no processo de morte celular em neutrófilos de ratos diabéticos*" do qual participam o(s) aluno(s) **Wilson Mitsuo Tagagiba Kuwabara e o pesquisador, Rui Curi**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **19.09.2011, com validade de 3 anos.**

São Paulo, 22 de setembro de 2011.

Prof.Dr.WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

Dedico este trabalho,

Primeiramente à Deus pela oportunidade, pelas condições e pela constante ajuda.

Aos meus pais, Carmen e Wilson, por estarem sempre ao meu lado me apoiando e me incentivando a ser melhor e a fazer o melhor. Pela paciência ininterrupta, pelas orações, pelo amor... pela vida.

Aos meus irmãos, Mayumi e Yoiti, por receberem sempre de braços abertos esse irmão muitas vezes ausente.

Aos grandes companheiros de jornada, Bruno Micheloni, Caroline Mendes, Cláudia Hayashi, Erlando Schmidt, Leandro Santoro, Rafael Prévile, por estarem sempre presentes na hora de um conselho, de um abraço ou de uma simples conversa. Pela paciência, pela compreensão, pela ajuda e pelo interesse em minha vida. Pela amizade.

À Tatí, pela minha construção e formação profissional. Pela infinita dedicação, paciência, compreensão e orientação. Pela liberdade de expressão, pelo incentivo e acima de tudo pela amizade.

Serei eternamente grato.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Tatiana Carolina Alba Loureiro por ter me ensinado e me guiado desde sempre. Pelo exemplo de dedicação e amor a pesquisa, pelo constante incentivo e principalmente pelo companherismo e amizade nessa complicada jornada.

Ao Prof. Dr. Rui Curi pelas aulas da graduação que me incentivaram a procurar a pesquisa e por me receber de braços abertos em seu laboratório. Pelo incentivo e apoio.

Aos meus pais, pelo suporte psicológico e também financeiro.

Aos amigos do GRUI que me ajudaram e ensinaram muito.

À FAPESP pelo suporte financeiro.

“Estamos na situação de uma criancinha que entra em uma imensa biblioteca, repleta de livros em muitas línguas. A criança sabe que alguém deve ter escrito aqueles livros, mas não sabe como. Não comprehende as línguas em que foram escritos. Tem uma pálida suspeita de que a disposição dos livros obedece a uma ordem misteriosa, mas não sabe qual ela é”.

Albert Einstein

RESUMO

KUWABARA, W. M. T. Participação do estresse de retículo endoplasmático no processo de morte celular de neutrófilos de ratos diabéticos. 2013. 90 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O retículo endoplasmático (RE) vem ganhando evidência quando se trata de morte celular. Esta organela pode entrar em estresse devido a má formação de proteínas, falta de ATP, perturbações da sinalização de cálcio e alterações no estado redox. O acúmulo de proteínas mal formadas inicia a ativação da cascata de sinalização conhecida como o *Unfolded Protein Response* (UPR), desencadeando a ativação de *Inositol-Requiring kinase 1a* (IRE1a), *double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase* (PERK) e *Activating transcription factor 6* (ATF6) com a finalidade de manter a homeostasia do RE. Porém, quando o estímulo do estresse perdura por muito tempo e não é resolvido, a UPR pode ativar genes que conduzem à morte celular. A hiperglicemia, presente no *diabetes mellitus*, pode causar estresse de RE em vários tipos celulares, como células β pancreáticas, osteoblastos e cardiomiócitos. Assim, este estudo teve como objetivo investigar o possível envolvimento do estresse do retículo no processo de morte celular em neutrófilos de ratos diabéticos. O estresse de retículo foi avaliado pela expressão de genes-chave: GRP78, IRE-1, Perk, ATF-6 por PCR tempo real; pelo conteúdo de proteínas relacionadas à via PERK: PERK, eIF2a, p-eIF2a, ATF4, CHOP e GADD34; pelo conteúdo de pJNK, uma proteína relacionada à morte celular que é ativada pela via do IRE1 α ; pelo o conteúdo do ATF6 e pelo splicing de XBP1, resultante da atividade de IRE1 α . Além disso, foi avaliada a expressão gênica de proteínas da MAM relacionadas à associação entre o RE e mitocôndria, Mitofusina 2, GRP75 e PACS2. A atividade de caspase 3 por espectrofluorimetria e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por quimioluminescência também foram avaliados. Observou-se maior expressão de GRP78 (BIP) em neutrófilos do grupo controle estimulado com PMA e maior expressão de IRE1 α nos neutrófilos dos grupos diabético e controle estimulados. No entanto, o aumento do IRE1 α também foi observado em neutrófilos não estimulados do grupo diabético. Este mesmo padrão foi observado na expressão do gene CHOP. O conteúdo de p-eIF2 α foi maior em neutrófilos do grupo controle sem estímulo e as outras proteínas da via da PERK não se mostraram alteradas. Expressão gênica das proteínas da MAM foi maior em neutrófilos do grupo controle após estímulo com PMA. O conteúdo de CHOP, bem como o de pJNK, apresentaram-se aumentados em neutrófilos do grupo diabético. Finalmente, a atividade da caspase 3 e a razão Bax/Bcl2 estão maiores em neutrófilos do grupo diabético estimulados com PMA. Em resumo, nosso estudo revelou que os neutrófilos de ratos diabéticos quando estimulados com PMA apresentam uma maior suscetibilidade à morte devido à ativação de IRE1a e subsequente fosforilação de JNK, redução na interação mitocôndria-RE na MAM e aumento da atividade da caspase-3. Concluímos também que estas alterações não foram devido as EROs, pois tanto neutrófilos de animais controle e diabético apresentam o mesmo perfil de produção dessas espécies quando estimulados com PMA. Dentre os resultados apresentados, neutrófilos provenientes de animais controle parecem estar protegidos do estresse de RE por apresentar maior expressão de GRP78 e das proteínas da MAM.

Palavras-chave: Neutrófilos. Estresse de retículo endoplasmático. *Diabetes mellitus*. MAM. Caspase 3.

ABSTRACT

KUWABARA, W. M. T. **The role of the endoplasmatic reticulum in the process of death of neutrophils from diabetic rats.** 2013. 90 p. Masters thesis (Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Endoplasmic reticulum (ER) has been gaining evidence when it comes to cell death. This organelle may go under stress conditions due to changes in protein formation, lack of ATP, disturbances in calcium signaling and alterations in the redox state. The accumulation of unfolded proteins initiates the activation of the Unfolded Protein Response (UPR). Currently, it is well established that the ER stress response is due to activation of three ER components: Inositol-Requiring kinase 1 α (IRE1 α), double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase (PERK) and Activating transcription factor 6 (ATF6). The UPR may resolve the ER stress by upregulating genes responsible to maintain the ER homeostasis; or it can activate genes that lead to the cell death when the ER disbalance is not solved. Hyperglycemia, one of many symptoms observed is Diabetes, may cause ER stress in various types of cells, for instance, pancreatic β -cells, osteoblasts and cardiomiocytes. Thus, this study aims to investigate the possible involvement of the ER stress in the process of cell death in neutrophils from diabetic rats. ER stress was evaluated by the expression of key genes: GRP78 (Bip), IRE-1, PERK, ATF-6 by PCR real time; the content of proteins related to the PERK pathway: PERK, eIF2 α , p-eIF2 α , ATF4, CHOP and GADD34; the content of pJNK, a protein related to cell death that is activated by IRE1 α pathway; the content of ATF6 and sXBP1 resulted from the IRE1 α activity. Also, the gene expression of MAM proteins related to the association between ER and mitochondria, Mitofusin 2, GRP75 and PACS2, were evaluated. MAM is related to the ER homeostasis and is very important for calcium and ATP exchange between these two organelles. Finally, activity of caspases 3 by spectrofluorimetry and ROS production by chemoluminescence, using luminol, were measured. We observed higher expression of GRP78 (Bip) in the control group and higher expression of IRE1 α in the diabetic and control group when they were stimulated with PMA. However, increase in IRE1 α was observed in the non-stimulated state only in the diabetic group. This same pattern was observed in CHOP gene expression. The content of p-eIF2 α was higher in the control group without stimulus and the other proteins of the PERK pathway showed no alteration. Gene expression of the MAM proteins was higher in the control group when neutrophils were stimulated with PMA. CHOP content was increased in the diabetic group. Finally, Caspase 3 activity and the reason Bax/Bcl2 were higher in the diabetic group stimulated with PMA. In summary, our study found that neutrophils from diabetic rats when stimulated with PMA exhibit greater susceptibility to death due to activation of IRE1 α and subsequent phosphorylation of JNK, reduced safety in mitochondria-ER interaction in the MAM compartment and increased caspase-3 activation. We also conclude that these changes were not altered by ROS, since the two groups, control and diabetic, have the same profile of these species production when stimulated with PMA. Control group seems to be protect against the ER stress by ROS production by higher expression of GRP78 and MAM proteins.

Keywords: Neutrophils. Endoplasmic reticulum stress. Diabetes mellitus. MAM. Caspase 3.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Sinalização por IRE1 α	26
Figura 2- Sinalização por PERK.....	27
Figura 3- Sinalização por ATF6.....	28
Figura 4- Complexo enzimático NADPH oxidase.....	29
Figura 5- Proteínas que participam na regulação da MAM.....	32
Figura 6- Ganho de peso (A), Glicemia (B) e Número de neutrófilos (C) dos grupos estudados.....	44
Figura 7- Fotomicrografia de neutrófilos para detecção do estresse de RE através de imunofluorescência.....	45
Figura 8- Expressão gênica da chaperona GRP78 (BIP) por qPCR.....	46
Figura 9- Expressão gênica dos componentes da UPR IRE1- α (A), PERK (B) e ATF6 (C) por qPCR.....	46
Figura 10- Expressão gênica do fator de transcrição CHOP por qPCR.....	47
Figura 11- Expressão gênica das proteínas reguladoras da MAM: Mitofusina-2 (A), PACS2 (B) e GRP75 (C) por PCR.....	47
Figura 12- Expressão gênica da razão Bax/Bcl2 por qPCR.....	48
Figura 13- Conteúdo das proteínas relacionadas à via da PERK da UPR.....	49
Figura 14- Splicing de XBP1(A) e fosforilação da proteína JNK (B), eventos decorrentes da ativação de IRE1 α	50
Figura 15- Conteúdo de ATF6.....	51
Figura 16- Conteúdo de mitofusina 2.....	51
Figura 17- A produção de EROs por neutrófilos através de quimiluminescência e a ação dos inibidores da NADPH oxidase.....	52
Figuras 18- Atividade das Caspases 3 em neutrófilos.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

- A1- *Bcl-2-related protein A1*
AIF - *Apoptosis Inducing Factor*
Apaf-1 - *Apoptotic Protease Activating-Factor 1*
APO-1 - *apoptosis antigen 1*
ASC- *Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*
ASK1- *Apoptosis signal-regulating kinase 1*
ATF4- *Activating Transcription Factor 4*
ATF6- *Activating Transcription Factor 6*
ATG7- *Autophagy related 7*
ATP- *Adenosine Triphosphate*
Bad - *Bcl-2-associated death promoter*
Bak- *Bcl-2 homologous antagonist/killer*
Bax- *Bcl-2-associated X protein*
Bcl - *B-cell lymphocytic-leukaemia proto-oncogene*
BH - *Bcl-2 Homology regions*
Bid- *BH3 interacting-domain death agonist*
Bim- *Pro-apoptotic BCL-2 family member*
Blk- *B lymphocyte kinase*
Bmf- *Bcl-2-modifying factor*
Bnip3L- *Bcl2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like*
Bok (Mtd)- *Bcl-2 related ovarian killer*
CARD- *C-terminal caspase-recruitment domain*
CD95 - *cluster of differentiation 95*
CHOP- *CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein*
CINC2- *Chemokine (C-X-C motif) ligand 2*
COX- *Cyclooxygenase*
CREB- *cAMP responsive element binding protein*
DNA- *Deoxyribonucleic acid*
EDEM- *ER-degradation enhancer mannosidase alfa-like 1*
EDTA - *ácido etilenodiaminotetracético*
eIF2 α - *eukaryotic translation factor 2 α*
EndoG - *Endo-nuclease G*

ERAD- *Endoplasmatic reticulum associated degradation*
ERK- *Extracellular signal-regulated kinases*
EROs - *espécies reativas de oxigênio*
ERp44- *Endoplasmatic reticulum protein 44kDa*
ERp57- *Endoplasmatic reticulum protein 57kDa*
Fas- *Apoptosis Stimulating Fragment (programmed cell death)*
FasL - *Fas ligante*
GADD34- *Growth arrest and DNA damage-inducible protein*
GDP - *Guanosine Diphosphate*
GEF- *Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF)*
GRP75- *Glucose regulated protein 75kDa*
GRP78- *Glucose regulated protein 78kDa*
GRP94- *Glucose regulated protein 94kDa*
GTP - *Guanosine Triphosphate*
HRK- *Activator of apoptosis harakiri*
HtrA2/Omi - *High Temperatute Requirement A2/ stress-regulated endoprotease*
ICAM - *Intercellular Adhesion Molecule*
IFN- γ - *interferon-gama*
IgG - *imunoglobulina G*
I- κ B α - *inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase α*
IL- *Interleukin*
iNOS - *inducible NOS*
IP3R- *inositol 1,4,5-trisphosphate receptor*
IRE1- *Inositol-requiring kinase 1*
LPS – *lipopolissacarídeo*
Mcl-1- *Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1*
mRNA- *messenger Ribonucleic acid*
NAD+- *Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo*
NADPH - *Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzida*
NbK/Bik- *natural born killer/Bcl-2-interacting killer*
NF- κ B- *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
NOD- *Nucleotide-binding oligomerization domain receptors*
NOS- *nitric oxide synthases*
Noxa- *Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*

PACS2- *phosphofurin acidic cluster sorting protein 2*
PAMPs- *Pathogen-associated molecular patterns*
PDI- *Protein Disulfide Isomerase*
peIF2 α - *phosphorilated eIF2 α* -
PERK- *Double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase*
PG - *prostaglandina*
PKC- *Protein Kinase C*
PMA – *Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*
PMNs- Polimorfonucleares
PREX1- *phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchange factor 1*
Puma- *p53 upregulated modulator of apoptosis*
PYCARD- *PYD and CARD domain containing protein*
Rac2- *ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, small GTP binding protein Rac2)*
RAP1- *member of RAS oncogene family*
RE- Retículo Endoplasmático
RhoGDI- *Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha*
RNA- *Ribonucleic acid*
S1P- *Site 1 protease*
S2P- *Site 2 Protease*
SERCA- *sarco/endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase*
Smac/ Diablo - *Second Mitochondrial Derived Activator of Caspases/ Direct IAP Binding protein with Low pI*
SOD - *Ssuperóxido dismutase*
sXBPI- *Spliced XBPI*
TGF- β 1 - *Transforming Growth Factor- β 1*
TMB - *3,3',5,5'-tetramethylbenzidine*
TNF - *Tumor Necrosis Factor*
TNFRs - *Tumor Necrosis Factor Receptors*
TRAF2- *TNF receptor-associated factor 2*
TRPP2- *Transiente Receptor Potential Protein 2*
XBPI- *X-box binding protein*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Diabetes mellitus e Neutrófilos.....	15
1.2 Morte Celular.....	20
1.3 Estruturas que participam da morte celular em Neutrófilos.....	23
2 JUSTIFICATIVA.....	33
3 OBJETIVOS.....	34
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 Animais.....	35
4.2 Indução ao Diabetes mellitus.....	35
4.3 Obtenção das células.....	35
4.4 Cultura celular.....	36
4.5 Delineamento experimental.....	36
4.6 Imunofluorescência para detecção do estresse de RE.....	37
4.7 PCR em tempo real.....	37
4.7.1 Extração de RNA.....	37
4.7.2 Reação transversa (RT).....	38
4.7.3 Real Time Polymerase Chain Reaction (Real time PCR).....	38
4.7.4 XBP-1 mRNA Splicing.....	39
4.8 Western Blotting.....	40
4.9 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio.....	40
4.10 Atividade de caspase por espectrofluorescência.....	41
4.11 Análise estatística.....	41
5 RESULTADOS.....	42
6 DISCUSSÃO.....	54
REFERÊNCIAS.....	60
APÊNDICE.....	75
APÊNDICE A- Membranas coradas componceau para normalização das bandas.....	75
APÊNDICE B- Trabalho submetido à PLoS ONE referente ao projeto BEPE.....	76

1 INTRODUÇÃO

1.1 Neutrófilos e Diabetes mellitus

Os leucócitos polimorfonucleares (PMNs) são as células brancas mais abundantes em humanos e corroboram na composição do sistema imune inato. Os neutrófilos são células fagocitárias que agem na primeira linha de defesa do organismo contra os microrganismos invasores e capazes de sintetizar citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e interferons (CASSATELA et al., 1999). Os neutrófilos possuem função importante na iniciação e sustentação do processo inflamatório, além de contribuir na regulação das reações imunes (SAVILL; HASLETT, 1995).

A resposta neutrofílica à lesão compreende a aderência destas células ao endotélio de vênulas pós-capilares (marginação leucocitária), a migração das células aderentes para o exterior do vaso, através de junções interendoteliais (diapedese), seu deslocamento no sítio extravascular (quimiotaxia) e subsequente acúmulo no sítio de lesão. Estes eventos dependem de duas propriedades fundamentais da célula: adesão e locomoção (TONNESEN, 1989).

Após a migração, os neutrófilos entram em contato com a partícula ou microrganismo invasor, o que promove a extensão do pseudópode e o englobamento da partícula, formando o fagossomo (MUDD et al., 1934). A capacidade de englobamento dos fagócitos é influenciada por moduladores (GILES et al., 2000) incluindo citocinas (FRANC; WHITE; EZEKOWITZ, 1999), prostaglandinas (REN; SAVILL, 1995), hormônios (ROSSI et al., 1998), endotoxinas (PAAPE et al., 2000) e metabólitos (VANHOLDER et al., 1993a, b). No entanto, a diminuição da capacidade fagocitária pode ser uma das causas para o aumento da predisposição à infecções em algumas patologias e condições de estresse (DJALDETTI et al., 2002).

As complexas vias de sinalização promovidas pelo englobamento de partículas ou microrganismos invasores levam a fusão de grânulos, ricos em proteases, com o fagossomo. A desgranulação no fagolisossomo ou no espaço extracelular são eventos-chave para a atividade microbicida (BERTON, 1999); mas, além das enzimas e proteínas liberadas pelos grânulos, a ação microbicida dos neutrófilos também depende da ativação da oxidase dependente de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzida (NADPH) (ROSSI; ZATTI, 1964) e, consequentemente, da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) que incluem o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl)

e radical hidroxil (OH) (BABIOR; KIPNES; CURNUTTE, 1973; FANTONE; WARD, 1982).

A resposta inflamatória aguda apresenta um “programa de parada” endógeno que visa limitar a destruição tecidual. A morte celular dos neutrófilos e a sua ingestão pelos macrófagos são os principais mecanismos para retirar os neutrófilos que recrutaram para o sítio de inflamação e, então, promover o término do processo inflamatório (SAVILL; HASLETT, 1995). Dessa maneira, alterações no processo de morte celular podem ser responsáveis pela permanência da resposta inflamatória causando prejuízo tecidual (PRINCE et al., 2011).

Alterações funcionais dos neutrófilos são encontradas em várias patologias, dentre elas a granulomatose de Wegener (WITKO-SARSAT; REUTER; MOUTHON, 2010), doença granulomatosa crônica (DINAUER et al., 1992), síndrome de Sweet (YI et al., 2009), artrite reumatoide (NÉMETH, 2012), lupus eritematoso (KAPLAN, 2011) e *diabetes mellitus*, entre outros.

O *diabetes mellitus* é caracterizado pela alta glicemia (hiperglicemia) devido a uma disfunção na secreção de insulina e/ou pela resistência periférica a este hormônio, acarretando alterações no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (COURTEN; HODGE; ZIMMET, 1998; WOLFF, 1993).

O *diabetes mellitus* pode ser, prevalentemente classificado em dois tipos: tipos 1 e 2 (ADA, 1997). O tipo 1 resulta da perda progressiva da capacidade das células β pancreáticas em produzirem insulina, mediada por resposta auto-imune órgão-espécifica (ATKINSON; MACLAREN, 1994; KUKREJA; MACLAREN, 1999). O tipo 2 é caracterizada pela resistência periférica à insulina, perda na capacidade de regulação da produção de glicose hepática e declínio da função da célula β , eventualmente ocasionando a falência celular (OLEFSKY, 1989).

No *diabetes mellitus* há varias complicações metabólicas, como elevada produção hepática de glicose por glicogenólise e gliconeogênese, diminuição da utilização de glicose pelo músculo esquelético e tecido adiposo, aumento da lipólise e oxidação de ácidos graxos (BONADONNA; DE FRONZO, 1991). Além dessas complicações, existem também as alterações micro e macro-vasculares que acarretam uma redução da resposta inflamatória (GEERLINGS et al., 1999).

Estudos dos leucócitos na vigência do *diabetes mellitus* vêm sendo desenvolvidos, desde a década de 70 nos quais são verificadas alterações funcionais e metabólicas

importantes em neutrófilos de pacientes diabéticos tipo 1. Em 1971, Mowat e Baum observaram diminuição do movimento quimiotáxico de neutrófilos em pacientes com diabetes mellitus. Tan et al., em 1975, correlacionaram o aumento da susceptibilidade de pacientes diabéticos à infecção com a capacidade bactericida ineficiente dos neutrófilos. Em 1978, Nolan et al. verificaram diminuição da fagocitose por granulócitos em pacientes com diabetes não controlado.

Os estudos continuaram na década de 80, nos quais se verificou que o burst oxidativo estava diminuído no neutrófilo de pacientes com diabetes mellitus (MARKERT et al., 1984; SAGONE et al., 1983; WILSON, 1986); e que a glicose e os corpos cetônicos influenciam esta função neutrofílica através da via dos polióis (WILSON; REEVES, 1986). Nesta via atuam duas enzimas importantes: a primeira, aldose redutase, reduz glicose a sorbitol e utiliza o NADPH como co-fator, e a segunda, sorbitol desidrogenase, utiliza *nicotinamida adenina dinucleotídeo* (NAD⁺) como co-fator e converte sorbitol em frutose. Como clinicamente se observava diminuição da resistência à infecção no diabetes, características gerais destas células, como fagocitose, capacidade bactericida e produção de ânion superóxido foram investigadas (NIELSEN; HINDSON, 1989; REPINE et al., 1980; WIERUSZ-WYSOCKA et al., 1985). Em alguns casos, o estudo foi restrito a infecções mais comuns nestes pacientes, como àquelas causadas por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (MARKERT et al., 1984; RAYFIELD et al., 1982). No final da década de 80 e início da de 90, demonstrou-se ocorrer diminuição da adesão dos neutrófilos ao endotélio e, consequentemente, da migração neutrofílica, o que estaria envolvida na baixa resistência à infecção no diabetes (ANDERSEN; GOLDSMITH; SPAGNUOLO, 1988; FORTES et al., 1991; PEREIRA et al., 1987; SANNOMIYA et al., 1990).

A inibição da quimiotaxia de leucócitos, associada ao estado diabético, é um evento de instalação precoce. A migração de neutrófilos para o foco da lesão encontra-se diminuída, em modelo de pleurisia, 3 dias após a indução do *diabetes mellitus*, coincidindo com o aparecimento de uma proteína de (12 kDa), no plasma, com efeito inibitório sobre a quimiotaxia. O tratamento relativamente prolongado (12 dias) dos animais com insulina resulta na recuperação gradual da quimiotaxia avaliada *in vivo*, em modelo de pleurisia por análise em microscopia intravital, e *in vitro* por análise em câmara de Boyden. Tratamentos agudos (3 dias) são inefetivos (PEREIRA et al., 1987; SANNOMIYA et al., 1990).

Utilizando-se da técnica de microscopia intravital, Fortes et al. (1991) verificaram que o número de leucócitos em contato com o endotélio vascular (*rolling behavior*) encontra-se marcadamente reduzido em ratos diabéticos. Entretanto, o número de leucócitos circulantes

não está alterado. Sob influência de um estímulo inflamatório, leucócitos migram para o tecido perivascular de animais controles e este evento acompanha-se de redução no número de células que rolam sob o endotélio (*rollers*). Nos animais diabéticos, o número de leucócitos em *rolling behavior* não se altera e esse pequeno número de células migra para o tecido conectivo adjacente. A interação alterada leucócito-endotélio não é observada em animais diabéticos tratados com insulina (FORTES et al., 1991). As alterações da interação leucócito-endotélio no diabetes mellitus associam-se à presença da proteína (>12kDa), que por sofrer reação de glicação (SANNOMIYA et al., 1997), apresenta atividade inibitória sobre a expressão da molécula de adesão denominada *Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1) em células endoteliais de vênulas pós-capilares (ANJOS-VALLOTA et al., 1999).

A capacidade de resposta leucocitária a gradientes de concentração de estímulos quimiotáxicos é essencial para a defesa do hospedeiro contra microrganismos invasores (WARD, 1974). Alterações na quimiotaxia, quando presentes, tornam o paciente diabético mais suscetível à infecções. A diminuição da quimiotaxia nesses pacientes (DELAMAIRE et al., 1997; GEERLINGS; HOEPELMAN, 1999), pode ser consequência da hiperglicemia (WIERUSZ-WYSOCKA et al., 1988), embora Tater et al. (1987) não tenham demonstrado correlação entre quimiotaxia e valores glicêmicos.

Neutrófilos de pacientes com diabetes mellitus tipo 1 apresentam diminuição da capacidade fagocítica (DELAMAIRE et al., 1997; MARHOFFER et al., 1992; WALRAND et al., 2004). Contudo, Tater et al. (1987) e Balasoiu et al. (1997) não encontraram a mesma alteração. A atividade bactericida exercida pelos neutrófilos apresenta-se diminuída em pacientes diabéticos (GALLACHER et al., 1995; WALRAND et al., 2004). Por sua vez, vários pesquisadores (GALLACHER et al., 1995; NIELSON; HINDSON, 1989; OLDENBORG et al., 2000; ORTMAYER; MOHSENIN, 1996; PERNER et al., 2003), exceto Mohanty et al. (2000) observaram que a hiperglicemia diminui a capacidade de burst respiratório de neutrófilos.

A produção de citocinas por neutrófilos também é alterada pela hiperglicemia e/ou hiperinsulinemia. Pacientes diabéticos apresentam valores basais séricos elevados de *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α), *Interleukin* (IL)-6 e IL-8 (MYSLIWSKA et al., 1998; PICKUP; CROOK, 1998; ZOZULINKA et al., 1976). Entretanto, os efeitos da glicose e insulina na produção de citocinas pró-inflamatórias induzida por lipopolisacarídeo (LPS) *in vitro* e *in vivo* são contraditórias (FRAKER; MERINO; NORTON, 1989; KIRWAN et al., 2001; LIDA et al., 2001; ORLINSKA; NEWTON, 1993; SATOMI et al., 1985). Em modelo de inflamação pulmonar aguda induzida por LPS, animais diabéticos apresentam redução (50%) na geração

de íons superóxido por neutrófilos presentes no lavado broncoalveolar e a mesma magnitude de redução da concentração de TNF- α no sobrenadante deste (BOICHOT et al., 1999). A produção/liberação de prostaglandina E2 (PGE₂) por estas células também está reduzida (ALBA-LOUREIRO et al., 2006a). Martins et al. (2006) verificaram que a insulina modula a produção/liberação de citocinas pró inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) e anti inflamatória (IL-10) no lavado broncoalveolar, a expressão de moléculas de adesão *Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1) e E-selectina no endotélio pulmonar e a migração de neutrófilos para o mesmo órgão após instilação intratraqueal de LPS. Essa modulação pelo hormônio pode ser atribuída, em parte, pela ativação da subunidade p65 da *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B) e fosforilação de *inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase α* (I- κ B α) (MARTINS et al., 2009). Em 2010, Martins et al., verificaram que ratos diabéticos tratados com LPS exibiram redução na fosforilação das proteínas *Extracellular signal-regulated kinases* (ERK), p38, Akt, *Protein Kinase C-α* (PKC- α) e *Protein Kinase C-γ* (PKC- γ) e, redução na expressão do *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) e *Cyclooxygenase 2* (COX-2) no exsudato proteico proveniente do tecido pulmonar, redução na concentração de *nitric oxide synthase* (NO) e IL-6 e aumento dos níveis de *Chemokine (C-X-C motif) ligand 2* (CINC-2) no lavado broncoalveolar. O tratamento dos animais diabéticos com insulina promoveu o retorno da fosforilação das moléculas de sinalização, expressão de enzimas e dos níveis da produção/liberação das citocinas aos apresentados pelos animais controles.

Alba-Loureiro et al. (2006b) verificaram redução na utilização de glicose e glutamina para produção de *Adenosine Triphosphate* (ATP) e aumento da oxidação de ácido palmítico por neutrófilos de ratos diabéticos. Estas alterações metabólicas devem estar relacionadas com a diminuição da produção de peróxido de hidrogênio e da capacidade fagocitária destas células.

Como descrito acima, várias alterações funcionais e metabólicas foram descritas em neutrófilos no diabetes tipo 1. Porém, a morte dos neutrófilos induzida por estímulos inflamatórios na condição diabética ainda não é bem esclarecida. Dessa forma, o entendimento por quais vias e de que maneira essas células estão morrendo é essencial para uma boa abordagem terapêutica posterior.

1.2 Morte Celular

Inicialmente, acreditava-se que o processo de morte celular ocorria basicamente através da apoptose ou necrose. No entanto, com a evolução da ciência e a aparição de métodos analíticos mais sensíveis, outros mecanismos de morte celular têm sido caracterizados e são influenciados por fatores intracelulares (ATP, variação da concentração de íons cálcio no citoplasma) e extracelulares (pH, marcadores de inflamação) que as células estão expostas.

Atualmente, existe um grande consenso de que os vários tipos de morte celular não estão separados por fronteiras bem estabelecidas, mas sim compartilham de alguns dos mecanismos moleculares e rotas de sinalização (LEVIN et al., 2008). A morte celular é extremamente importante para a embriogênese, desenvolvimento de tecidos e para homeostasia de organismos pluricelulares (KERR et al., 1972). Uma deficiência no processo de morte pode ser deletéria e está relacionada a um conjunto de condições patológicas como doenças autoimunes, doenças neurodegenerativas, câncer, AIDS, entre outros (HETTS, 1998; PERRY et al., 1998; THOMPSON, 1995). As células em geral contam com uma maquinaria muito eficiente e controlada para desencadear sua morte, e esta é desencadeada se a célula não está desempenhando mais sua função ou já cumpriu o seu papel determinado.

A apoptose é um processo de morte celular controlado, em que a célula é programada para morrer através da ativação de várias proteínas responsáveis por esse processo. Esse processo de morte celular não inflamatório é caracterizado pela formação de protuberâncias na superfície celular (*blebs*), condensação do núcleo e citoplasma. Uma das primeiras alterações marcantes no processo apoptótico é a agregação e condensação da cromatina em grandes massas granulares compactas que se ligam à carioteca formando um núcleo picnótico. Em estágio posterior, ocorre a clivagem do DNA internucleossomal com o aparecimento de fragmentos nucleares discretos (KERR et al. 1972). Enquanto isso, o citoplasma se condensa, aumenta a densidade de organelas intactas e microvilos desaparecem, levando a diminuição do volume celular e a desintegração de junções celulares. Além da diminuição de volume celular, a externalização de fosfatidilserina é uma marca do início do processo de apoptose. Em células vivas, os fosfolípides da membrana plasmática, fosfatidilcolina e esfingomielina, estão localizados na face externa; enquanto, a fosfatidilserina, exclusivamente, na face interna da membrana plasmática. Na apoptose ocorre a perda da simetria dos fosfolípides devido a exposição de fosfatidilserina para a face externa da membrana plasmática, acarretando na translocação de cargas negativas da molécula de fosfolipídios da face interna da membrana

citoplasmática para a superfície celular (MARTIN et al., 1996). Este processo facilita o reconhecimento das células apoptóticas por células fagocíticas que apresentam receptores para fosfatidilserina (VERMES et al., 1995).

A apoptose de neutrófilos também envolve cascatas proteolíticas com caspases, calpains e proteassoma que ativam quinases, dissociam a ligação protéica dos filamentos de actina (KNEPPER-NICOLAI; SAVILL; BROWN, 1998), e participam nas transformações morfológicas nucleares (WITKO-SARSAT et al., 2000). Existem duas principais vias que regulam a apoptose, a primeira é a via dos receptores de morte ou extrínseca, iniciada pelos *Tumor Necrosis Factor Receptors* (TNFRs) e pelos *Apoptosis Stimulating Fragments* (Fas), *cluster of differentiation 95/ apoptosis antigen 1* (CD95/Apo-1) e, a segunda, a via intrínseca, que envolve mitocôndria e membros da família Bcl2 (*B-cell lymphocytic-leukaemia proto-oncogene-2*) (ASHKENAZI; DIXIT, 1998; GREEN, 1998; TSUJIMOTO; SHIMIZU, 2000).

As proteínas da família Bcl2 localizam-se no citoplasma e membrana mitocondrial externa e entram na regulação e integração de sinais de morte ou de sobrevivência celular. Bcl2 se divide em três subfamílias: duas delas que possuem multidomínios *Bcl-2 Homology regions* (BH), que são anti-apoptóticas *Bcl-2*, *B-cell lymphocytic-leukaemia proto-oncogene extra large* (Bcl-X_L), *B-cell lymphocytic-leukaemia proto-oncogene-w* (Bcl-w), *Induced myeloid leukemia cell differentiation protein* (Mcl-1) e *Bcl2-related protein A1* (A1/Bfl-1); ou pró-apoptóticas *Bcl-2-associated X protein* (Bax), *Bcl-2 homologous antagonist/killer* (Bak), *Bcl-2 related ovarian killer* (Bok/Mtd) e *B-cell lymphocytic-leukaemia proto-oncogene –rambo* (Bcl-rambo) e atuam na integridade das membranas mitocondriais. A outra subfamília compreende as proteínas pró-apoptóticas que possuem somente o domínio BH3, denominadas de *BH3-only proteins* *Bcl-2-associated death promoter* (Bad), *natural born killer/Bcl-2-interacting killer* (Nbk/Bik), *BH3 interacting-domain death agonist* (Bid), *Pro-apoptotic Bcl-2 family member* (Bim/Bod), *Activator of apoptosis hara-kiri* (Hrk/DP5), *Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1* (Noxa), *B lymphocyte kinase* (Blk), *Bcl2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like* (Bnip3L/Nix), *p53 upregulated modulator of apoptosis* (Puma), *Bcl-2-modifying factor* (Bmf) e *B-cell lymphocytic-leukaemia proto-oncogene-G* (Bcl-G). As “*BH3-only*” são ligantes que ativam proteínas das pró-apoptóticas ou inativam as anti-apoptóticas. Alterações na expressão, localização subcelular, estado de fosforilação e processamento proteolítico das proteínas Bcl-2 determinam se o programa de morte será ativado (BORNER, 2003; KORSMEYER, 1995; MAYER; OBERBAUER, 2003).

Os neutrófilos expressam constitutivamente membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, incluindo Bax, Bak, Bad, Bid e Bik e, a Mcl-1, membro anti-apoptótico (AKGUL et al., 2001; EDWARDS et al., 2004; MOULDING et al., 2001). No processo de apoptose destas células, a mitocôndria muda de forma, formando *clusters* perinucleares (MAIANSKI et al., 2004) nos quais as proteínas pró-apoptóticas se fundem, promovem a permeabilização e, consequentemente, a liberação de proteínas mitocondriais pró-apoptóticas (NEWMEYER; FERGUSON-MILLER, 2003). O citocromo c, fator mitocondrial pró-apoptótico, associado ao *Apoptotic Protease Activating-Factor 1* (Apaf-1), ATP e a pró-caspase 9 formam o apoptossomo (GREEN, 1998). A caspase 9 é ativada no apoptossomo e, subsequentemente, ativa a caspase 3 (BOATRIGHT; SALVESEN, 2003; LI et al., 1997). Apesar das poucas mitocôndrias de neutrófilos expressarem baixas quantidades de citocromo c (LIU et al., 2003; MURPHY et al., 2003; PRYDE et al., 2000), este seria suficiente para induzir a ativação da caspase 9 (MURPHY et al., 2003), indicando que embora a atuação destas organelas seja discreta na respiração, elas preservam a ativação de caspase na apoptose (MAINSKI et al., 2004).

Outro mecanismo de morte programada que vem ganhando evidência é a autofagia. Neste tipo de morte, as células catabolizam componentes celulares danificados para que os elementos essenciais - carboidratos, proteínas e lipídios – possam ser reutilizados para reparos celulares. A morte celular induzida por autofagia é desencadeada quando a célula está em condições de inanição ou quando há estresse no reticulo endoplasmático. Apesar desse mecanismo não ser totalmente conhecido, há necessidade da expressão de genes como o beclin 1 e *autophagy related 7* (ATG7) para que ocorra (LIANG et al., 1999; YU et al., 2004). Nesse processo não há ativação de caspases, mas há condesamento citoplasmático e uma redução do tamanho celular (KLIONSKY et al., 2008). A característica única da autofagia é a formação de autofagossomos multilamelares que englobam componentes intracelulares, facilmente detectados por microscopia eletrônica, que são degradados durante a fusão com o lisossomo (SAFTIG et al., 2008).

A piroptose é também um processo de morte programado. Porém, resulta em lise da célula, inflamação do tecido e recrutamento de fagócitos profissionais. A enzima chave no processo é a caspase-1 que ativa as citocinas IL-1 β e IL-18, responsáveis por recrutar macrófagos e polimorfonucleares para o sitio de infecção (FINK; COOKSON, 2006). A caspase-1 também está relacionada com a formação de poros na membrana celular, permitindo um influxo de íons extracelulares que promovem o aumento do tamanho e lise celular. Semelhante ao apoptossomo que medeia a apoptose, a piroptose é controlado pela

formação de uma multiproteína (700 kDa) conhecida como inflamasomo. Esse complexo é composto por um sensor denominado de *Nucleotide-binding oligomerization domain receptor (NOD)-like receptor* (KANNEGANTI; LAMKAN; NUNEZ, 2007), uma molécula adaptadora contendo *C-terminal caspase-recruitment domain* (CARD), *Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD* (ASC) ou *PYD and CARD domain containing protein* (PYCARD), caspase-1 e caspase-5 (FERNANDES-ALNEMRI et al., 2007). A interação das moléculas do sensor com ligantes como os *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) desencadeia a formação dos inflamassomos (FINK; COOKSON, 2006).

Como a piroptose, a oncose é caracterizada pelo aumento do tamanho e lise celular devido principalmente pela formação de poros por toxinas de bactérias patogênicas e lise mediada pelo sistema complemento (LEVIN et al., 1999). A oncose ocorre quando há perda de integridade da membrana, liberação do conteúdo intracelular e o efluxo de íons inorgânicos, promovendo o aumento da pressão osmótica intracelular e dentro das organelas. A depleção de ATP e perda de potencial transmembrânico de mitocôndrias acompanham o efluxo de íons da célula (TRUMP; BEREZESKY, 1996; PEREZ et al., 1998).

Neutrophil Extracellular Traps (NET)ose é um tipo de morte celular exclusivo de neutrófilos, caracterizada pela formação de redes extracelulares compostas por extrusões de membrana plasmática, material nuclear, componentes de grânulos e histonas. A formação dessas “redes” tem como objetivo aprisionar os agentes invasores ao mesmo tempo que exerce sua função microbicida, (FUCHS et al., 2007), sendo necessária da ativação da NADPH oxidase (produção de EROS) (DACHEUX et al., 2000).

1.3 Estruturas que participam no processo de morte celular em Neutrófilos

A mitocôndria tem sido caracterizada como a organela chave no processo de morte dos neutrófilos (MAIANSKI et al., 2004; RAAM et al., 2006). Tais fagócitos possuem poucas mitocôndrias, sugerindo que não sejam essenciais para o fornecimento de energia, mas sim fundamentais no processo de morte dos neutrófilos. As mitocôndrias desempenham tal papel, não apenas por possuírem proteínas citotóxicas que são liberadas durante o processo de apoptose, *Second Mitochondrial Derived Activator of Caspases/ Direct IAP Binding* (Smac/DIABLO), *High Temperatute Requirement A2/ stress-regulated endoprotease* (HtrA2/Omi), *Endonuclease G* (Endo G), *Apoptosis inducing factor* (AIF), Citocromo C, e contribuírem para a ativação de caspases, mas também por agirem como sensores de cálcio metabólico, evidenciando o estado redox da célula e como aceptores de cálcio livre do

citoplasma. O balanço da expressão e atividade de compostos pró e anti-apoptóticos da família de proteínas Bcl-2 determinaria o tempo de vida dos neutrófilos (RAAM et al., 2006).

O retículo endoplasmático (RE) é outra organela que vem ganhando evidência quando se trata de morte celular. Todas as proteínas que transitam pela via de secreção nas células eucarióticas entram primeiramente no RE, sofrem alterações conformacionais, formam complexos e são exportadas em vesículas para o Complexo de Golgi para posteriormente serem secretadas. No decorrer do processo de formação e saída de compostos do RE, há um processo de controle de qualidade que impede a má formação de proteínas e a secreção das mesmas (MALHOTRA; KAUFMAN, 2007; VOELTZ et al., 2002). As proteínas mal formadas são retidas no lúmen do RE em complexos com chaperonas ou são enviadas diretamente para a degradação pelo 26S proteossomo, através do processo chamado de *ER-associated degradation* (ERAD).

O RE possui um microambiente único que favorece a formação conformacional das proteínas desde o início quando as cadeias de polipeptídios nascentes adentram seu lúmen. Este é um meio altamente oxidante para favorecer a formação de pontes dissulfeto que são necessárias para gerar a conformação correta das proteínas. Para garantir que a formação dessas pontes dissulfeto seja feita de forma correta, a célula apresenta as oxidoredutases *Protein Dissulfide Isomerases* (PDIs) e 57kDa *Endoplasmatic reticulum Resident protein* (ERp57), que catalisam tais reações (LAURINDO; PESCATORE; FERNANDES, 2012; OLIVER et al., 1997; WILLIAM, 2006). A alta concentração de proteínas parcialmente formadas e daquelas que ainda não sofreram alterações conformacionais aumentam a probabilidade de formação de agregados que podem gerar o estresse do RE. Dessa maneira, o RE apresenta proteínas como a 78kDa *Glucose-regulated Protein* (GRP78, conhecida também como Bip) e a 94kDa *Glucose-regulated Protein* (GRP94), que se ligam a tais proteínas mal formadas impedindo a aglomeração entre elas (MALHOTRA; KAUFMAN, 2007).

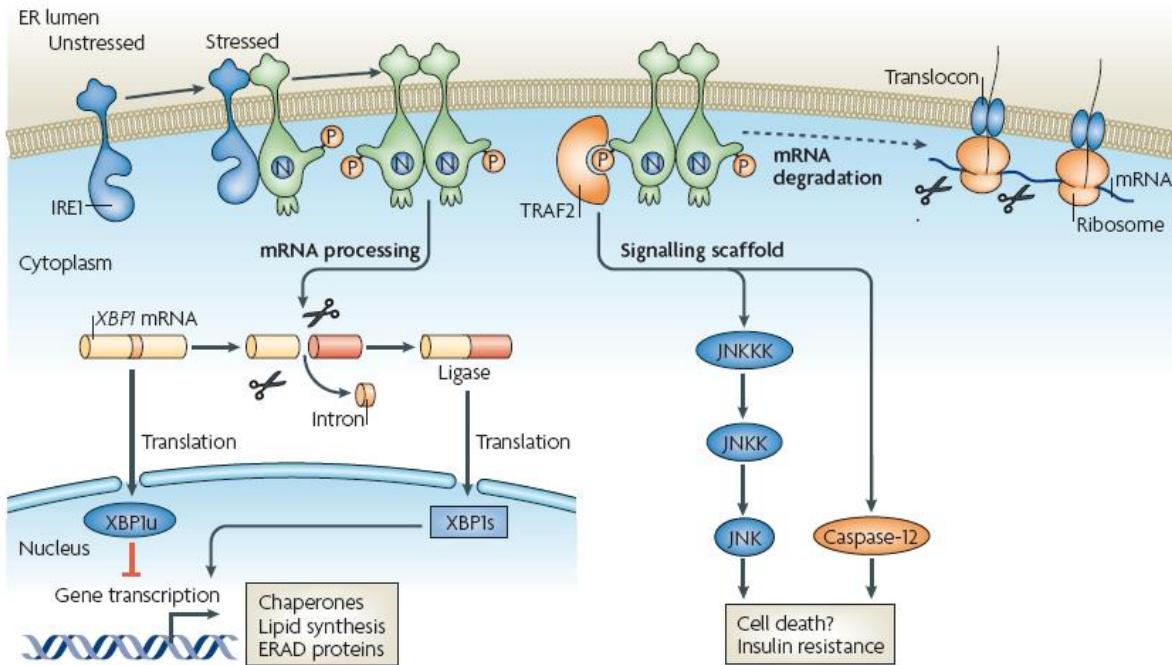
O RE é também o depósito primário de cálcio da célula. Tanto a formação de novas proteínas como a função exercida pelas chaperonas exigem altos níveis de cálcio intraluminal. A formação de proteínas no RE necessita de grande quantidade de energia, o ATP também é necessário para manter as funções das chaperonas, os níveis de íons cálcio intraluminal, o estado redox e o ERAD do RE (MALHOTRA; KAUFMAN, 2007; MA; HENDERSHOT, 2001).

O acúmulo de proteínas mal formadas inicia a ativação de uma cascata de sinalização conhecida como *Unfolded protein response* (UPR). Atualmente, é bem estabelecido que a resposta ao estresse de RE ocorre devido a ativação de três componentes constitutivos

transmembrânicos de reticulo: *Inositol-requiring kinase 1* (IRE1), *Double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase* (PERK) e *Activating transcription factor 6* (ATF6) (BERNALES; PAPA; WALTER, 2006; SHRODER et al., 2005).

O IRE1 é uma proteína transmembrânica de 110kDa que possui dois homólogos: IRE1 α e IRE1 β . O IRE1 α é expresso em quase todas as células e tecidos, com altos níveis de expressão no pâncreas e placenta. IRE1 β é expresso apenas nas células do epitélio intestinal. Ambos possuem funções parecidas, diferenciando apenas em suas localizações (TIRASOPHON et al., 1998; WANG et al., 1998). Em seu estado inativo, o domínio luminal do IRE1 está associado a chaperona do RE, Bip. Quando a concentração de proteínas mal formadas aumenta no lúmen do RE, Bip dissocia-se do IRE1 para se ligar as proteínas mal formadas e impedir a aglomeração das mesmas. Essa dissociação faz com que o IRE1 oligomerize com outras moléculas de IRE1, também dissociadas, acarretando a autofosforilação do seu domínio citoplasmático e a consecutiva ativação da IRE1 ribonuclease (RNase) (TODD et al., 2008). Essa RNase cliva o *X-box binding protein* (XBP1) mRNA para retirada de um intron de 26 nucleotídeos, resultando no spliced XBP1 (XBP1s) que é um ativador da transcrição de vários genes relacionados a UPR. Alguns dos genes que são ativados pela via IRE1/XBP1 são os envolvidos no ERAD, como o *ER-degradation enhancer mannosidase alfa-like 1* (EDEM) (*Figura 1*) (YOSHIDA et al., 2003). Além do processamento do XBP1 mRNA, IRE1 promove, direta ou indiretamente, a rápida quebra e destruição de vários mRNAs associados com o RE rugoso, promovendo a diminuição da entrada de novas proteínas no lúmen dessa organela. A forma ativada do IRE1 se liga ao *Tumor Necrosis Factor receptor-associated factor 2* (TRAF2), ativando a quinase pró-apoptótica *JUN N-terminal kinase* (JNK), através da proteína *Apoptosis signal-regulating kinase 1*(ASK1) (URANO et al., 2000). JNK ativada pode, então, ativar a morte celular por apoptose ou autofagia. A atividade de IRE1 é modulada pela interação com BAX inhibitor 1 e de proteínas da família Bcl-2 (HETZ; GLIMCHER 2008; LISBONA et al., 2009).

Figura 1- Sinalização por IRE-1.

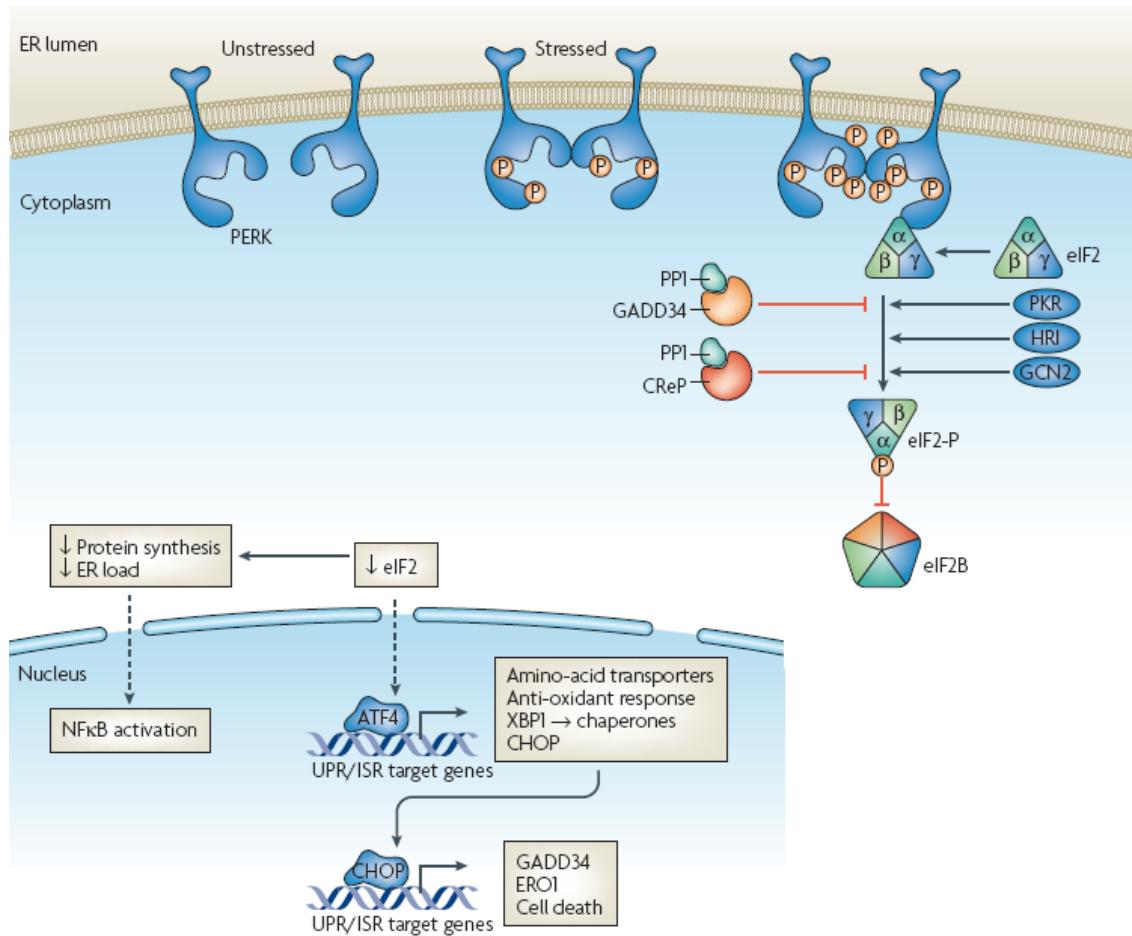


Em situações de estresse no retículo endoplasmático, IRE-1 se dimeriza, autofosforila no seu domínio quinase citosólico e atua como endoribonuclease.

Fonte: (RON; WALTER, 2007)

O PERK é também uma proteína transmembranica, de 120kDa, cujo o domínio luminal é semelhante ao de IRE1 e se liga a Bip. Quando a concentração de proteínas mal formadas aumenta no lúmen do RE, PERK se dissocia da Bip, dimeriza-se e autofosforila, levando a ativação do *eukaryotic translation factor 2α* (eIF2α) através da fosforilação em Serina na posição 51 (Ser51) (HARDING et al., 2000; HARDING et al., 2000b). Embora a fosforilação do eIF2α - necessária para o acoplamento da subunidade 80S do ribossomo (LU et al., 2004) - iniba a síntese geral de proteínas, ela é necessário para a tradução de vários mRNAs. Um fator de transcrição cuja tradução é ativada pela fosforilação do eIF2α é o *Activating Transcription Factor 4* (ATF4) (HARDING; ZHANG; RON, 1999), que pertence a família do *cAMP-response element binding* (CREB) e ativa vários genes envolvidos no controle da UPR, incluindo chaperonas (Bip e a GRP94); genes envolvidos na supressão do estresse oxidativo, no metabolismo e transporte de aminoácidos (*Figura 2*). ATF4 também atua na ativação da CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP), que embora ocorra no início da ativação da UPR, está correlacionado com apoptose após prolongado estresse de RE em alguns tipos celulares e em vários estados patológicos (ZINSZNER et al., 1998).

Figura 2- Sinalização por PERK.

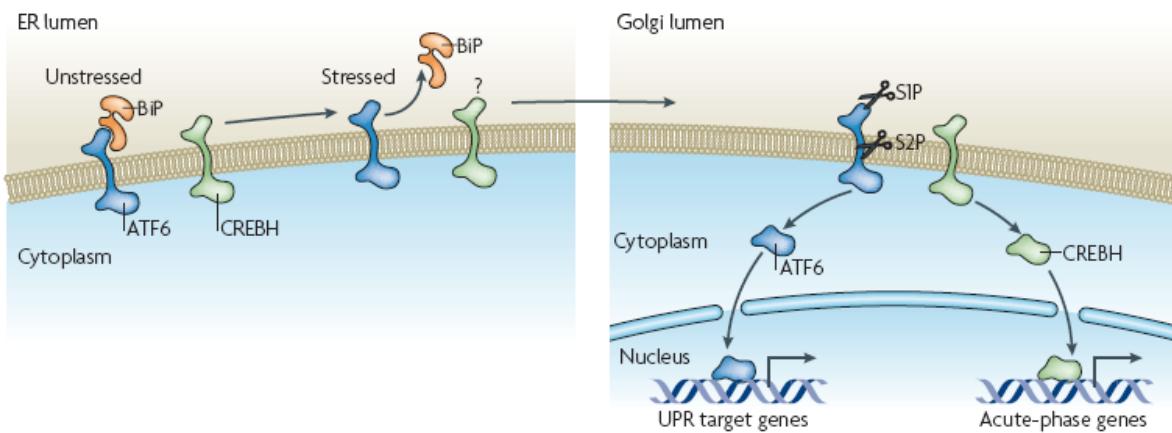


Em resposta ao estresse de RE, PERK dimeriza, se autofosforila, promovendo assim sua ativação. A fosforilação da subunidade α do eIF2 na Ser51, inibe o eIF2B de reciclar o eIF2 em sua forma ativa ligada a GTP. O resultado reduz atividade do eIF2B e o complexo eIF2 passa a exercer todas as funções importantes mediada por PERK.

Fonte: (RON; WALTER, 2007)

ATF6 é uma proteína transmembrânica de 90kDa, que permanece no RE durante condições normais através de sua associação com Bip (STEN et al., 2002). Quando a concentração de proteínas mal formadas aumenta no lúmen do RE e Bip se dissocia, ATF6 é translocado para o Complexo de Golgi, onde é clivado por proteases site-1 (S1P) e site-2 (S2P), que liberam o domínio citosólico de 50-kDa como um fator de transcrição ativo (ATF6₅₀). O ATF6₅₀ se desloca até o núcleo e ativa a transcrição de vários genes envolvidos no controle de qualidade do RE, incluindo chaperonas como a Bip, XBP1, componentes do ERAD, o indutor de apoptose CHOP e o Ero1 β (Endoplasmatic reticulum resident oxireductase 1 β) que tem um papel essencial na manutenção do ambiente oxidante do RE (SHIMIZU; HENDERSHOT, 2009) (Figura 3).

Figura 3- Sinalização por ATF6.



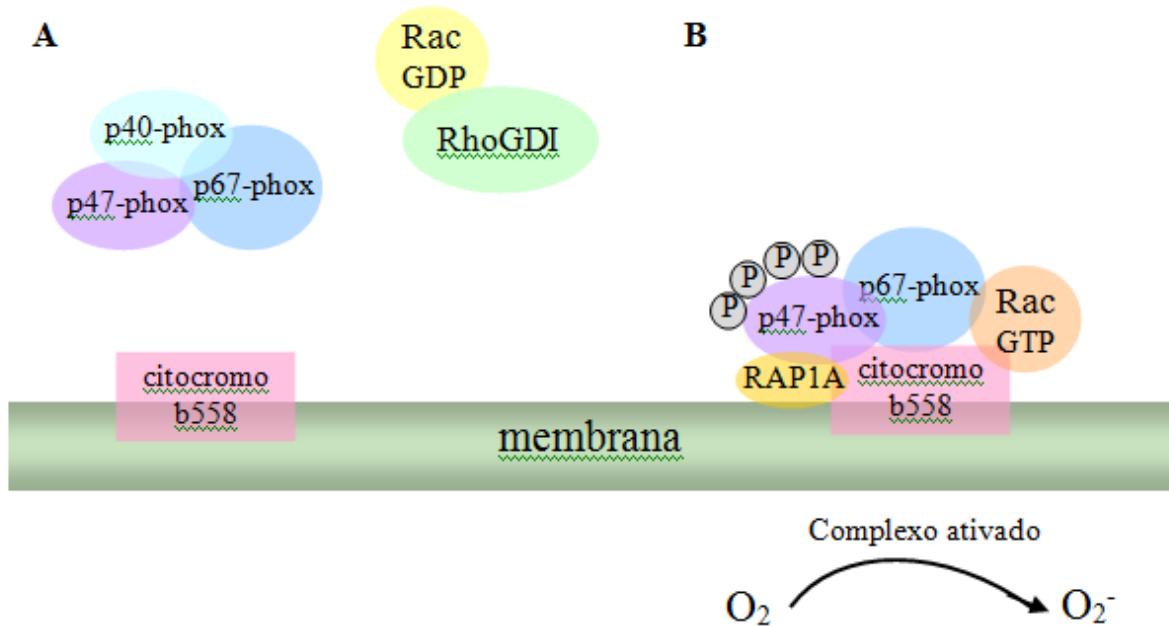
Em condições normais ATF6 e CREBH se localizam na membrana do RE. Em condições de estresse, Bip se dissocia de ATF6 para se ligar a proteínas mal formadas e impedir a agregação das mesmas. Essa dissociação faz com que ATF6 e CREBH sejam translocados para o Complexo de Golgi. Os detalhes dessa translocação ainda permanecem desconhecidos. No Complexo de Golgi, ATF6 é clivado pelas proteases S1P e S2P que libera a subunidade ATF6₅₀ que se transloca até o núcleo onde controla a transcrição de genes importantes na UPR. Fonte: (RON; WALTER, 2007)

O complexo da NADPH oxidase seria o terceiro componente envolvido no processo de morte em neutrófilos. Este é um complexo enzimático composto por proteínas citoplasmáticas ($p40^{phox}$, $p47^{phox}$ e $p67^{phox}$) e proteínas de membrana ($p22^{phox}$ e $gp91^{phox}$), que constituem uma flavo-hemoproteína heterodímera conhecida como citocromo b₅₅₈ (BABIOR, 1991; PARKOS et al., 1987). Esse complexo parece estar envolvido na morte celular devido a produção de EROS exarcebada, principalmente em neutrófilos, necessária para formação das NETs e, consequentemente, pelo processo de morte celular NETose. A ativação da NADPH oxidase é iniciada com a fosforilação e mudança conformacional da $p47^{phox}$, porém alguns estudos sugerem que apenas a fosforilação não seja suficiente para ativar o complexo enzimático. Dana et al. (1998) demonstraram que o ácido araquidônico gerado pela fosfolipase A₂ citosólica foi essencial para a ativação completa da NADPH oxidase *in vivo* e, Shiose e Sumimoto (2000) verificaram que a ativação de $p47^{phox}$ requer uma ação sinérgica da fosforilação e do ácido araquidônico.

A ativação de $p47^{phox}$ promove a translocação das proteínas $p40^{phox}$, $p47^{phox}$ e $p67^{phox}$ para a membrana plasmática onde se associam ao citocromo b₅₅₈. No complexo associado à membrana, a $p47^{phox}$ parece estabilizar a interação da $p67^{phox}$ com o citocromo, que juntamente com a $gp91^{phox}$, formam o sítio catalítico ativo da enzima. Após a ativação completa da oxidase, inicia-se tanto a transferência de elétrons, como a geração de ânion superóxido. Em neutrófilos, estes processos são regulados e modificados por duas proteínas

de baixo peso molecular, ligadoras de guanosina trifosfato (GTP): *ras-related C3 botulinum toxin substrate 2* (Rac2) e *member of RAS oncogene family* (Rap1A) (ABO et al., 1991; KNAUS et al., 1991). Funcionando como molécula ativadora na cascata sinalizadora, a Rac permanece no citoplasma na sua forma inativa, quando ligada a GDP (*Guanosine Diphosphate*) e associada ao *Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor* (RhoGDI). Na ativação do fagócito, a Rac-2 se liga a GTP, através da P-Rex-1 que atua como um *Guanine-nucleotide exchange factor* (GEF) para Rac-2 (WELCH et al., 2002), e se desloca para a membrana, associando-se às outras proteínas oxidases (ABO et al., 1994; QUINN et al., 1993). Além da Rac-2 induzir a atividade da NADPH oxidase pela fosforilação da p47^{phox} (KNAUS; BOKOCH, 1995), esta interage com a p67^{phox} (DIEKMANN et al., 1994) e com o citocromo b558 (HEYWORTH et al., 1994), modulando o complexo enzimático. A Rap-1A, que se associa ao citocromo b558 após a ativação da NADPH oxidase (QUINN et al., 1989), parece ser responsável pela ativação indireta do complexo enzimático ao ativar a proteína quinase C (GABIG et al., 1995; QUINN et al., 1995) (Figura 4).

Figura 4- Complexo enzimático NADPH oxidase.



(A) Complexo enzimático NADPH oxidase composto por proteínas citoplasmáticas (p40^{phox}, p47^{phox} e p67^{phox}), citocromo b558 associado a RAP 1A e proteínas citoplasmáticas Rac-GDP e RhoGDI. (B) Complexo enzimático ativado após fosforilação (representada por “P”) da proteína p47^{phox}.
Fonte: (EMORY UNIVERSITY, 2013).

A NADPH oxidase promove a transferência de elétrons do complexo para a molécula de oxigênio do fagossomo gerando o ânion superóxido, conforme a reação: $\text{NADPH} + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{NADP}^+ + 2\text{O}_2^- + \text{H}^+$. Esta transferência é um processo de várias etapas, e os elétrons passam através de molécula FAD e dois grupos heme, que fazem parte do citocromo b558 (DIEBOLD; BOKOCH, 2001; MEISCHL; ROOS, 1998), mas é a proteína citoplasmática p67^{phox} que regula a transferência de elétrons após sua ativação (HAN et al., 1998; NISIMOTO et al., 1999).

O ânion superóxido não apresenta grande ação bactericida (BABIOR; CURNUTTE; KIPNES, 1975; KLEBANOFF, 1974) e o peróxido de hidrogênio, que é formado pela dismutação espontânea ou dependente da enzima superóxido dismutase (SOD) do ânion superóxido (BABIOR; KIPNES; CURNUTTE, 1973), é bactericida somente em concentrações muito altas (IMLAY; LINN, 1986). A maior parte do peróxido de hidrogênio gerado por neutrófilos é consumida pela mieloperoxidase (KETTLE; WINTERBOURN, 1997; KLEBANOFF, 1992), enzima que catalisa a formação de HOCl por oxidação de íons cloreto (AGNER, 1972; HARRISON; SHULTZ, 1976), o principal oxidante bactericida produzido por neutrófilos (IYER; ISLAM; QUASTEL, 1961; KLEBANOFF, 1968). A reação do HOCl com aminas produz cloraminas que apresentam ação BACTERICIDA e prolongam a atividade oxidante do sistema peroxidase (BEILKE; COLLINS-LECH; SOHNL, 1989; DOMIGAN et al., 1995; GRISHAM et al., 1984; THOMAS; LEARN, 1991). Em 1894, Fenton descreveu a atividade oxidativa da mistura do sulfato de ferro e H_2O_2 e, em 1934, Haber e Weiss evidenciaram o OH⁻ como um poderoso oxidante formado da seguinte maneira:

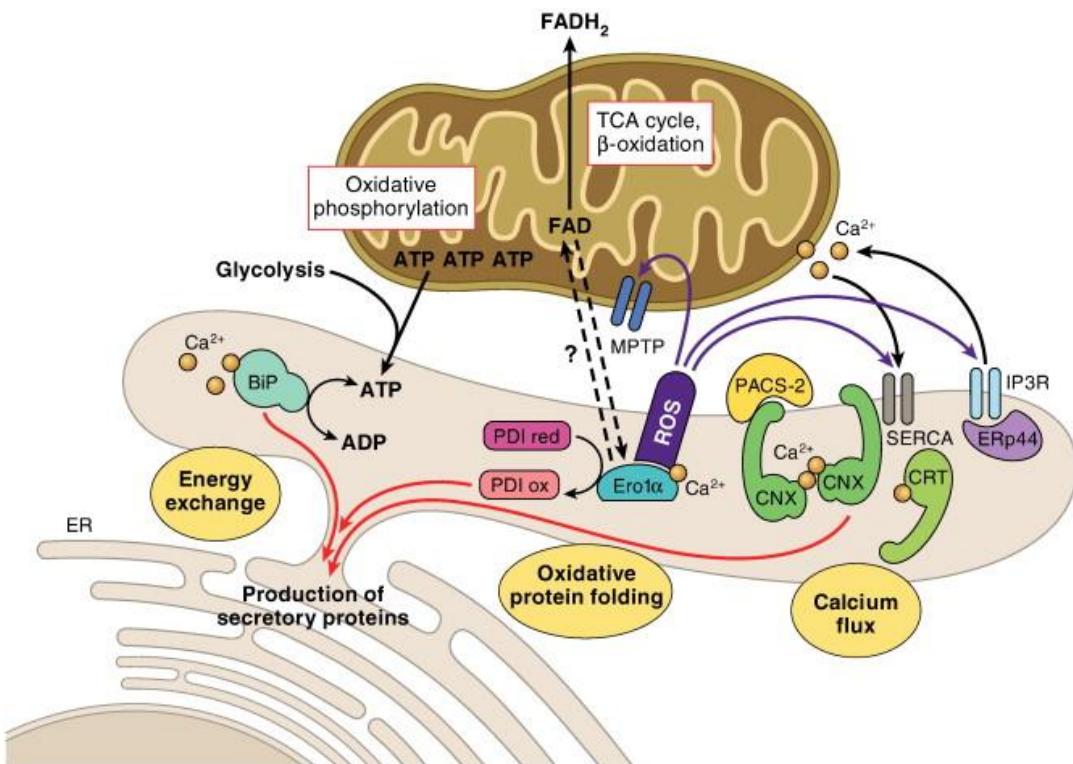
$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$, como em fluídios biológicos a concentração livre de ferro é limitada, a interação entre H_2O_2 e O_2^- , para formar $\cdot\text{OH}$, é então catalisada e limitada pela concentração livre de ferro. A reação de Haber-Weiss:

$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2^- \rightarrow \text{O}_2 + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$. Entretanto, menos de 1% de H_2O_2 e O_2^- produzidos pelos neutrófilos pode formar o $\cdot\text{OH}$ por este mecanismo (RAMOS et al., 1992) e, considerando que o radical hidroxil é extremamente reativo, reagirá com outra molécula antes de atingir seu alvo na membrana bacteriana, como o CO_2 , gerando o radical HCO_3^- , podendo atuar como microbicida no fagossomo (LYMAR; HURST, 1995).

Os três componentes celulares - mitocôndria, RE e a NADPH oxidase - parecem atuar em conjunto para regulação da morte celular. Uma evidencia dessa associação é a aproximação física entre a mitocôndria e o RE conhecida como *Mitochondria-Associated ER*

Membrane (MAM). A MAM tem fundamental participação na homeostase celular, incluindo o transporte não vesicular de fosfolipídios, transmissão de íons cálcio do RE para a mitocôndria para estimular o metabolismo oxidativo e o controle das concentrações de cálcio no lúmen do RE (HAJNOCKY et al., 2003; RIZZUTO et al., 2004). Algumas proteínas são essenciais para que a interação entre essas duas organelas aconteça e dentre elas se encontram: a 44kDa *Endoplasmatic reticulum protein* (ERp44), ERp57, Calnexina, Calreticulina e *ERO1-like α* (Ero1α) (APPENZELLER-HERZOG et al., 2010), que regulam o fluxo de cálcio do RE por interações redox-dependentes com *Inositol 1,4,5,-Triphosphate Receptors* (IP3Rs) e com a *Sarcoplasmatic/Endoplasmatic Reticulum Calcium ATPases* (SERCA) (HIGO et al., 2005; LI; CAMACHO, 2004); 75kDa Glucose Regulated protein (GRP75) que é uma chaperona responsável pela ligação do *Mitochondrial Voltage Dependent Anion Channel* (VDAC) ao IP3R (SZABADKAI et al., 2006); a mitofusina-2, uma GTPase de membrana que estabiliza a interação RE-mitocôndria (CHEN et al., 2003, KOSHIBA et al., 2004); *Phosphofurin acidic cluster sorting protein 2* (PACS-2), um dos responsáveis pela aproximação entre as mitocôndrias e o RE, por afetar a composição da MAM ao mediar a localização do canal de liberação de cálcio denominado de *The Transient Receptor Potential Protein 2* (TRPP2) (KOTTGEN et al., 2005; MYHILL et al., 2008); e o receptor sigma-1, responsável pela estabilização da ligação IPR3-grp75-VDAC (HAYASHI; SU., 2007) (Figura 5).

Figura 5- Proteínas que participam na regulação da MAM.



Influência das três maiores trocas metabólicas que acontece entre a mitocôndria e o RE no sistema de chaperonas do RE.

Fonte: (SIMMEN et al., 2010).

Qualquer alteração nessas proteínas e, consequentemente, na formação da MAM pode acarretar em danos e até morte celular. A distância entre o RE e a mitocôndria durante a formação da MAM deve ser preciso, pois o espaço menor que 5 nm entre essas organelas promove uma sobrecarga de Ca^{2+} na mitocôndria, prejudicando a função dessa organela. Aparentemente, a interface mitocôndria-RE, seria capaz de detectar a alteração da concentração de Ca^{2+} citosólico, podendo alterar dinamicamente a distância entre as organelas para resposta celular adequada (CSORDAS et al., 2006). A NADPH oxidase, por sua vez, parece estar envolvida no processo de morte celular, pois é bem estabelecido que a exposição celular a EROS proveniente do complexo enzimático, podem promover a geração de EROS pela mitocôndria por alterar a permeabilidade da membrana mitocondrial e a função dos canais iônicos, além de desencadear mutações do DNA mitocondrial (WOSNIAK et al., 2009).

Dessa maneira, a morte celular parece depender da participação de vários componentes celulares e não apenas da ação de organelas isoladas.

2 JUSTIFICATIVA

Recentemente verificou-se que há a possibilidade da participação do retículo endoplasmático no processo de morte celular. Essa organela pode apresentar-se sob condição de estresse devido a alterações na formação de proteínas, além de ser outro possível sítio de produção de EROs, além da NADPH oxidase e da própria mitocôndria, e exacerbar a cascata de reações decorrentes do estresse de RE que podem desencadear a morte. A interferência do *diabetes mellitus* na morte celular de neutrófilos ainda não é bem esclarecida. Dessa maneira esse estudo visa investigar o estado de ativação do retículo endoplasmático em neutrófilos de animais diabéticos e a possível correlação dessa organela no processo de morte dessas células.

3 OBJETIVOS

Os objetivos específicos do estudo foram:

1. Avaliar a situação de estresse do retículo endoplasmático em neutrófilos de animais controle e diabéticos através de microscopia de fluorescência.
2. Verificar a expressão gênica de Bip, componentes da UPR (IRE-1, PERK e ATF-6) e do fator de transcrição (CHOP) através da técnica de PCR tempo real.
3. Avaliar o conteúdo das proteínas relacionadas a ativação do estresse de RE e da integridade da MAM: PERK, eIF2 α , p-eIF2 α , ATF4, CHOP, GADD34, ATF6, pJNK e mitofusina 2.
4. Verificar o Splicing de XBP1
5. Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio pelos neutrófilos através de quimioluminescência.
6. Atividade das caspases 3 e 9 em neutrófilos através de espectrofluorimetria.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*) machos, com peso entre 180 e 220g e idade de, aproximadamente, 2 meses procedentes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade São Paulo. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (4 ratos/gaiola) em ambiente com temperatura de 23 ± 2 °C, sob ciclo claro/escuro de 12 horas e, tiveram livre acesso à água e alimento (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes Ltda, Curitiba, PR).

4.2 Indução ao *Diabetes mellitus*

Para indução do *Diabetes mellitus* os animais receberam uma única injeção endovenosa de estreptozotocina (65 mg/kg) dissolvida em tampão citrato, pH 4,2. Animais controle receberam volume equivalente de tampão citrato, pela mesma via. Os experimentos foram realizados 2 semanas após a injeção da droga diabetogênica. A glicemia foi determinada através de um monitor de glicose (Roche Diagnostics Corporation, IN, USA), utilizando-se amostras de sangue obtidas da extremidade da cauda dos animais. Foram utilizados somente animais com glicemia superior a 200 mg/dL.

4.3 Obtenção de células

Os neutrófilos foram obtidos da cavidade peritoneal de ratos após a injeção intra-peritoneal (i.p) de 10 mL de uma solução de glicogênio de ostra tipo II (1%) em tampão fosfato-salina (PBS) (NaCl 137 mM, KCl 3 mM, KH₂PO₄ · H₂O 1 mM, Na₂HPO₄ · 7H₂O 6 mM), pH 7,4 (RIMELE et al., 1988; STURM et al., 1989). Após 4 horas, os animais foram mortos por deslocamento cervical e a cavidade peritoneal foi lavada com 20 mL de PBS. As células obtidas com pipeta Pasteur plástica foram centrifugadas a 1200 rpm durante 10 minutos a 4°C e, ressuspendidas em 1mL de PBS. Da suspensão de células, contendo 95 a 98% de neutrófilos, uma alíquota de 10 µL foi retirada para contagem em câmara de Neubauer.

4.4 Cultura celular

Neutrófilos (5×10^5 - 10^6 /mL) foram mantidos em meio RPMI 1640 contendo 1% de soro fetal bovino por 30 minutos. O meio foi suplementado com 25 mM de Hepes, 2 mM de glutamina, 24 mM de bicarbonato de sódio, 100 µg/mL de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina. As células foram mantidas em estufa a 37 °C, contendo 5% de CO₂.

4.5 Delineamento experimental

Os neutrófilos foram ativados ou não com 20 nM de *Phorbol 12-Myristate 13-Acetate* (PMA) por 60 minutos. PMA ativa PKC, que promove a formação do complexo NADPH oxidase e consequentemente a produção de EROs. O PMA promove o estímulo farmacológico direto, ou seja, sem ativação de receptores que poderiam contribuir para o processo de morte celular, tornando o estudo mais coeso. Dessa maneira, esse estudo priorizou a influência da produção de EROs na indução do estresse de retículo endoplasmático e o possível envolvimento no processo de morte dos neutrófilos. A produção de EROs é uma resposta típica do neutrófilo à inflamação, que visa erradicar o agente invasor e que tem uma grande influencia na homeostasia do RE. Para determinação do tempo de estímulo foi realizada a curva de tempo-resposta com PMA (20 nM) que identificou após 1 h alteração do potencial transmembrânico mitocondrial, um dos primeiros indícios do processo de morte celular, sendo que em tempos subsequentes observou-se também diminuição da integridade de membrana celular e aumento da fragmentação de DNA. Como o intuito do projeto foi estudar a participação de RE, mitocôndria e NADPH oxidase na vigência do processo de morte celular e não o fim do mesmo, o período de 1 h para estímulo foi o determinado para as análises. Os grupos controle e diabético foram subdivididos em t0 (tempo zero), “No PMA” e PMA. No t0 os neutrófilos não foram submetidos à cultura, dessa maneira, logo após o lavado peritoneal foram submetidos às análises. O subgrupo “No PMA” representa neutrófilos mantidos em cultura por 1h, sem estímulo; e o subgrupo “PMA” representa os neutrófilos estimulados em cultura por 1h. Dessa maneira, as análises dos parâmetros que indicam a possível participação do estresse de retículo na morte de neutrófilos foram realizadas em células estimuladas ou não em todos os protocolos descritos a seguir.

4.6 Imunofluorescência para detecção do estresse de RE

Neutrófilos (2×10^6) foram incubados durante 30 minutos a 37°C com Hank's Ballanced Salt Solution (HBSS) (140 mM NaCl; 5,37 mM KCl; 1,26 mM CaCl₂.2H₂O; 0,81 mM MgSO₄; 0,36 mM KH₂PO₄; 0,34 mM Na₂HPO₄; 4,17 mM NaHCO₃; 5,55 mM D-glicose, 2,00 mM Glutamina, pH 7,4) e 1 µM de ER-tracker™ Blue-White DPX (*Molecular Probes*). Logo após, células foram lavadas com HBSS e ressuspensas em meio de cultura. Em seguida, os neutrófilos foram plaqueados sobre lamínulas previamente tratadas com Histogrip™ e receberam ou não estímulo com PMA (20 nM). Após uma hora de incubação, lamínulas foram lavadas com HBSS e as células avaliadas através de microscópio de fluorescência (Aristoplan, Leitz, Germany).

4.7 PCR em tempo real

4.7.1 Extração de RNA

O RNA total de neutrófilos foi obtido de $1,5 \times 10^7$ células pelo método de extração com isotiocianato de guanidina (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987), usando o reagente TRIzol® (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*). As células foram lisadas com TRIzol que mantém a integridade do RNA, enquanto rompe membrana e todos os componentes celulares. Inicialmente, as amostras homogeneizadas foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente para permitir dissociação completa dos complexos nucleoproteicos. Foi adicionado clorofórmio (0,2 mL) e centrifugado a 12.000 x g por 15 minutos, a 4°C. A fase aquosa foi transferida e o precipitado de RNA foi obtido por centrifugação (12.000 x g, por 10 minutos, a 4°C) após adição de 0,5 mL de isopropanol (CHOMCZYNSKI, 1993). O pellet de RNA foi lavado com etanol a 75% e centrifugado a 7.500 x g por 5 minutos, a 4 °C. Finalmente, o pellet de RNA foi seco à temperatura ambiente, ressuspenso em água livre de RNase e armazenado a -70 °C. A quantificação e pureza do RNA foram realizadas por espectrofotometria na absorbância de 260/280 nm.

4.7.2 Reação transversa (RT)

O RNA (1,5 µg) foi tratado com 1U DNase I, por 15 minutos, à 25 °C e inativado com 25 mM EDTA, por 10 minutos, à 65 °C. Em seguida, o cDNA foi sintetizado em 20 µL de uma mistura de reagentes contendo 10 mM dNTP Mix (10 mM cada dATP, dGTP, dCTP e dTTP), 0,1 M DTT (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*) e 200 U da Thermo Scientific Maxima™ Reverse transcriptase – Fermentas, à 42°C, por 50 minutos. A reação foi inativada por aquecimento, à 70 °C, por 15 minutos.

4.7.3 Real Time Polymerase Chain Reaction (Real time PCR)

A expressão gênica da chaperona Bip (GRP78), dos sensores de estresse de RE (IRE1, PERK e ATF-6), proteínas da MAM (Mitofusina 2, GRP75, PACS2), razão Bax/Bcl2 e do fator de transcrição CHOP foi avaliada por PCR “real-time”(Tabela 1) (HIGUCHI et al., 1992) em um equipamento Rotor Gene 6000 (*Corbett Research, Mortlake, Australia*), com o uso do kit Sigma *SYBR®Green Taq ReadyMix™* que contém SYBR® Green I como sonda fluorescente. A quantificação da expressão gênica foi calculada por $2^{\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; PFAFFL, 2001), utilizando a expressão do gene *Ribosomal Protein S6* como controle padrão.

Tabela 1- Sequências de primers, temperatura de anelamento e tamanho do produto dos genes estudados.

(Continua)

Genes	Primers	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do produto do PCR (pb)
ATF6 NM_001107196	Sense: TGAAGTGGAAAGGACCAAATCG Anti: AGAGCACCCCTGGAGAATGCG	56	72
BIP (GRP78) NM_013083	Sense : GACGCACTTGGAATGACCCTTC Anti : TGGCAAGAACTTGATGTCCCTGC	50	57
Bax NM_017059.1	Sense: GACACTGGACTTCCTCCGTGAG Anti: AGCCACCCTGGTCTGGATC	55	56

Tabela1- Sequências de primers, temperatura de anelamento e tamanho do produto dos genes estudados.

(Conclusão)

Bcl2 NM_016993.1	Sense: GTGGACAAACATCGCTCTGTGG Anti: CATCCCAGCCTCCGTTATCC	56	82
CHOP NM_001109986	Sense : ACGGAAACAGAGTGGTCAGTGC Anti :TGCTCCTTCTCCTTCATGCG	55	63
GRP75 NM_001100658.1	Sense: TGGCTGTTATGGAGGGCAAAC Anti: GGTAGTTCTGGCACCTTCGGAG	57	62
IRE1 NM_001191926	Sense: TGTGGAGCAGAAGGACTTCGC Anti: TCTGATGAAGCAAGGTGATGGG	57	59
Mitofusin 2 NM_130894	Sense : CAACTCCATCGTCACCGTCAAG Anti : TCACCTCAGCCATGTGTCGC	57	50
PACS2 NM_134406.1	Sense : ACGGAGATCGGCAGTCTAAC Anti : TTCCATAGGGCTGGTGGTGT	56	63
PERK NM_031599.1	Sense : CAAGCCAGAGGTGTTGGGAAC Anti : TCTCCGTCCAGGGAAGGAATG	58	51
S6 NM_031985	Sense: GCAGATGGATGTGACAACGAGC Anti: GCTGTCGGATTGGAAGTGGC	57	56
XBP1 NM_001004210	Sense : ACGCTGTTGCCTCTCAGATTC Anti : CATGACAGGGTCCAACTTGTCC	55	71

4.7.4 XBP-1 mRNA Splicing

O cDNA XBP-1 de rato foi amplificado por RT-PCR (Qiagen OneStep RT-PCR kit) utilizando-se de primers que se ligam antes do ítron que é excisado pela atividade exonuclease do IRE1. Dessa maneira, os primers conseguem sintetizar o cDNA do mRNA correspondente ao IRE1 inteiro e clivado. As sequências dos primers para amplificar XBP-1 e sXBP1 de rato foram: 5'AAA CAG AGT AGC AGC ACA GAC TGC 3' e 5' TCC TTC TGG GTA GAC CTC TGG GAG 3'. O protocolo para RT-PCR foi o seguinte: 50 °C (30 min); 95 °C (15 min); 35 ciclos de {94 °C (1 min), 60 °C (1 min), 72 °C (1 min)} e 72 °C (10 min). Os cDNAs produzidos pelo RT-PCR foram submetidos à eletroforese em um gel de agarose 3% e visualizados utilizando-se obrometo de etídio.

4.8 Western Blotting

A análise de western blotting foi realizada conforme descrito anteriormente (OHIRA et al., 2004; OMORI et al., 2004). Neutrófilos (1×10^7) foram rapidamente lisados pela adição de 60 μL de tampão 1% Triton X100 com 1% (v/v) *cocktail inibidor de protease* (Sigma-Aldrich) e 1 mM PMSF. Alíquotas destas amostras foram separadas por SDS-PAGE (30 $\mu\text{g/poço}$). As proteínas separadas foram transferidas, eletroforeticamente, para membranas de nitrocelulose utilizando tampão Tris-borato [25 mM Tris, 192 mM glicina e 20% (v/v) metanol, pH 8,4] (TOWBIN et al., 1979). Proteínas foram transferidas a 100 V por 150 minutos a 4 °C. As membranas foram bloqueadas por 1 h a temperatura ambiente com 5% de leite desnatado (pH 7,6). O tampão de bloqueio foi removido e as membranas foram incubadas com os anticorpos primários apropriados (PERK, eiF2α, peiF2α, ATF4, CHOP, GADD34, pJNK, ATF6, mitofusina 2) overnight a 4 °C em 20 mM Tris HCl (pH 7,6) contendo 250 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween 20, 1% (w/v) BSA e 0,002% (w/v) NaN3. As membranas foram subsequentemente lavadas três vezes (10 min. por lavagem) com TBST [20 mM Tris-HCl (pH 7,6) contendo 150 mM NaCl e 0,1% (v/v) Tween 20] e então incubadas com os anticorpos secundários (goat anti-mouse ou rabbit IgG-HRP conjugada) em TBST por 1 h a temperatura ambiente. As membranas foram lavadas três vezes em TBST. A atividade da HRP foi visualizada pela incubação das membranas por 5 minutos à temperatura ambiente com sistema de detecção ECL (Pierce), seguido de autoradiografia. Ao término dos experimentos, os blots foram normalizados pela membrana corada componceau como previamente descrito por Romero-Calvo et al. em 2010 e Aldridge et al. 2008 (APÊNDICE A). A densidade das bandas foi determinada através do software Image J (NIH).

4.9 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio

A mistura de reação contendo 200 μL de tampão HBSS, 500 μM de Luminol, inibidores da NADPH oxidase e PKC, 10 μM *Diphenylene iodonium* (DPI) (LIU; ZWEIER, 2001) e 0,2 μM GF109203X (GFX) (KAWAKAMI et al., 2000), e 1×10^6 neutrófilos/ml foi submetida a uma leitura cinética por 45 min em intervalos de 3 minutos. A leitura de quimiluminescência foi feita através do leitor de microplacas (*Sinergy HT, Biotek, USA*). O controle negativo foi composto somente por mistura de reação e a reação foi iniciada ao adicionar 10 μL de PMA (160 nM).

4.10 Atividade de caspases por espectrofluorescência

A atividade da caspase 3 foi avaliada através do espectrofluorímetro da *Biotek* (*Sinergy HT, USA*) conforme descrito na seqüência. Neutrófilos foram ressuspensos e homeogeneizados em 50 µL de tampão de lise. As células foram incubadas por 10 minutos a 4 °C e, em seguida, 50 µL de tampão de reação contendo 10 mM ditiotreitol (DTT) foi adicionado em cada amostra. Em seguida, 5 µL de substrato (50 µM) [caspase 3 (DEVD-AFC - AFC: *7-amino-4-trifluoromethyl coumarin*)] foi adicionado no ensaio e as amostras incubadas a 37 °C por 2 horas (BioVision Corporate, Califórnia, USA) . A atividade da caspase foi determinada pela avaliação da fluorescência de AFC emitida após a clivagem do substrato pela respectiva caspase. O AFC livre emite fluorescência no λ máximo de 505 nm (ANDERSON et al., 2000).

4.11 Análise estatística

Os resultados foram avaliados por análise de variância two-way-ANOVA seguida pós teste de Bonferroni. Foi considerado significativo $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Os animais diabéticos apresentaram perda de peso, aumento significativo da glicemia e menor número de neutrófilos obtidos do lavado peritoneal quando comparados aos animais controle (*Figura 6*)

Inicialmente verificou-se qualitativamente o estresse de RE em neutrófilos de animais controles e diabéticos. Para tanto as células foram marcadas com ER-tracker™ Blue-White DPX (Molecular Probes), uma sonda fluorescente capaz de detectar alterações morfológicas no RE, sendo que quanto maior a intensidade e frequência de fluorescência, maior a influência do estímulo na integridade da organela, podendo ser um indicativo de estresse. Pôde-se observar uma maior frequência e intensidade de fluorescência em neutrófilos de animais diabéticos não estimulados e após PMA (*Figuras 7C e 7G*) quando comparado com o grupo controle não estimulado e após PMA, respectivamente (*Figuras 7A e 7E*), indicando o aumento de estresse de RE tanto em neutrófilos de animais diabéticos em estado basal como quando estimulados.

Com o objetivo de investigar a ativação da UPR, foi avaliada a expressão de genes envolvidos na homeostasia do RE. Com relação a chaperona Bip (GRP78), verificou-se aumento de sua expressão em neutrófilos de ratos controle após estímulo com PMA em relação ao t0; no entanto, esse aumento não foi observado em neutrófilos do grupo diabético (*Figura 8*). Os três componentes da UPR também foram avaliados por qPCR, com relação ao IRE1 α verificou-se aumento de sua expressão em neutrófilos do grupo diabético estimulados ou não com PMA quando comparado ao t0 diabético, enquanto que no grupo controle só houve aumento no grupo estimulado com PMA (*Figura 9A*). A expressão gênica de PERK (*Figura 9B*) e ATF6 (*Figura 9C*) não alterou significativamente nos grupos estudados. O fator de transcrição CHOP, que está diretamente ligado à morte celular por estresse de RE, teve sua expressão aumentada tanto em neutrófilos de animais controles quanto de animais diabéticos após estímulos com PMA. Células provenientes de animais diabéticos que permaneceram por 1h em cultura já apresentaram maior expressão de CHOP quando comparados aos neutrófilos em t0 (*Figura 10*). A avaliação dos possíveis componentes celulares envolvidos no processo de morte dos neutrófilos culmina na verificação da formação da MAM e de suas proteínas reguladoras, como a Mitofusina-2, PACS2 e GRP75. A expressão gênica de mitofusina-2 está aumentada em células oriundas de animais controle após estímulo com PMA quando comparadas às células nas condições t0 e No PMA. Já em neutrófilos de animais diabéticos,

não se observou qualquer alteração na expressão deste gene (Figura 11A). Com relação a expressão gênica de PACS2, não se observou diferença significativa entre os grupos estudados (Figura 11B). Verificou-se diminuição da expressão gênica de GRP75 nos neutrófilos dos animais diabéticos após estímulo com PMA quando comparado com o grupo controle (Figura 11C). Os resultados observados indicam comprometimento na interação entre mitocôndria e RE dos neutrófilos de animais diabéticos. A razão da expressão gênica Bax/Bcl2 também é um indicativo da ativação de genes anti e pró-apoptóticos e esta se encontra aumentada em neutrófilos de ratos diabéticos quando comparado com o grupo controle, indicando uma maior susceptibilidade das células provenientes do grupo diabético a morte (Figura 12).

A análise do conteúdo de proteínas da via da PERK não indicou diferença significativa entre os grupos estudados quanto as proteínas PERK, eIF2 α , ATF4 e GADD34 (Figura 13A, B,D e F). No entanto, a fosforilação de eIF2 α no subgrupo “No PMA” mostrou-se elevada no grupo controle quando comparado com o grupo diabético (Figura 13C), o mesmo observado na relação p-eIF2 α /eIF2 α . O conteúdo de CHOP mostrou-se elevado em ambos os grupos no T0 e diminuído no diabético após estímulo com PMA (Figura 13E).

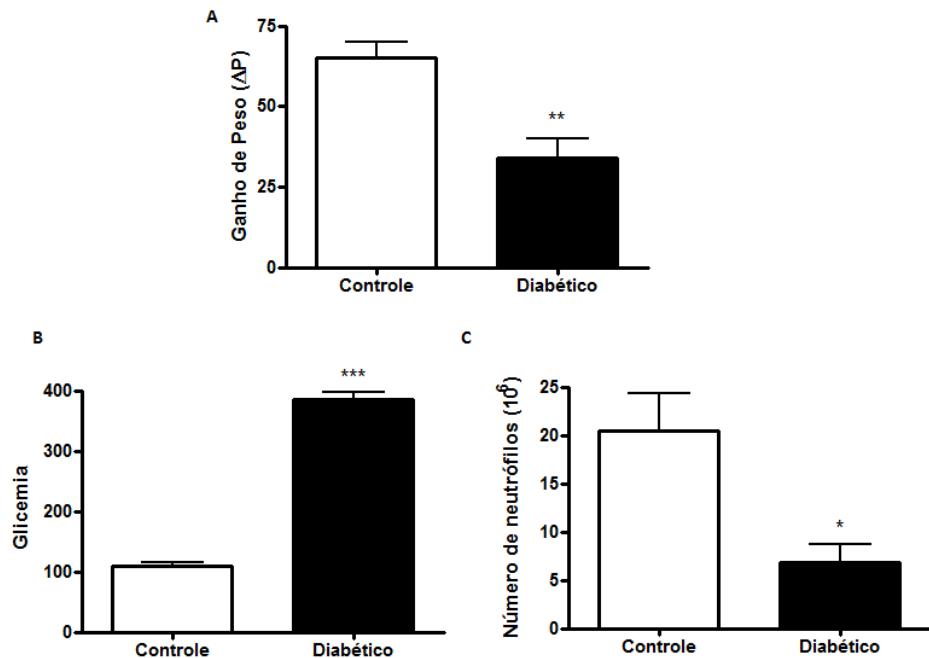
Para analisar a via do IRE1 α foi feito o ensaio do *splicing* do XBP1 através de RT-PCR, no qual se verificou que há o *splicing* de XBP1 em ambos os grupos e em todas as condições estudadas, indicando a possível ativação basal dessa via e a não interferência do estímulo PMA no *splicing* desse mRNA (Figura 14A). A fosforilação de JNK acontece na ativação de IRE1 α por uma via independente do *splicing* de XBP1 em situações de estresse de RE crônico. Observou-se o aumento da fosforilação dessa proteína em neutrófilos provenientes do grupo diabético estimulados ou não com PMA, tanto quando comparado aos neutrófilos em t0 do grupo diabético, como quando comparado aos neutrófilos provenientes do grupo controle estimulado ou não com PMA. (Figura 14B).

O conteúdo de ATF6 não alterou nos grupos e condições estudadas. (Figura 15). O conteúdo de mitofusina 2, uma proteína essencial na interação entre mitocôndria e RE, mostrou-se elevado nos grupos estimulados com PMA, porém não houve diferença significativa entre os grupos controle e diabético (Figura 16).

Com relação à produção de espécies reativas de oxigênio, avaliada através de quimioluminescência, não houve diferença significativa entre os grupos e condições estudadas, mesmo quando avaliada a produção na presença de inibidores da NADPH oxidase e de PKC, DPI e GFX, respectivamente. (Figura 17A).

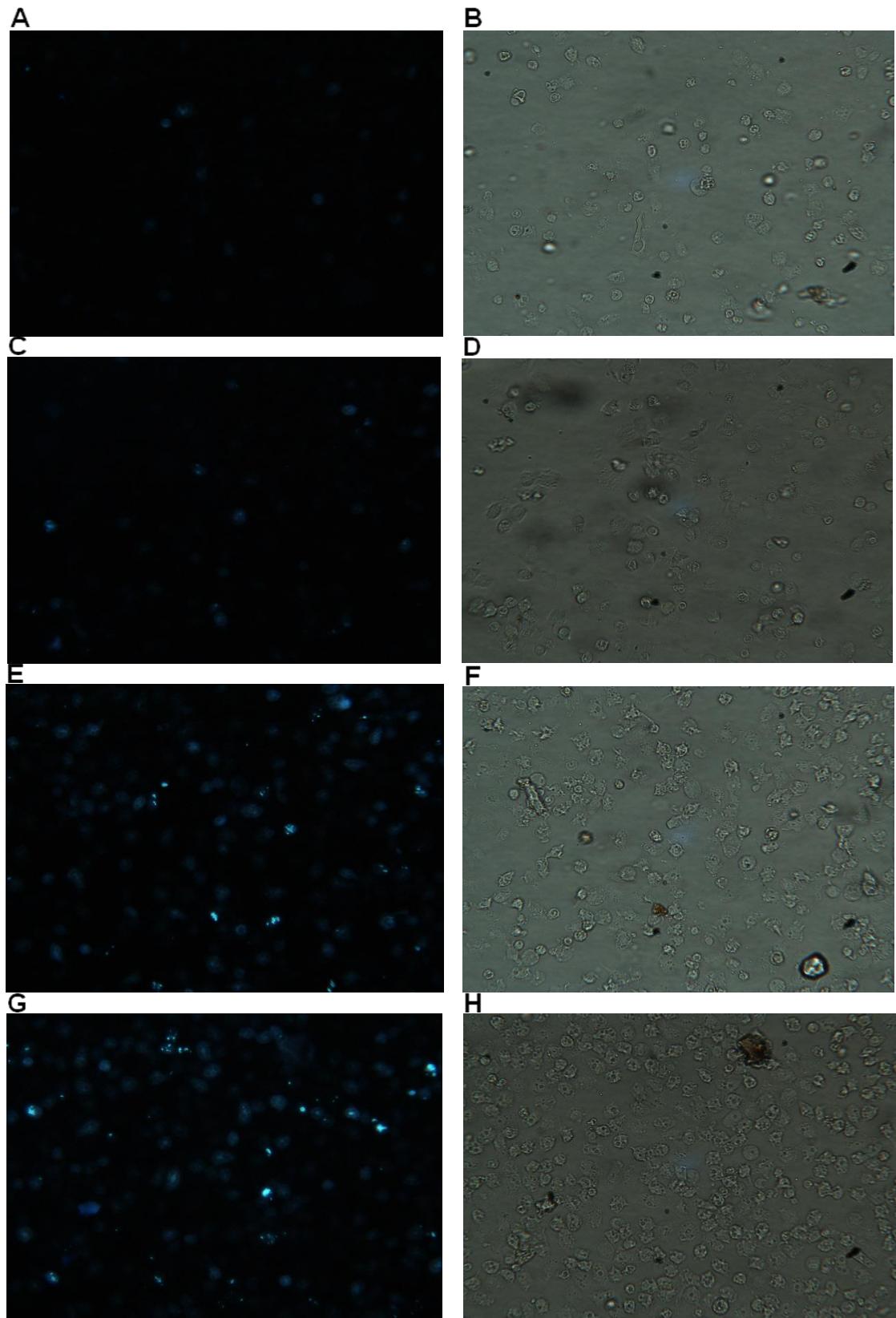
Neutrófilos provenientes de animais diabéticos apresentam aumento de 40% na atividade de caspase 3 quando comparado às células oriundas de animais controle, ambos sob estímulo de PMA.

Figura 6- Gанho de peso (A), Glicemia (B) e Número de neutrófilos (C) dos grupos estudados.



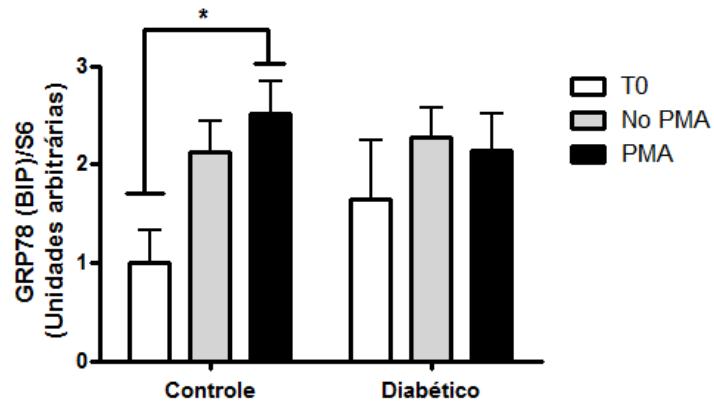
Diabetes foi induzido por estreptozotocina (65mg/Kg, i.v.) e os animais permaneceram nessa condição por 2 semanas. A glicemia foi determinada em animais alimentados 24h antes do sacrifício dos animais. O número de neutrófilos refere-se a quantidade de células obtidas no lavado peritoneal 4h após a injeção de glicogênio de ostra (1%). Os valores são apresentados pelas médias \pm e.p.m. (n=12). * p<0.05; ** p<0.01 e ***p<0.001.

Figura 7- Fotomicrografia de neutrófilos para detecção de estresse de RE através de imunofluorescência.



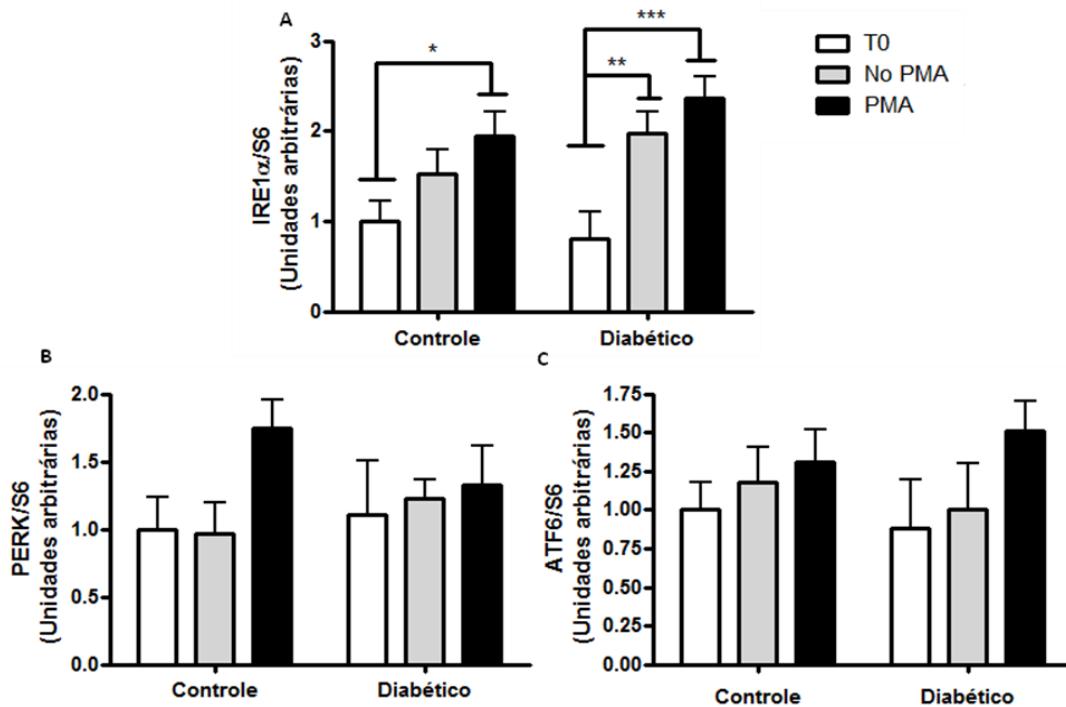
Grupos estudados: controles (n=8) e diabéticos (n=8). Neutrófilos de animais controles e diabéticos na ausência de estímulo (A e C) ou após estímulo com 20 nM de PMA por 1 hora (E e G). Imagens em A,C,E e G foram adquiridas por fluorescência. B, D, F e H imagens de campo claro das amostras A, C, E e G, respectivamente. (Aumento 400x).

Figura 8- Expressão gênica da chaperona GRP78 (BIP) por qPCR.



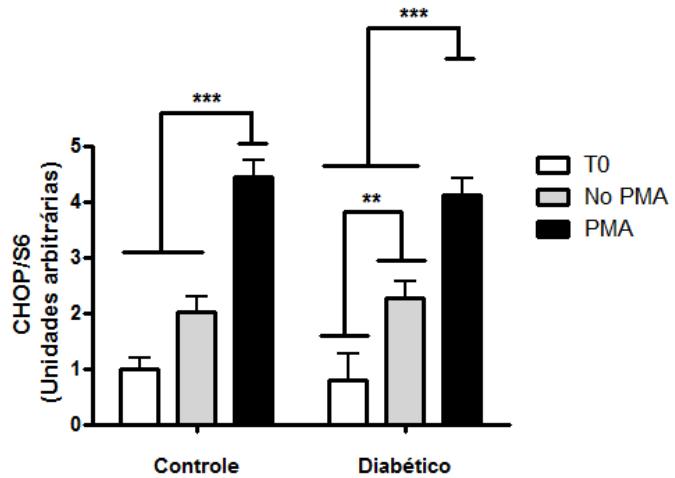
O diabetes mellitus foi induzido pela injeção de STZ (65 mg/Kg, i.v.) 2 semanas antes. Os neutrófilos foram obtidos do lavado peritoneal 4 horas após injeção de solução de glicogênio de ostra tipo II (1%). Grupos estudados: controles (n=11), diabéticos (n=11), nas seguintes condições: tempo zero (T0) e estimulados ou não com PMA (20 nM). S6 foi utilizado como gene normalizador. * p < 0,05.

Figura 9- Expressão gênica dos componentes da UPR: IRE1- α (A), PERK (B) e ATF6 (C) por qPCR.



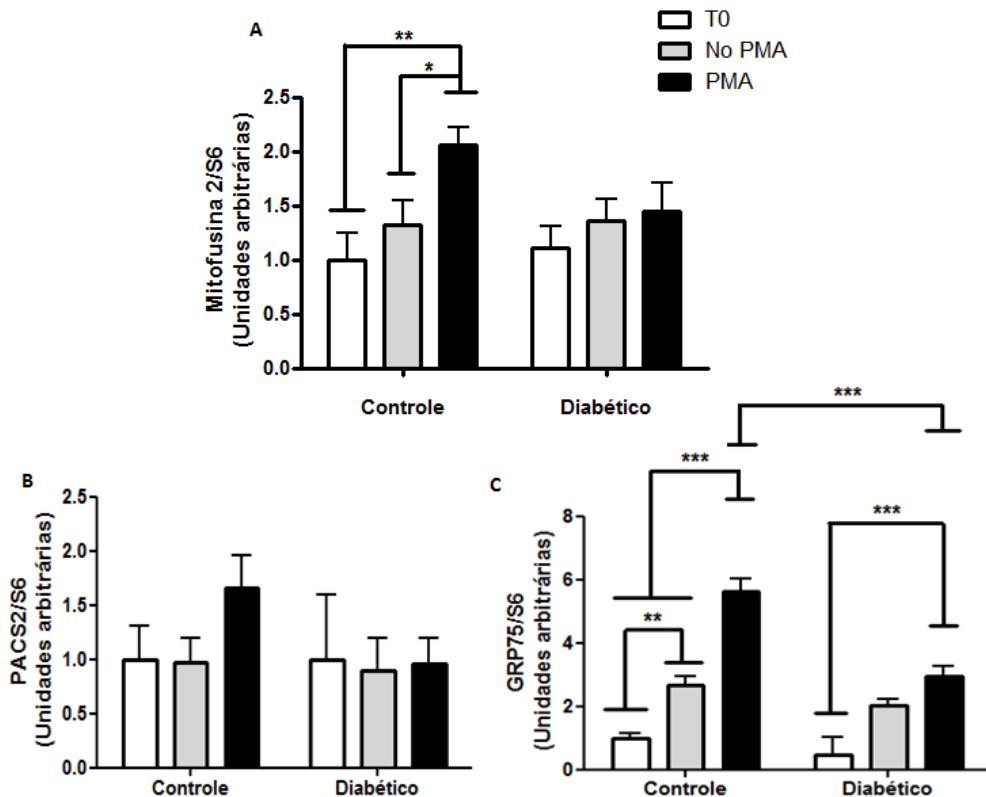
O diabetes mellitus foi induzido pela injeção de STZ (65 mg/Kg, i.v.) 2 semanas antes. Os neutrófilos foram obtidos do lavado peritoneal 4 horas após injeção de solução de glicogênio de ostra tipo II (1%). Grupos estudados: controles (n=11) e diabéticos (n=11), nas seguintes condições: tempo zero (T0) e estimulados ou não com PMA (20 nM). S6 foi utilizado como gene normalizador. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Figura 10- Expressão gênica do fator de transcrição CHOP por qPCR.



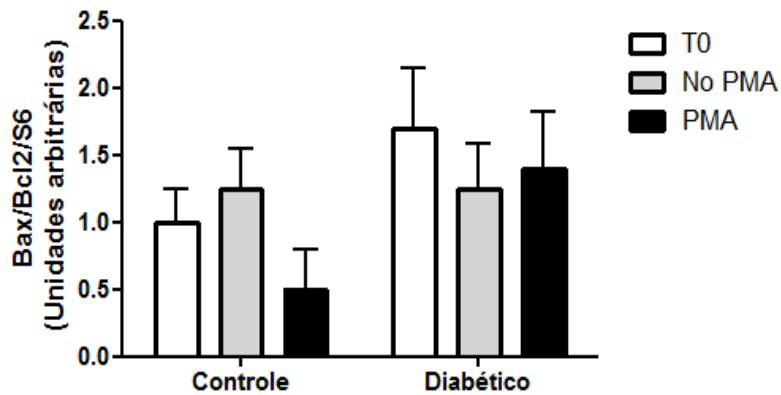
O diabetes mellitus foi induzido pela injeção de STZ (65 mg/Kg, i.v.) 2 semanas antes. Os neutrófilos foram obtidos do lavado peritoneal 4 horas após injeção de solução de glicogênio de ostra tipo II (1%). Grupos estudados: controles (n=11) e diabéticos (n=11), nas seguintes condições: tempo zero (T) e estimulados ou não com PMA (20 nM). S6 foi utilizado como gene normalizador. ** p < 0,01; *** p<0,001.

Figura 11- Expressão gênica das proteínas reguladoras da MAM: Mitofusina-2 (A), PACS2 (B) e GRP75 (C) por qPCR.



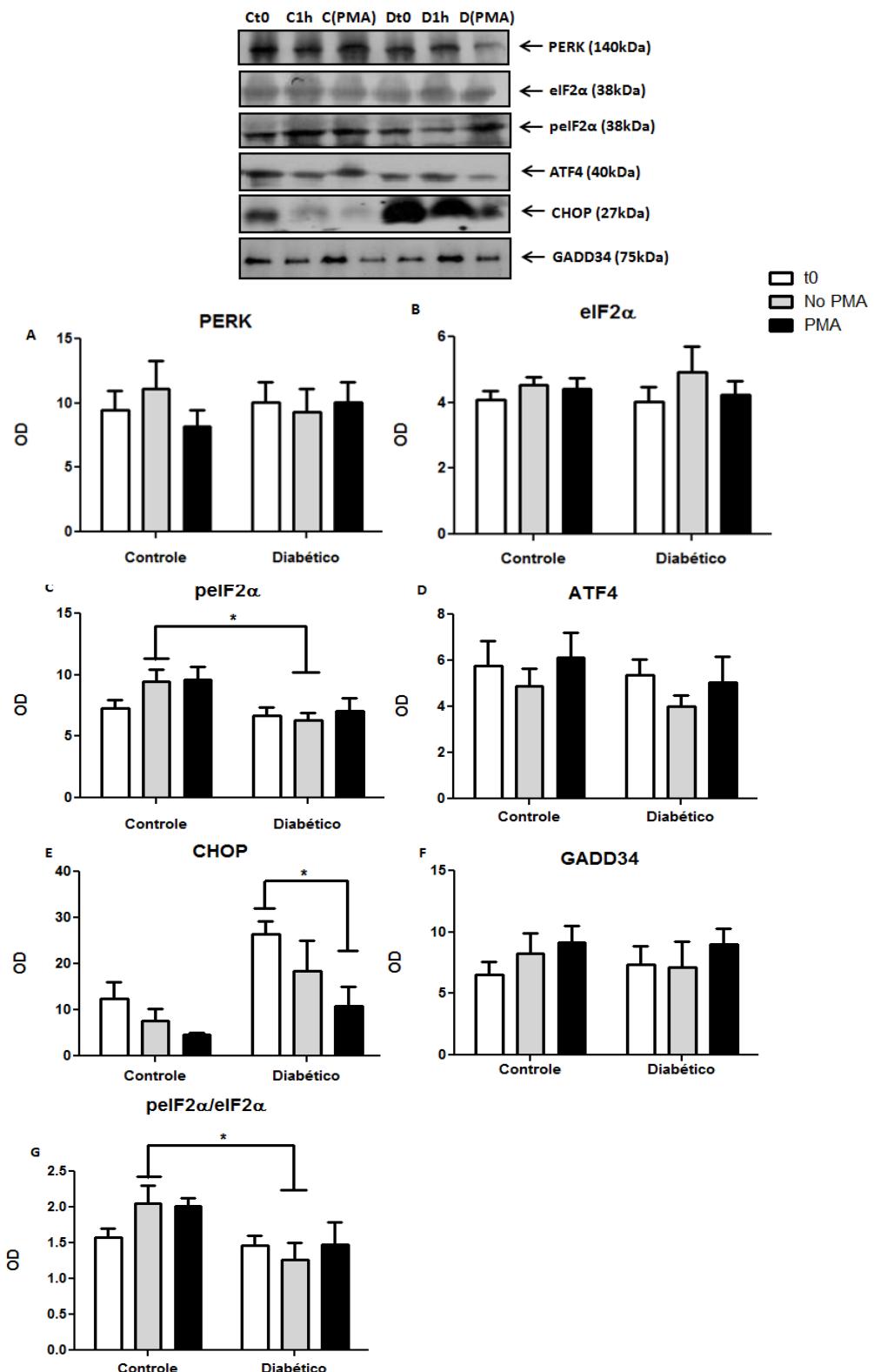
O diabetes mellitus foi induzido pela injeção de STZ (65 mg/Kg, i.v.) 2 semanas antes. Os neutrófilos foram obtidos do lavado peritoneal 4 horas após injeção de solução de glicogênio de ostra tipo II (1%). Grupos estudados: controles (n=11) e diabéticos (n=11), nas seguintes condições: tempo zero e estimulados ou não com PMA (20 nM). S6 foi utilizado como gene normalizador. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p<0,001.

Figura 12- Expressão gênica da razão Bax/Bcl2 por qPCR.



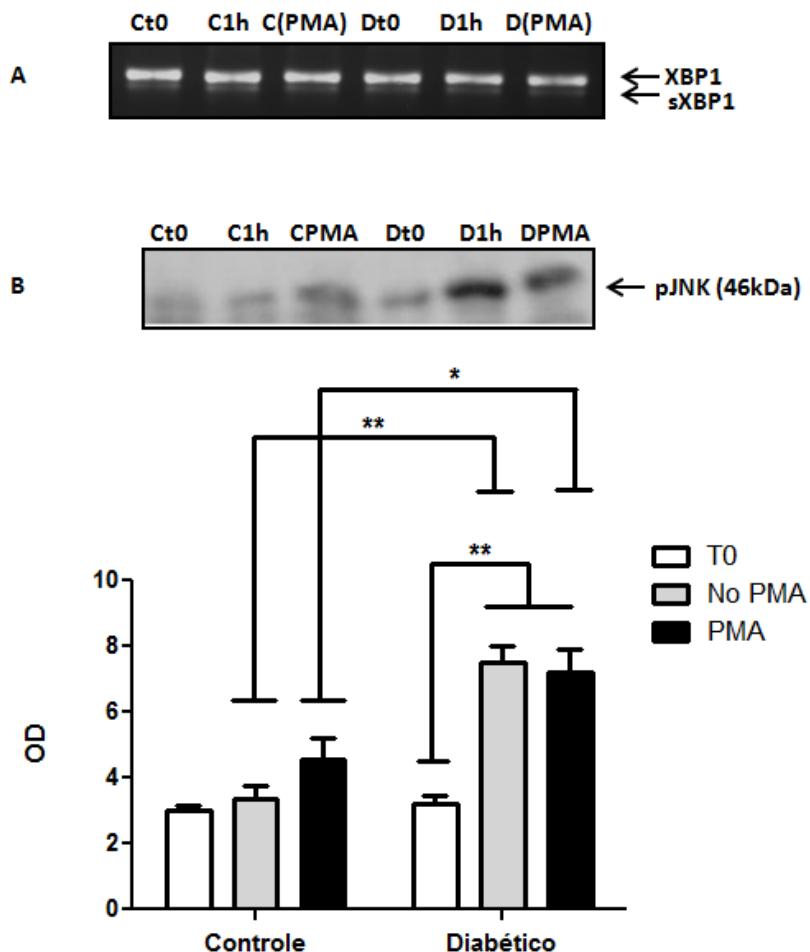
O *diabetes mellitus* foi induzido pela injeção de STZ (65 mg/Kg, i.v.) 2 semanas antes. Os neutrófilos foram obtidos do lavado peritoneal 4 horas após injeção de solução de glicogênio de ostra tipo II (1%). Grupos estudados: controles (n=11) e diabéticos (n=11), nas seguintes condições: tempo zero e estimulados ou não com PMA (20 nM). S6 foi utilizado como gene normalizador.

Figura 13- Conteúdo das proteínas relacionadas à via da PERK da UPR.



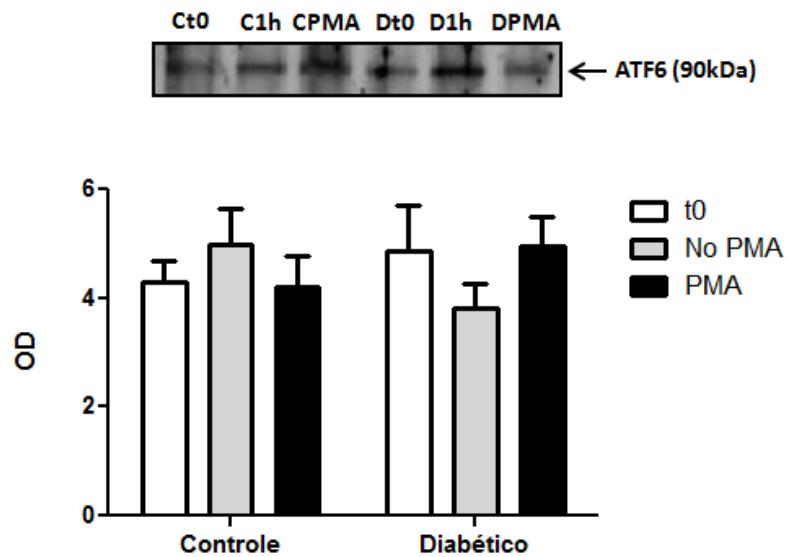
O diabetes mellitus foi induzido pela injeção de STZ (65 mg/Kg, i.v.) 2 semanas antes. Os neutrófilos foram obtidos do lavado peritoneal 4 horas após injeção de solução de glicogênio de ostra tipo II (1%). Grupos estudados: controles (n=6) e diabéticos (n=6), nas seguintes condições: tempo zero (t0) e estimulados ou não com PMA (20 nM). Ct0: Controle t0. C1h: Controle No PMA 1h. C(PMA): Controle PMA 1h. Dt0: Diabético t0. D1h: Diabético No PMA 1h. D(PMA): Diabético PMA 1h. Bandas foram normalizadas pela membrana corada componceau. *p<0,05.

Figura 14- Splicing de XBP1 (A) e fosforilação da proteína JNK (B), eventos decorrentes da ativação de IRE1 α .



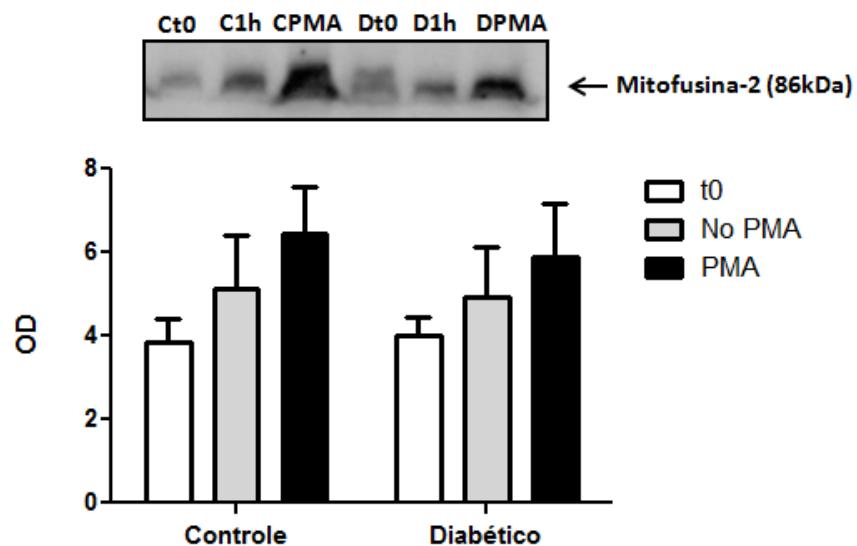
O diabetes mellitus foi induzido pela injeção de STZ (65 mg/Kg, i.v.) 2 semanas antes. Os neutrófilos foram obtidos do lavado peritoneal 4 horas após injeção de solução de glicogênio de ostra tipo II (1%). Grupos estudados: controles (n=2) e diabéticos (n=2), nas seguintes condições: tempo zero e estimulados ou não com PMA (20 nM). Bandas do WB foram normalizadas pela membrana corada componceau. Ct0: Controle t0. C1h: Controle No PMA 1h. C(PMA): Controle PMA 1h. Dt0: Diabético t0. D1h: Diabético No PMA 1h. D(PMA): Diabético PMA 1h. Bandas foram normalizadas pela membrana corada componceau. *p<0,05; **p<0,01.

Figura 15- Conteúdo de ATF6.



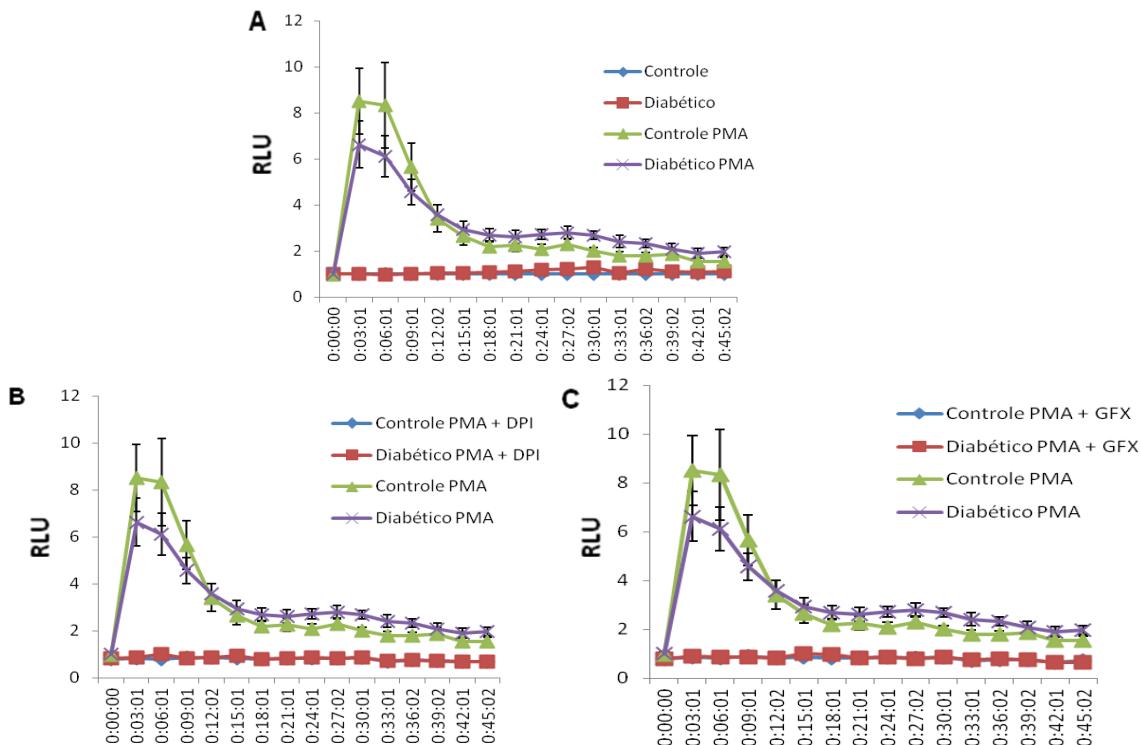
O diabetes mellitus foi induzido pela injeção de STZ (65 mg/Kg, i.v.) 2 semanas antes. Os neutrófilos foram obtidos do lavado peritoneal 4 horas após injeção de solução de glicogênio de ostra tipo II (1%). Grupos estudados: controles (n=6) e diabéticos (n=6), nas seguintes condições: tempo zero e estimulados ou não com PMA (20 nM). Bandas foram normalizadas pela membrana corada componceau. Ct0: Controle t0. C1h: Controle No PMA 1h. C(PMA): Controle PMA 1h. Dt0: Diabético t0. D1h: Diabético No PMA 1h. D(PMA): Diabético PMA 1h. Bandas foram normalizadas pela membrana corada componceau.

Figura 16- Conteúdo de mitofusina 2



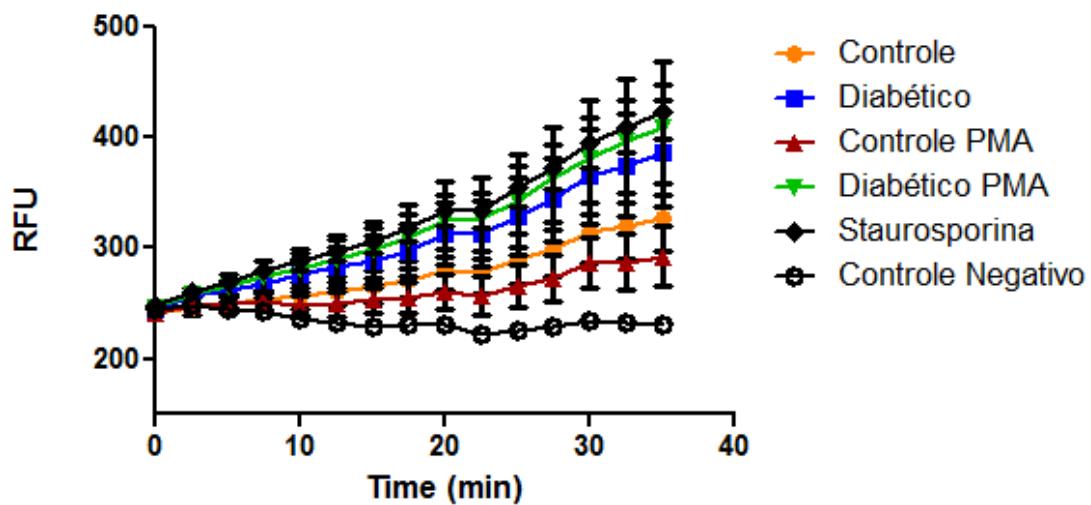
O diabetes mellitus foi induzido pela injeção de STZ (65 mg/Kg, i.v.) 2 semanas antes. Os neutrófilos foram obtidos do lavado peritoneal 4 horas após injeção de solução de glicogênio de ostra tipo II (1%). Grupos estudados: controles (n=6) e diabéticos (n=6), nas seguintes condições: tempo zero e estimulados ou não com PMA (20 nM). Bandas foram normalizadas pela membrana corada componceau. Ct0: Controle t0. C1h: Controle No PMA 1h. C(PMA): Controle PMA 1h. Dt0: Diabético t0. D1h: Diabético No PMA 1h. D(PMA): Diabético PMA 1h. Bandas foram normalizadas pela membrana corada componceau.

Figura 17- A produção de EROs por neutrófilos através de quimiluminescência e a ação dos inibidores da NADPH oxidase



O *diabetes mellitus* foi induzido pela injeção de STZ (65 mg/Kg, i.v.) 2 semanas antes. Os neutrófilos foram obtidos do lavado peritoneal 4 horas após injeção de solução de glicogênio de ostra tipo II (1%). Grupos estudados: controles (n=12) e diabéticos (n=12) estimulados ou não com PMA (20 nM) (A). A participação do complexo da NADPH oxidase e PKC na produção de EROs foi avaliada através da presença dos inibidores DPI (10 μ M) (B) e GFX (0,2 μ M) (C), respectivamente. Os valores representam a media das unidades relativas de luz (RLU) \pm e.p.m.

Figura 18- Atividade das Caspases 3 em neutrófilos.



O diabetes mellitus foi induzido pela injeção de STZ (65 mg/Kg, i.v.) 2 semanas antes. Os neutrófilos foram obtidos do lavado peritoneal 4 horas após injeção de solução de glicogênio de ostra tipo II (1%). Grupos estudados: controles e diabéticos (n= 6) estimulados ou não com PMA (20 nM). A atividade das caspases foi avaliada através de espectrofluorimetria e os valores representam a media das fluorescências ± e.p.m.

6 DISCUSSÃO

Inicialmente pode-se inferir que o estado diabético dos animais, após a indução da droga diabetogênica estreptozotocina, foi caracterizado pela redução do ganho de peso corpóreo e aumento da glicemia no estado alimentado. A quantidade de neutrófilos que migrou para o peritônio 4 horas após a administração do glicogênio de ostra diminuiu aproximadamente 70% em animais diabéticos. Estudos prévios demonstram que neutrófilos de animais diabéticos aderem menos ao endotélio, acarretando em menor número de células em local de inflamação (PEREIRA et al., 1987). Em 2006, Alba-Loureiro et al. demonstraram que neutrófilos de ratos diabéticos apresentam menor expressão de ICAM-1, uma proteína fundamental pra o processo de adesão leucocitária ao endotélio; o mesmo foi observado por Martins et al. (2006) em neutrófilos de animais diabéticos após o estímulo com LPS. Porém, essa redução do número de neutrófilos não implica nas análises realizadas em nosso estudo devido à normalização de todos os ensaios por número de células ou quantidade de proteína avaliada.

A primeira análise realizada para verificação da condição de estresse de RE foi a de morfologia através da microscopia de fluorescência. Em nosso estudo, verificou-se que neutrófilos de animais diabéticos tanto na condição basal quanto na condição estimulada (PMA 20 nM) apresentaram alterações da morfologia do RE quando comparados com células do grupo controle, indicando que a organela deve estar em condição de estresse. Segundo Kaufman (1999), em condições de estresse o RE aumenta de tamanho e perde sua morfologia característica com intuito de aumentar sua capacidade de dobramento de proteínas. Esse processo e as vias de sinalização em resposta a UPR vêm sendo bem definidos em células que secretam grandes quantidades de proteínas e/ou possuem alto metabolismo, como células β -pancreáticas, hepatócitos, osteoblastos, cardiomiócitos, entre outros (GASS; GIFFORD; BREWER, 2002; GASS et al., 2008; LAKSHMANAN et al., 2013; LIU et al., 2013). Nas células β pancreáticas, por exemplo, a hiperglicemia é um grande indutor de estresse de RE. Essas células por apresentarem um transportador de glicose com alto Km, o GLUT 2 (THORENS et al., 2010), não limitam a entrada dessa molécula na célula, ou seja, não se saturam facilmente. Dessa maneira, quanto maior a concentração de glicose no meio extracelular, maior o transporte de glicose e maior a concentração dessa molécula no citosol. A glicose, por sua vez, estimula as células β pancreáticas a produzirem insulina. Assim, o aumento nos níveis de glicose estimula a entrada de novas proteínas no RE para serem corretamente dobradas e exportadas para o Golgi, onde serão empacatodadas e preparadas

para a secreção. Essa sobrecarga gera estresse no retículo endoplasmático das células β pancreáticas e, caso o estímulo persista por muito tempo, a UPR ativa vias de morte celular (BACK et al., 2012; SANO; REED, 2013; TANG et al., 2012; WANG et al., 1998; ZINSZNER et al., 1998).

Estudos que relacionem polimorfonucleares (PMN), diabetes, estresse de retículo e morte celular são escassos na literatura. O primeiro estudo a demonstrar a ativação das vias da UPR em neutrófilos foi realizado por Binet et al. (2010), no qual verificou-se que o trióxido de arsênio (ATO) promove estresse de retículo em neutrófilos ativando, consequentemente, as vias de morte dependentes da organela. Nesse mesmo estudo, eles verificaram que o ATO induz a síntese *de novo* de proteínas, sendo que a maioria chaperonas, responsáveis por manter a homeostasia celular. Além disso, os pesquisadores inferem que a ativação do ER em PMN é geralmente um processo prolongado, acarretando em uma condição irreversível que leva a morte (BINET et al., 2010).

Em nosso estudo, verificou-se o aumento da expressão gênica da chaperona GRP78(BIP) nos neutrófilos do grupo controle sob estímulo de PMA. Nesse caso, assim como verificado por outros pesquisadores, o aumento da disponibilidade de chaperonas essenciais para o correto dobramento de proteínas seria o primeiro passo na ativação da UPR para resolução do estresse de retículo. Se o estresse for crônico e não houver resolução na primeira fase da UPR, outras vias que levam a morte são ativadas (SANO; REED, 2013; ZINSZNER et al., 1998; WANG et al., 1998). A não alteração na expressão gênica de GRP78 em neutrófilos dos animais diabéticos sugere que essas células estejam mais suscetíveis a indução do estresse como, por exemplo, na vigência de processo inflamatório, no qual aumenta a demanda de novas proteínas, dentre elas, citocinas e quimiocinas.

Verificamos também um aumento da expressão gênica de IRE1 α em neutrófilos de animais diabéticos, bem como um aumento na expressão desse gene nos neutrófilos dos grupos controle e diabético estimulados com PMA. A mesma situação aconteceu com a expressão gênica de CHOP. A expressão de CHOP pode ser aumentada pela ativação da via de PERK através de ATF4 ou pela via de ATF6, através da porção de 50 kDa dessa proteína proveniente da clivagem no complexo de Golgi (RON; WALTER, 2007). No entanto, não houve diferença significativa na expressão de PERK e ATF6, bem como na fosforilação de eIF2 α , conteúdo de ATF4 e de ATF6, avaliados pela técnica de *western blotting*. Sano e Reed (2013) mostraram que IRE1 α pode fosforilar e ativar CHOP via p38 MAPK, mas até o momento não se constatou qualquer relação entre a ativação de IRE1 α e aumento da expressão gênica de CHOP. O aumento da expressão gênica de IRE1 α observado em nosso

estudo não foi capaz de promover o aumento de sua atividade de processamento do mRNA XBP1. Porém, observou-se aumento no conteúdo da fosforilação de JNK em neutrófilos dos diabéticos estimulados ou não com PMA, sugerindo que a ativação de IRE1 α , previamente observada, tenha promovido a fosforilação da quinase através da via *TNF receptor-associated factor 2* (TRAF2) e ASK1. Sendo assim, esses dados reafirmam as duas vias independentes de IRE1 α . Na primeira ocorre o *splicing* de XBP1 e o aumento na produção de chaperonas e proteínas da via de degradação ERAD e, a segunda, promove a fosforilação de JNK que é translocada para a membrana mitocondrial onde promove a ativação de Bim e inibição de Bcl-2 favorecendo abertura de poros e liberação de proteínas pró-apoptóticas, levando a morte celular (RON; WALTER, 2007; SANO; REED, 2013). Nossos dados indicam que, em neutrófilos de ratos diabéticos, a segunda via estaria ativada.

Por outro lado, apesar do aumento da expressão gênica de CHOP nos neutrófilos dos grupos controle e diabético, estimulados com PMA, observou-se a diminuição do conteúdo proteico nesses mesmos grupos. Esse dado, aparentemente conflitante, pode indicar o papel de degradação global de mRNAs do IRE1 α , visando uma menor síntese proteica e menor entrada de novas proteínas no RE (RON; WALTER, 2007). Dessa maneira, mesmo que haja aumento da expressão gênica para a produção do mRNA responsável pela síntese de CHOP, esse mRNA seria degradado antes de ser traduzido, o que implicaria alto conteúdo de mRNA e baixo conteúdo proteico, como observado.

Outro ponto importante a ser abordado é a procedência do estímulo para o aumento da expressão gênica de CHOP. Como já visto, a via de PERK parece não ser ativada pelo PMA, principalmente por não observarmos alteração na fosforilação de eIF2 α e no conteúdo do fator de transcrição ATF4, responsável pela transcrição de CHOP, nos neutrófilos sob o estímulo. Porém, na ausência de PMA, os neutrófilos do grupo controle apresentam maior conteúdo de p ϵ IF2 α e razão p ϵ IF2 α /eIF2 α quando comparado com células do grupo diabético, fato que parece estar associado ao aumento da expressão de GRP78, porém não ao aumento de CHOP. O ATF6 parece também não participar dessa ativação, pois o menor conteúdo indicaria maior clivagem no golgi, o que também não foi observado. Mesmo assim, haveria necessidade de avaliação da porção clivada de ATF6, o p50ATF6, que devido a limitações metodológicas confiáveis não foi avaliada neste estudo. Apesar de Bruhat et al. (1999) verificarem que a deprivação de leucina resulta no aumento da expressão de CHOP, recentemente, Friedrich (2012) demonstrou que em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 e tipo 2 apresentam a concentração de leucina aumentada, indicando que este também não seria o mecanismo de

ativação de CHOP. Até o momento, não há na literatura a indicação de outros possíveis fatores que propiciariam o aumento da expressão de CHOP observada em nosso estudo.

O que podemos considerar é o elevado turnover dos neutrófilos, que poderia implicar as estas células apresentarem expressão de CHOP elevada, como se estivessem preparadas para o processo de morte. A regulação do conteúdo de CHOP ocorreria durante a ativação celular pela ação de degradação de mRNA do IRE1 α , pois no decorrer de um processo inflamatório, por exemplo, os neutrófilos necessitam de sobrevida maior afim de combater o agente invasor. A diminuição de CHOP promoveria a expressão gênica da proteína anti-apoptótica Bcl-2 que porpiciaria o aumento da sobrevida dessas células. Tabas e Ron (2011) observaram aumento de morte em cardiomiócitos quando induzidos ao estresse de retículo por apresentarem diminuição em Bcl-2, porém em animais CHOP $^{/-}$ a indução de estresse não promove alteração em Bcl-2 e, consequentemente, os cardiomiócitos são protegidos do processo de morte. Bcl-2 medeia sua ação anti apoptótica por sequestrar proteínas da família BH3-only, como Bad, Bim, Noxa e Puma, que são necessárias para a permeabilização da mitocôndria mediada por Bax-Bak e, consequentemente, a apoptose (CHENG et al., 2001).

Em nosso modelo observou-se aumento, embora não significativo da razão Bax/Bcl-2 em neutrófilos de animais diabéticos indicando maior vulnerabilidade destas células ao processo de morte. A diminuição da expressão de Bcl-2 favorece a formação de poros na mitocôndria por Bax-Bak, liberação de proteínas mitocondriais e ativação de caspase 3 (UEDA et al., 2002; VAN RAAM et al., 2006). Esse processo pode ser independente (CHAUHAN et al., 1997) ou dependente da liberação de citocromo C da mitocôndria (LI et al., 1997; PAN et al., 1998) como consequência do estresse oxidativo, por exemplo (UEDA et al., 2002). A caspase 3 ativa proteínas responsáveis pela condensação da cromatina, fragmentação do DNA e pela formação de corpos apoptóticos (UEDA et al., 2002). A análise da atividade da caspase 3 em nosso estudo denota o aumento da atividade dessa proteína de 40% em neutrófilos do grupo diabético quando comparado com células do grupo controle, sob estímulo de PMA. Porém, apesar de não observarmos alteração com relação à geração de EROs por neutrófilos provenientes dos grupos e condições estudadas, verificamos que o PMA aumenta demasiadamente a produção de EROs pela NADPH oxidase, alterando o estado redox da célula e, consequentemente, de suas organelas. No caso dos neutrófilos provenientes de animais diabéticos, por apresentarem maior razão Bax/Bcl-2, a proteção contra o estresse oxidativo causado pelo estímulo é menor e, consequentemente, o processo de morte celular apresenta-se alterado.

Ainda com relação à participação da mitocôndria e a possível interação com o RE no processo de morte celular, a região da MAM foi avaliada em nosso estudo através de suas proteínas reguladoras, sendo mitofusina-2, PACS2 e GRP75. Em neutrófilos de animais do grupo controle há um aumento significativo da expressão gênica de mitofusina 2 após estímulo com PMA, fato não observado em células provenientes de animais do grupo diabético o que implica na alteração na formação da MAM. Por outro lado, o conteúdo dessa proteína não alterou significativamente em neutrófilos de ambos os grupos após o estímulo com PMA, possivelmente devido ao tempo de exposição ao estímulo. Apesar da PACS2 ser necessária para a localização do *Transiente Receptor Potential Protein 2* (TRPP2) no RE e promover o contato entre essa organela e a mitocôndria, impedindo a liberação de cálcio e importante para a translocação de Bid para a mitocôndria induzindo vias extrínseca e intrínseca da apoptose (ASLAN et al., 2009; SIMMEN et al., 2005), não houve alteração significativa na expressão gênica de PACS2 entre os grupos e condições estudados. Com relação a GRP75, neutrófilos de animais diabéticos apresentaram menor expressão gênica quando comparado às células provenientes do grupo controle, sob o estímulo de PMA. Neutrófilos de animais controle apresentam maior expressão desse gene, mesmo em condição não estimulado, o que indica que a interação entre RE e mitocôndria nestas células está ocorrendo. Estudos inferem que o aumento da expressão de GRP75 e de mitofusina 2 está associado a proteção da indução do processo de morte. No entanto, ainda não há consenso se esse efeito é devido a melhor interação entre RE e mitocôndria ou a influência no processo de apoptose *per se* (JAHANI-ASL et al., 2007; VOCOLI et al., 2007; XU et al., 2009).

A MAM é responsável pela troca de cálcio entre RE e mitocondria e a transferência de ATP da mitocôndria para o RE. Algumas regiões do retículo com alta atividade de dobramento de proteínas liberam cálcio para o citosol e, nos locais em que o íon se concentra, há a associação física das mitocôndrias através das proteínas GRP75, mitofusina 2 e PACS2, formando a MAM. O aumento de cálcio no interior da mitocôndria estimula a ATP sintase a produzir ATP, este é liberado na MAM e captado pelo RE, favorecendo o dobramento das proteínas corretamente e, consequentemente, impedindo o estresse de RE (SIMMEN et al., 2010). Considerando esse mecanismo de troca e que os neutrófilos do grupo diabético apresentam alteração da expressão gênica das proteínas responsáveis pela associação física entre RE e mitocôndria, o cálcio liberado na MAM não se limitaria somente nesta região e extravazaria para o citoplasma ativando proteases e fosfolipases que culminaria em processo de morte celular (CSORDÁS et al., 2010; SIMMEN et al., 2010).

Em resumo, nosso estudo demonstrou que neutrófilos de ratos diabéticos quando estimulados com PMA apresentam maior susceptibilidade a morte devido à ativação de IRE1 α e, consequente, fosforilação de JNK; menor interação mitocôndria-RE na MAM e aumento da atividade de caspase 3. Essas alterações não seriam decorrentes da produção de EROs, devido o mesmo perfil encontrado em neutrófilos dos grupos estudados. Além disso, neutrófilos provenientes de animais controle parecem estar protegidos do estresse de RE por apresentar maior expressão de GRP78 e das proteínas da MAM. Os resultados obtidos podem corroborar para melhor compreensão de alterações funcionais dos neutrófilos observadas em pacientes diabéticos, como diminuição da expressão de proteínas de adesão, alterações no processo de fagocitose e resolução do processo inflamatório (GEERLINGS et al., 1999). Se a relação mitocôndria-RE, participação destas organelas no processo de morte e o estresse de RE em neutrófilos forem elucidados na vigência do *diabetes mellitus*, será possível progredir na compreensão da dinâmica do processo inflamatório, desenvolvimento de novas terapias farmacológicas e, consequentemente, na melhora da qualidade de vida de grande parte da população mundial acometida por esta síndrome.

REFERÊNCIAS

- ABO, A.; WEBB, M. R.; GROGAN, A.; SEGAL, A.W. Activation of NADPH oxidase involves the dissociation of p21rac from its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rhoGDI) followed by its translocation to the plasma membrane. **Biochem. J.**, v. 3, p. 585-591, 1994.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diab. Care.**, v. 20, p. 1183-1197, 1997.
- AGNER, K. Biological effects of hypochlorous acid formed by “MPO”-peroxidation in the presence of chloride ions. In: Akeson, A. e Ehrenberg, A. editors. Structure and Function of Oxidation Reduction Enzymes. New York: Pergamon; vol.18, p. 329-335, 1972.
- ALBA-LOUREIRO, T. C.; HIRABARA, S. M.; MENDONÇA, J. R., CURI, R.; PITHON-CURI T.C. Diabetes causes marked changes in function and metabolism of rat neutrophils. **J. Endocrinol.**, v. 188, p. 295–303, 2006b.
- ALBA-LOUREIRO, T. C.; MARTINS, E. F.; LANDGRAF R. G.; JANCAR S.; CURI R.; SANNO MIYA P. Role of insulin on PGE2 generation during LPS-induced lung inflammation in rats. **Life Sci.**, v. 78, p. 578-585, 2006a.
- ALDRIDGE, G. M.; PODREBARAC D. M.; GREENOUGH W. T.; WEILER I. J. The use of total protein stains as loading controls: an alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting. **J. Neurosci. Methods**, v. 172, n. 2, p. 250-254, 2008
- ANDERSEN, B.; GOLDSMITH, G. H.; SPAGNUOLO, P. J. Neutrophil adhesive dysfunction in diabetes mellitus: the role of cellular and plasma factors. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 111, p. 275-285, 1988.
- ANDERSSON, M.; SJOSTRAND, J.; PETERSEN, A.; HONARVAR, A. K.; KARLSSON, J.O.; Caspase and proteasome activity during staurosporin-induced apoptosis in lens epithelial cells. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 41, n. 9, p. 2623-2632, 2000.
- ANJOS-VALLOTA, E.; OLIVEIRA, M. A.; BRITTO, L. R. G.; FORTES, Z. B.; SANNO MIYA, P. Downregulation of ICAM-1 (CD54) by plasma proteins in **diabetes mellitus**. **Med. Inflamm.**, v. 8, p. 92-96, 1999.
- APPENZELLER-HERZOG, C.; RIEMER, J.; ZITO, E.; CHIN, K. T.; RON, D.; SPIESS, M.; ELLGAARD, L. Disulphide production by Ero1 α -PDI relay is rapid and effectively regulated. **EMBO J.**, v. 29, p. 3318–3329, 2010.
- ASHKENAZI, A.; DIXIT, V. M. Death receptors: signaling and modulation. **Science**, v. 281, p. 1305-1308, 1998.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ASLAN, J. E.; YOU, H.; WILLIAMSON, D. M.; ENDIG, J.; YOUNKER, R. T.; THOMAS, L.; SHU, H.; DU, Y.; MILEWSKI, R. L.; BRUSH, M. H.; POSSEMATO, A.; SPROTT, K.; FU, H.; GREIS, K. D.; RUNCKEL, D. N.; VOGEL, A. Thomas G. Akt and 14-3-3 control a PACS-2 homeostatic switch that integrates membrane traffic with TRAIL-induced apoptosis. **Mol. Cell.**, v. 34, p. 497–509, 2009.

ATKINSON, M.; MACLAREN, N. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. **N. Engl. J. Med.**, v. 331, p. 1428-1436, 1994.

BABIOR, B. M. The respiratory burst oxidase and the molecular basis of chronic granulomatous disease. **Am. J. Hematol.**, v. 37, n. 4, p. 263-266, 1991.

BABIOR, B. M.; CURNUTTE, J. T.; KIPNES, R. S. Biological defense mechanisms. Evidence for the participation of superoxide in bacterial killing by xanthine oxidase. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 85, p. 235-244, 1975.

BABIOR, B. M.; KIPNES, R. S.; CURNUTTE, J. T. Biological defense mechanisms: the production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. **J. Clin. Invest.**, v. 52, p. 741-744, 1973.

BACK, S. H.; KAUFMAN, R. J. Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. **Annu Rev Biochem** 81: 767-793, 2012.

BEILKE, M. A.; COLLINS-LECH, C.; SOHNLE, P. G. Candidacidal activity of the neutrophil myeloperoxidase system can be protected from excess hydrogen peroxidase by the presence of ammonium ion. **Blood**, v. 73, n. 4, p. 1045-1049, 1989.

BERNALES, S.; PAPA, F. R.; WALTER, P. Intracellular signaling by the unfolded protein response. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, v. 22, p. 487–508, 2006.

BERTON, G. Desgranulation. In: Gallin, J.I. e Snyderman, R. Editors. Inflammation: Basic principles and clinical correlates. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; vol 1., p. 70-73, 1999.

BINET, F.; CHIASSON, S.; GIRARD, D. Evidence that endoplasmic reticulum (ER) stress and caspase-4 activation occur in human neutrophils. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 391, p.18–23, 2010.

BOATRIGHT, K. M.; SALVESEN, G. S. Mechanisms of caspase activation. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 15, p. 725-731, 2003.

BOICHOT, E.; SANOMIYA, P.; ESCOFIER, N.; GERMAIN, N.; FORTES, Z. B.; LAGENTE, V. Endotoxin-induced acute lung injury in rats. Role of insulin. **Pulm. Pharmacol. Ther.**, v. 12, n. 5, 285-290, 1999.

BONADONNA, R. C.; DE FRONZO, R. A. Glucose metabolism in obesity and type 2 diabetes. **Diabete Metab.**, v. 17, p. 112-135, 1991.

BRUHAT, A.; JOUSSE, C.; FAFOURNOUX, P. Amino acid limitation regulates gene expression. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 58, n. 3, p. 625-632, 1999.

CASSATELLA, M. A. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. **Adv Immunol.**, v. 73, p. 369-509, 1999.

CHAUHAN, D.; PANDEY, P.; OGATA, A.; TEOH, G.; KRETT, N.; HALGREN, R.; ROSEN, S.; KUFE, D.; KHARBANDA, S.; ANDERSON, K. Cytochrome c-dependent and -independent induction of apoptosis in multiple myeloma cells. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 29995-29997, 1997.

CHEN, H.; DETMER, S. A.; EWALD A. J.; GRIFFIN, E. E.; FRASER, S. E.; CHAN, D. C. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. **J. Cell Biol.**, v. 160, p. 189–200, 2003.

CHENG, E. H.; WEI M. C.; WEILER, S.; FLAVELL, R. A.; MAK, T. W.; LINDSTEN T.; KORSMEYER, S. J. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. **Mol. Cell.**, v. 8, p. 705–711, 2001.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal. Biochem.**, v. 162, p. 156-159, 1987.

CHOMCZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **Biotechniques**, v. 15, n. 3, p. 532-534, 1993.

COURTEN, M.; HODGE, A. M.; ZIMMET, P. Epidemiology of diabetes: lessons for the endocrinologist. **Endocrinology**, v. 8, p. 62-70, 1998.

CSORDÁS, G.; RENKEN, C.; VÁRNAI, P.; WALTER, L.; WEAVER, D.; BUTTLE K. F.; BALLA, T.; MANNELLA, C. A.; HAJNÓCZKY, G.. Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. **J. Cell Biol.**, v. 174, p. 915-221, 2006.

DACHEUX, D.; TOUSSAINT, B.; RICHARD, M.; BROCHIER, G.; CROIZE, J.; ATTREE, I. *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates induced rapid, type III secretion-dependent, but ExoU-independent, oncosis on macrophages and polymorphonuclear neutrophils. **Infect Immun.**, v. 68, p. 2916–2924, 2000.

DANA, R.; LET, T. L.; MALECH, H. L.; LEVY, R. Essential requirement of cytosolic phospholipase A2 for activation of the phagocyte NADPH oxidase. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 441-445, 1998.

DELAMAIRE, M.; MAUGENDRE, D.; MORENO, M.; LE GOFF, MC.; ALLANNIC, H.; GENETET, B. Impaired leucocyte functions in diabetic patients. **Diabet Med.**, v. 14, p. 29–34, 1997.

DIEBOLD, B. A.; BOKOCH, G. M. Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase. **Nat. Immunol.**, v. 2, n. 3, p. 211-215, 2001.

DIEKMANN, D.; ABO, A.; JONSTON, C.; SEGAL, A.W.; HALL, A. Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity. **Science**, v. 265, n. 5171, p. 531-533, 1994.

DINAUER, M. C.; ORKIN, S. H. Chronic granulomatous disease. **Annu. Rev. Med.**, v. 43, p. 117-124, 1992.

DJALDETTI, M.; SALMAN, H.; BERGMAN, M.; DJADETTI, R.; BESSLER, H. Phagocytosis - the might weapon of the silent warriors. **Microsc. Res. Tech.**, v. 57, n. 6, p. 421-431, 2002.

DOMIGAN, N. M.; CHARLTON, T. S.; DUNCAN, M. W.; WINTERBOURN, C. C.; KETTKE, A. J. Chlorination of tyrosyl residues in peptides by myeloperoxidase and human neutrophils. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 28, p. 16542-16548, 1995.

EMORY UNIVERSITY. **NADPH oxidase**. Disponível em: <<http://www.pathology.emory.edu/Lambeth/nadphpage.html>>. Acesso em: 08 Ago. 2013.

FANTONE, J. C.; WARD, P.A. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. **Am. J. Pathol.**, v. 107, p. 397-418, 1982.

FENTON, H. J. H. Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. **J. Chem. Soc.**, v. 65, p. 899-910, 1894.

FERNANDES-ALNEMRI, T.; WU, J.; YU, J. W.; DATTA, P.; MILLER, B.; JANKOWSKI, W. The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. **Cell Death Div.**, v. 14, p. 1590–1604, 2007.

FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. **Cell Microbiol.**, v 8, p. 1812–1825, 2006.

FORTES, Z. B.; FARSKY, S. P.; OLIVEIRA, M. A.; GARCIA-LEME, J. Direct vital microscopic study of defective leukocyte-endothelial interaction in diabetes mellitus. **Diabetes**, v. 40, p. 1267-1273, 1991.

FOSSATI, G.; MOULDING, D. A.; SPILLER, D. G.; MOOTS, R. J.; WHITE, M. R. H.; EDWARDS, S. W. The Mitochondrial Network of Human Neutrophils: Role in Chemotaxis, Phagocytosis, Respiratory Burst Activation, and Commitment to Apoptosis. **J. Immunol.**, v. 170, p. 1964-1972, 2003.

FRAKER, D. L.; MERINO, M. J.; NORTON, J. A. Reversal of the toxic effects of cachectin by concurrent insulin administration. **Am. J. Physiol.**, v. 256, p. 725–731, 1989.

FRANC, N. C.; WHITE, K.; EZEKOWITZ, R. A. Phagocytosis and development back to the future. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 11, n. 1, p. 47-52, 1999.

FRIEDRICH, N. Metabolomics in diabetes research. **J. Endocrinol.**, v. 215, n. 1, p. 29-42, 2012.

FUCHS, T. A.; ABED, U.; GOOSMANN, C.; HURWITZ, R.; SCHULZE, I.; WAHN, V. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. **J. Cell Biol.**, v. 176, p. 231–241, 2007.

GABIG, T. G.; CREAN, C. D.; MANTEL, P. L.; ROSLI, R. Function of wild-type or mutant Rac2 and Rap1a GTPases in differentiated HL-60 cell NADPH oxidase activation. **Blood.**, v. 85, p. 804-811, 1995.

GALLACHER, S. J.; THOMSON, G.; FRASER, W. D.; FISHER, B. M.; GEMMELL, C. G.; MACCUISH A. C. Neutrophil bactericidal function in diabetes mellitus: evidence for association with blood glucose control. **Diabet Med.**, v. 12, p. 916–920, 1995.

GAASS, J. N.; GIFFORD, N. M.; BREWER, J. W.; Activation of an unfolded protein response during differentiation of antibody-secreting B cells. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 49047–49054, 2002.

GAASS, J. N.; JIANG, H. Y., WEK, R. C., BREWER, J. W. The unfolded protein response of Blymphocytes: PERK-independent development of antibody-secreting cells. **Mol. Immunol.**, v. 45, p. 1035–1043, 2008.

GEERLINGS, S. E.; HOEPELMAN, A. I. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 26, p. 259–265, 1999.

GILES, K. M.; HART, S. P.; HASLLETT, C.; ROSSI, A. G.; DRANSFIELD, I. An appetite for apoptotic cells? Controversies and challenges. **Br. J. Haematol.**, v. 109, n. 1, 1-12, 2000.

GREEN, D. R. Apoptotic pathways: the roads to ruin. **Cell**, v. 94, n. 6, p. 695-698, 1998.

GRISHAM, M. B.; JEFFERSON, M. M.; MELTON, D. F.; THOMAS, E. L. Chlorination of endogenous amines by isolated neutrophils. Ammonia-dependent bactericidal, cytotoxic and cytolytic activities of the chloramines. **J. Biol. Chem.**, v. 259, n. 16, p. 10404-10416, 1984.

HABER, F.; WEISS, J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. **Proc. R. Soc. Lond. A.**, v. 147, p. 332-351, 1934.

HAJNOCKY, G. et al. Calcium signaling and apoptosis. **Biochem, Biophys. Res. Commun.**, v. 304, p. 445-454, 2003.

HAN, C.; FREEMAN, J. L.; LEE, T.; MOTALEBI, S. A.; LAMBETH, J. D. Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase. Identification of an activation domain in p67(phox). **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 27, p. 16663-16668, 1998.

HARDING, H. P.; NOVOA, I.; ZHANG, Y.; ZENG, H.; WEK, R.; SCHAPIRA, M.; RON, D. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. **Mol Cell**. v. 6, n. 5, p. 1099-108, 2000a.

HARDING, H. P.; ZHANG, Y.; BERTOLOTTI, A.; ZENG, H.; RON, D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. **Mol. Cell**, v.5, n. 5, p. 897-904, 2000b.

- HARDING, H. P.; ZHANG, Y.; RON, D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmatic-reticulum-resident kinase. **Nature**, v. 397, p. 271-274, 1999.
- HARRISON, J. E.; SHULTZ, J. Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase. **J. Biol. Chem.**, v. 251, n. 5, p. 1371-1375, 1976.
- HAYASHI, T.; SU, T. P. Sigma-1 Receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca²⁺ signaling and cell survival. **Cell**, v. 131, p. 596-610, 2007.
- HETZ, C.; GLIMCHER, L. The daily job of night killers: althernative roles of the BCL-2 family in organelle physiology. **Trends Cell Biol.**, v. 18, p. 38-44, 2008.
- HEYWORTH, P. G.; BOHL, B. P.; BOKOCH, G. M.; CURNUTTE, J. T. Rac translocates independently of the neutrophil NADPH oxidase components p47phox and p67phox. Evidence for its interaction with flavocytochrome b558. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 49, p. 30749-30752, 1994.
- HIGO, T.; HATTORI, M.; NAKAMURA, T.; NATSUME, T.; MICHIKAWA, T.; MIKOSHIBA, K. Subtype-specific and ER luminal environment-dependent regulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor type 1 by ERp44. **Cell**, v. 120, p. 85-98, 2005.
- HIGUCHI, R.; DOLLINGER, G.; WALSH, P.S.; GRIFFITH, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. **Biotechnol (New York)**, v. 10; p. 413-417, 1992.
- IMLAY, J. A.; LINN, S. Bimodal pattern of killing of DNA-repair-defective or anoxically grown Escherichia coli by hydrogen peroxide. **J. Bacteriol.**, v. 166, n. 2, p. 519-527, 1986.
- IYER, G. Y. N.; ISLAM, M. F.; QUASTEL, J. H. Biochemical aspects of pathogenesis. **Nature**, v. 192, p. 535-541, 1961.
- JAHANI-ASL, A.; CHEUNG, E. C.; NEUSPIEL, M.; MACLAURIN, J. G.; FORTIN, A.; PARK, D. S.; MCBRIDE, H. M.; SLACK, R. S. Mitofusin 2 protects cerebellar granule neurons against injury-induced cell death. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 23788-23798, 2007.
- KANNEGANTI, T. D.; LAMKAN, W. M.; NUNEZ, G. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. **Immunity**, v. 27, p. 549-559, 2007.
- KAPLAN, M. J. Neutrophils in the pathogenesis and manifestations of SLE. **Nat Rev Rheumatol.**, v. 7, n. 12, p. 691-699, 2011.
- KAUFMAN, R.J. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. **Genes Dev.**, v. 13, n. 10, p. 1211-33, 1999.
- KAWAKAMI, N.; KITA, K.; HAYAKAWA, T.; YAMAGUCHI, T.; FUJIMOTO, S. Phorbol myristate acetate induces NADPH oxidase activity of cytochalasin B-primed neutrophils through the protein kinase C-independent pathway. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 23, n. 9, p. 1100-1104, 2000.
- KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, v. 26, p. 239-571, 1972.

- KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Myeloperoxidase: a key regulator of neutrophil oxidant production. **Redox Rep.**, v. 3, n. 3, 1997.
- KIRWAN, J. P.; KRISHNAN, R. K.; WEAVER, J. A.; DEL AGUILA, L. F.; EVANS W. J. Human aging is associated with altered TNF-alpha production during hyperglycemia and hyperinsulinemia. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 281, p. 1137–1143, 2001.
- KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide anti-bacterial system. **J. Bacteriol.**, v. 95, n. 6, p. 2131-2138, 1968.
- KLEBANOFF, S. J. Phagocytic cells: products of oxygen metabolism. In: GALLIN, J. I.; GOLDSTEIN, I. M.; SNYDERMAN, R. (Ed.). **Inflammation: basic principles and clinical correlates**. New York: Raven, 1992. p. 451-460.
- KLEBANOFF, S. J. Role of the superoxide anion in the myeloperoxidase-mediated antimicrobial system. **J. Biol. Chem.**, v. 249, p. 3724, 1974.
- KLIONSKY, D. J.; ABELIOVICH, H.; AGOSTINIS, P.; AGRAWAL, D. K.; ALIEV, G.; ASKEW, D. S. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. **Autophagy**, v. 4, p. 151–175, 2008.
- KNAUS, U. G.; HEYWORTH, P. G.; EVANS, T.; CURNUTTE, J. T.; BOKOCH, G. M. Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac-2. **Science**, v. 254, p. 1512-1515, 1991.
- KNEPPER-NICOLAI, B.; SAVILL, J.; BROWN, S. B. Constitutive apoptosis in human neutrophils requires synergy between calpains and the proteasome downstream of caspases. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 46, p. 30530-30536, 1998.
- KOSHIBA, T.; DETMER, S. A.; KAISER, J. T.; CHEN, H.; MCCAFFERY, J. M.; CHAN, D. C. Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes, **Science**, v. 305, p. 858–862, 2004.
- KOTTGEN, M.; BENZING, T.; SIMMEN, T.; TAUBER, R.; BUCHHOLZ, B.; FELICIANGELI, S.; HUBER, T. B.; SCHERMER, B.; KRAMER-ZUCKER A.; HOPKER K.; SIMMEN K. C.; TSCHUCKE C. C.; SANDFORD R.; KIM E.; THOMAS G.; WALZ G. Trafficking of TRPP2 by PACS proteins represents a novel mechanism of ion channel regulation. **Embo J.**, v. 24, p. 705–716, 2005.
- KUKREJA, A.; MACLAREN, N.K. Autoimmunity and Diabetes. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 84, n. 12, p. 4371-4378, 1999.
- LAKSHMANAN, A. P.; HARIMA, M.; SUZUKI, K.; SOETIKNO, V.; NAGATA, M.; NAKAMURA, T.; TAKAHASHI, T.; SONE, H.; KAWACHI, H.; WATANABE, K. The hyperglycemia stimulated myocardial endoplasmic reticulum (ER) stress contributes to diabetic cardiomyopathy in the transgenic non-obese type 2 diabetic rats: a differential role of unfolded protein response (UPR) signaling proteins. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 45, n. 2, p. 438-447, 2013.

LAURINDO, F.; PESCATORE, A.; FERNANDES, D. Protein disulfide isomerase in redox cell signaling and homeostasis. **Free Radical Biology e Medicine**, v. 52, p. 1954–1969, 2012.

LEVIN, S.; BUCCI, T. J.; COHEN, S. M.; FIX, A. S.; HARDISTY, J. F.; LEGRAND, E. K. The nomenclature of cell death: recommendations of an ad hoc committee of the society of toxicologic pathologists. **Toxicol. Pathol.**, v. 27, p. 490, 1999.

LI, P.; NIJHAWAN, D.; BUDIHARDJO, I.; SRINIVASULA, S.; ALNEMRI, E. S.; WANG, X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. **Cell**, v. 91, p. 479-489, 1997.

LIANG, X. H.; JACKSON, S.; SEAMAN, M.; BROWN, K.; KEMPKES, B.; HIBSHOOOSH, H. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. **Nature**, v. 402, p. 672–676, 1999.

LIDA, K. T.; SHIMANO, H.; KAWAKAMI, Y. SONE, H. TOYOSHIMA, H. SUZUKI, S. Insulin up-regulates tumor necrosis factor-alpha production in macrophages through an extracellular-regulated kinase-dependent pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 32531–32537, 2001.

LISBONA, F.; ROJAS-RIVEIRA, D.; THIELEN, P.; ZAMORANO, S.; TODD, D.; MARTINON, F.; GLAVIC, A.; KRESS, C.; LIN, J. H.; WALTER, P.; REED, J. C.; GLIMCHER, L. H.; HETZ, C. BAX inhibitor-1 is a negative regulator of the ER stress sensor IRE1alpha. **Mol Cell**, v. 33, p. 679-425, 2009.

LIU, W.; ZHU, X.; WANG, Q.; WANG, L. Hyperglycemia induces endoplasmic reticulum stress-dependent CHOP expression in osteoblasts. **Exp Ther Med.**, v. 5, n. 5, p. 1289-1292, 2013.

LIU, X.; ZWEIER, J. L. A real-time electrochemical technique for measurement of cellular hydrogen peroxide generation and consumption-evaluation in human polymorphonuclear leukocytes. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 31, n. 7, v. 894-901, 2001.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LU, P. D.; HARDING, H. P.; RON, D. Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. **J. Cell Biol.**, v. 167, p. 27-33, 2004.

LYMAR, S. V.; HURST, J. K. Role of compartmentation in promoting toxicity of leukocyte-generated strong oxidants. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 8, n. 6, p. 833-840, 1995.

MA, Y.; HENDERSHOT, L. M. The unfolding tale of the unfolded protein response. **Cell**, v. 107, n. 7, p. 827-830, 2001.

MAIANSKI, N. A.; GEISSIER, J.; SRINIVASULA, S. M.; ALNEMRI, E. S.; ROSS, D.; KUIJPERS, T. W. Functional characterization of mitochondria in neutrophils: a role restricted to apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v. 11, p. 43-153, 2004.

- MALHOTRA, D. J.; KAUFMAN J. R. Endoplasmatic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? **Antiox Redox Signal.**, v. 9, p. 2277-2293, 2007.
- MARHOFFER, W.; STEIN, M.; MAESER, E.; FEDERLIN, K. Impairment of polymorphonuclear leukocyte function and metabolic control of diabetes. **Diabetes Care**, v. 15, p. 256–260, 1992.
- MARKERT, M.; CECH, P.; FREI J. Oxygen metabolism of phagocytosing human polymorphonuclear leukocytes in diabetes mellitus. **Blut**, v. 49, p. 447-455, 1984.
- MARTINS, J. O.; FERRACINI, M.; ANGER, D. B.; MARTINS, D. O.; RIBEIRO, L. F., SANNOMIYA, P.; JANCAR, S. Signaling pathways and mediators in LPS-induced lung inflammation in diabetic rats: role of insulin. **Shock**, v. 33, n. 1, p. 76-82, 2010.
- MARTINS, J. O.; MEYER-PFLUG, A. R.; ALBA-LOUREIRO, T. C.; MELBOSTAD, H.; MIRANDA, W.; COIMBRA, R.; CURI, R.. Modulation of lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation: role of insulin. **Pharmacia**, v. 25, n. 3, p. 260–266, 2006.
- MARTINS, J. O.; ZANONI, F. L.; MARTINS, D. O.; COIMBRA, R.; KRIEGER, J. E.; JANCAR, S.; SANNOMIYA, P. Insulin regulates cytokines and intercellular adhesion molecule-1 gene expression through nuclear factor-kappaB activation in LPS-induced acute lung injury in rats. **Shock**, v. 31, n. 4, p. 404–409, 2009.
- MEISCHL, C.; ROOS, D. The molecular basis of chronic granulomatous disease. **Springer Semin. Immunopathol.**, v. 19, n. 417-434, 1998.
- MOHANTY, P.; HAMOUDA, W.; GARG, R.; ALJADA, A.; GHANIM, H.; DANDONA, P. Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 85, p. 2970–2973, 2000.
- MOWAT, A.G.; BAUM, J. Chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes from patients with diabetes mellitus. **N. Engl. J. Med.**, v. 284, n. 621-627, 1971.
- MUDD, J.; MCCUTCHEON, M.; LUCKE, B. Phagocytosis. **Physiol. Rev.**, v. 14, n. 210, 1934.
- MYSLIWSKA, J.; ZORENA, K.; BAKOWSKA, A.; SKURATOWICZ-KUBICA, A.; MYSLIWSKI, A. Significance of tumor necrosis factor alpha in patients with long-standing Type-I diabetes mellitus. **Horm Metab Res.**, v. 30, p. 158–161, 1998.
- NÉMETH T.; MÓCSAI, A. The role of neutrophils in autoimmune diseases, **Immunol Lett.**, v. 143, n. 1, p. 9-19, 2012.
- NIELSEN, C. P.; HINDSON, D. A. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte respiratory burst by elevated glucose concentrations in vitro. **Diabetes**, v. 38, n. 8, p. 1031-1035, 1989.
- NISIMOTO, Y.; MOTALEBI, S.; HAN, C. H.; LAMBETH, J. D. The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558). **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 33, p. 22999-30005, 1999.

NOLAN, C. N.; BEATY, H. N.; BAGDADE, J. D. Further characterization of the impaired bactericidal function of granulocytes in patients with poorly controlled diabetes. **Diabetes**, v. 27, p. 889-894, 1978.

OLDENBORG, P. A.; SUNDQVIST, I. M.; SEHLIN, J. Different effects of glucose on extracellular and intracellular respiratory burst response in normal human neutrophils activated with the soluble agonist fMet-Leu-Phe. **Diabet Med.**, v. 17, p. 532-537, 2000.

OLEFSKY, J. M. Pathogenesis of non-insulin dependent diabetes (type 2). In: DEGROOT, L. J.; BESSER, G. M.; CAHILL, J. C. (Ed.). **Endocrinology**. 2nd ed. Philadelphia: Saunders, 1989. p. 1369-1388.

ORLINSKA, U.; NEWTON, R. C. Role of glucose in interleukin-1 beta production by lipopolysaccharide-activated human monocytes. **J. Cell Physiol.**, v. 157, p. 201-208, 1993.

PAAPE, M. J.; SHAFER-WEAVER, K.; CAPUCO, A. V.; VAN OOSTVELDT, K.; BURVENICH, C. Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 480, p. 259-277, 2000.

PAN, G.; O'ROURKE, K.; DIXIT, V. M. Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 5841-5845, 1998.

PARKOS, C. A.; ALLEN, R. A.; COCHRAINE, C. G.; Jesaitis, A. J. Purified cytochrome b from human granulocyte plasma membrane is comprised of two polypeptides with relative molecular weights of 91,000 and 22,000. **J. Clin. Invest.**, v. 80, n. 3, p. 732-742, 1987.

PEREIRA, M. A. A.; SANNOMIYA, P.; GARCIA-LEME, J. Inhibition of leukocyte chemotaxis by factor in alloxan-induced diabetic rat plasma. **Diabetes**, v. 36, p. 1307-1314, 1987.

PEREZ, J. F.; CHEMELLO, M. E.; LIPRANDI, F.; RUIZ, M. C.; MICHELANGELI, F. Oncosis in MA104 cells is induced by rotavirus infection through an increase in intracellular Ca²⁺ concentration. **Virology**, v. 252, v. 17-27, 1998.

PERNER, A.; NIELSEN, S. E.; RASK-MADSEN, J. High glucose impairs superoxide production from isolated blood neutrophils. **Intensive Care Med.**, v. 29, p. 642-645, 2003. PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.**, v. 29, n. 9, e45, 2001.

PICKUP, J. C.; CROOK, M. A. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? **Diabetologia**, v. 41, p. 1241-1248, 1998.

PRINCE, L. R.; WHYTE, M. K.; SABROE, I.; PARKER, L. C. The role of TLRs in neutrophil activation. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 11, n. 4, p. 397-403, 2011.

QUINN, M. T.; EVANS, T.; LOETTERLE, L. R.; JESAITIS, A. J.; BOKOCH, G. M. Translocation of Rac correlates with NADPH oxidase activation. Evidence for equimolar translocation of oxidase components. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 28, p. 20983-20987, 1993.

QUINN, M. T.; PARKOS, C. A.; WALKER, L.; ORKIN, S. H.; DINAUER, M. C.; JESAITIS, A. J. Association of a Ras-related protein with cytochrome b of human neutrophils. **Nature**, v. 342, n. 6246, p. 198-200, 1989.

RAAM B. J.; VERHOEVEN A. J.; KUIJPERS T. W. Mitochondria in Neutrophil Apoptosis; **International Journal of Hematology**, v. 84, p. 199-204, 2006.

RAMOS, C. L.; POU, S.; BRITIGAN, B. E.; COHEN, M. S.; ROSEN, G. M. Spin trapping evidence for myeloperoxidase-dependent hydroxyl radical formation by human neutrophils and monocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 8307-8312, 1992.

RAYFIELD, E. J.; AULT, M. J.; KEUSCH, G. T.; BROTHERS, M. J.; NECHEMIAS, C.; SMITH H. Infection and diabetes: the case for glucose control. **Am. J. Med.**, v. 72, p. 439-450, 1982.

REN, Y.; SAVILL, J. Proinflammatory cytokines potentiate thrombospondin-mediated phagocytosis of neutrophils undergoing apoptosis. **J. Immunol.**, v. 154, n. 5, p. 2366-2374, 1995.

REPINE, J. E.; CLAWSON, C. C.; GOETZ F. C. Bactericidal function of neutrophils from patients with acute bacterial infections and from diabetics. **J. Infect. Dis.**, v. 142, n. 6, p. 869-875, 1980.

RIMELE, T. J.; STURM, R. J.; ADAMS, L. M.; HENRY, D. E.; HEASLIP, R. J.; WEICHMAN, B. M.; GRIMES, D. Interaction of neutrophils with vascular smooth muscle: identification of a neutrophil-derived relaxing factor. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 245, p. 102-111, 1988.

RIZZUTO, R.; DUCHEN, M. R.; POZZAN, T. Flirting in little space: the ER/mitochondria Ca²⁺ liaison. **Sci. STKE.**, n. 215, p. 232-241, 2004.

ROMERO-CALVO, I.; OCÓN, B.; MARTÍNEZ-MOYA, P.; SUÁREZ, M. D.; ZARZUELO, A.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; DE MEDINA, F. S. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. **Anal Biochem.**, v. 15, v. 401, n. 2, p. 318-320, 2010.

RON, D.; WALTER, P. Signal integration in the endoplasmatic reticulum unfolded protein response. **Nature Rev.**, v. 8; p. 519-529, 2007.

ROSSI, A. G.; MCCUTCHEON, J. C.; ROY, N.; CHILVERS, E. R.; HASLETT, C.; DRANSFIELD, I. Regulation of macrophage phagocytosis of apoptotic cells by cAMP. **J. Immunol.**, v. 160, n. 7, p. 3562-3568, 1998.

ROSSI, F.; ZATTI, M. Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells. **Experientia**, v. 20, n. 1, p. 21-23, 1964.

SAFTIG, P.; BEERSTEN, W.; ESKELINEN, E. L. LAMP-2: a control step for phagosome and autophagosome maturation. **Autophagy**, v. 4, p. 510-512, 2008.

SAGONE, A. L.; GREENWALD J.; KRAUT, E. H.; BIANCHINE, J.; SINGH D. Glucose: a role as a free radical scavenger in biological systems. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 101, p. 97-104, 1983.

SANNOMIYA, P.; OLIVEIRA, M. A.; FORTES Z. B. Aminoguanidine and the prevention of leukocyte dysfunction in diabetes mellitus: a direct vital microscopic study. **Br. J. Pharmacol.**, v. 122, p. 894-898, 1997.

SANNOMIYA, P.; PEREIRA, M. A. A.; GARCIA-LEME, J. Inhibition of leukocyte chemotaxis by serum factor in diabetes mellitus: selective depression of cell responses mediated by complement-derived chemoattractants. **Agents and Actions**, v. 30, p. 369-376, 1990.

SANO, R.; REED J. C. ER stress-induced cell death mechanisms. **Biochim Biophys Acta**, v. 4889, n. 13, p. 251-256, 2103.

SANTOS, C. X.; TANAKA, L. Y.; WOSNIAK, J.; LAURINDO, F. R. Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. **Antioxid. Redox Signal**, v. 11, p. 2409–2427, 2009.

SATOMI, N.; SAKURAI, A.; HARANAKA, K. Relationship of hypoglycemia to tumor necrosis factor production and antitumor activity: role of glucose, insulin, and macrophages. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 74, p. 1255–1260, 1985.

SAVILL, J.; HASLETT, C. Granulocyte clearance by apoptosis in the resolution of inflammation. **Semin. Cell Biol.**, v. 6, n. 6, p. 385-393, 1995.

SCHRODER, M.; KAUFMAN, R. J. The mammalian unfolded protein response. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 74, p. 739–789, 2005.

SHIMIZU, Y.; HENDERSHOT, L. M. Oxidative folding: cellular strategies for dealing with the resultant equimolar production of reactive oxygen species. **Antioxid. Redox Signal**, v. 11, n. 9, p. 2317-2331, 2009.

SHIOSE, A.; SUMIMOTO, H. Arachidonic acid and phosphorylation synergistically induce a conformational change of p47phox to activate the phagocyte NADPH oxidase. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 13793-13801, 2000.

SIMMEN, T.; ASLAN, J. E.; BLAGOVESHCHENSKAYA A. D.; THOMAS, L.; WAN, L.; XIANG, Y.; FELICIANGELI, S. F.; HUNG, C. H.; CRUMP, C. M., Thomas G. PACS-2 controls endoplasmic reticulum–mitochondria communication and Bid-mediated apoptosis. **Embo J.**, v. 24, p. 717–729, 2005.

SIMMEN, T.; LYNES, E. M.; GESSION, K.; THOMAS, G. Oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum: Tight links to the mitochondria-associated membrane (MAM). **Bioch. Biophys. Acta**, v. 1798, n. 8, p. 1465-73. 2010

STURM, R. J.; HOLLOWAY, D. A.; BUCKLEY, S.; OSBORNE, M. C.; GRIMES, D.; WEICHMAN, B. M. e RIMELE, T. J. Potential regulatory role of inflammatory cells on local vascular smooth muscle tone. **Agents Acta**, v. 27, p. 414-417, 1989.

SZABADKAI, G.; BIANCHI, K.; VÁRNAI, P.; DE STEFANI, D.; WIECKOWSKI, M. R.; CAVAGNA, D.; NAGY, A. I.; BALLA, T.; RIZZUTO, R. Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. **J. Cell Biol.**, v. 175, p. 901-911, 2006.

TABAS,I.; RON,D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. **Nat. Cell Biol.**, v. 13, n. 3, p. 184-190, 2011.

TAN, J. S.; ANDERSON, J. L.; WATANAKUNAKORN, C.; PHAIR, J. P. Neutrophil dysfunction in diabetes mellitus. **Clin. Experim.**, v. 85, n. 1, p. 26-33, 1975.

TANG, C.; KOULAJIAN, K.; SCHUIKI, I.; ZHANG, L.; DESAI, T.; IVOVIC, A.; WANG, P.; ROBSON-DOUCETTE, C.; WHEELER, M. B.; MINASSIAN, B.; VOLCHUK, A.; GIACCA, A. Glucose-induced beta cell dysfunction in vivo in rats: link between oxidative stress and endoplasmic reticulum stress. **Diabetologia**, v. 55, n. 5, p. 1366-79, 2012.

TATER, D.; TEPAUT, B.; BERCOVICI, J. P.; YOUINOU, P. Polymorphonuclear cell derangements in Type I diabetes. **Horm. Metab. Res.**, v. 19, p. 642-647, 1987.

THOMAS, E. L.; LEARN, D. B. Myeloperoxidase-catalyzed oxidation of chloride and others halides: The role of chloramines. In: EVERSE, J.; EVERSE, K. E.; GRISHAM, M. B. (Ed.). **Peroxidases in chemistry and biology**. Boca Raton: CRC, 1991. p. 83-87.

THOMPSON, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science**, v. 267, p. 1456-1462, 1995.

THORENS, B.; MUECKLER M. Glucose transporters in the 21st Century. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 298, n. 2, p. 141-145, 2010.

TODD, D. J.; LEE, A-H.; GLIMCHER, L. H. The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 8, p. 663-674, 2008.

TONNESEN, M. G. Neutrophil-endothelial cell interactions: mechanisms of neutrophil adherence to vascular endothelium. **J. Invest. Dermatol.**, v. 93, p. 53-58, 1989.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

TRUMP, B. F.; BEREZESKY, I. K. The role of altered [Ca²⁺]i regulation in apoptosis, oncosis, and necrosis. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1313, p. 173-178, 1996.

TSUJIMOTO, Y.; SHIMIZU, S. Bcl-2: Life-or-death switch. **FEBS Lett.**, v. 466, p. 6-10, 2000.

- UEDA, S.; MASUTANI, H.; NAKAMURA, H.; TANAKA, T.; UENO, M.; YODOI, J. Redox control of cell death. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 4, n. 3, p. 405-414, 2002.
- URANO, F.; WANG, X.; BERTOLLI, A.; ZHANG, Y.; CHUNG, P.; HARDING, H. P.; RON, D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase 1 IRE1. **Science**, v. 287, p. 664-666, 2000.
- VAN RAAM, B. J.; VERHOEVEN, A. J.; KUIJPERS, T. W. Mitochondria in neutrophil apoptosis. **Int. J. Hematol.**, v. 84, n. 3, p. 199-204, 2006.
- VANHOLDER, R.; HSU, C.; RINGOIR, S. Biochemical definition of the uremic syndrome and possible therapeutic implications. **Artif. Organs.**, v. 17, n. 4, p. 234-239, 1993.
- VANHOLDER, R.; VAN BIESEN, W.; RINGOIR, S. Contributing factors to the inhibition of phagocytosis in hemodialyzed patients. **Kidney Int.**, v. 44, n. 1, p. 208-214, 1993b.
- VERMES, I.; HAANEN, C.; STEFFENS-NAKKEN, H.; REUTELINGSPERGER, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **J. Immunol. Methods.**, v. 184, n. 1, p. 39-51, 1995.
- VOELTZ, G. K.; ROLLS, M. M.; RAPOPORT T. A. Strucutural Organizantion of the endoplasmatic reticulum. **EMBO Rep.**, v. 3, p. 944-950, 2002.
- WALRAND, S.; GUILLET, C.; BOIRIE, Y.; VASSON, M. In vivo evidences that insulin regulates human polymorphonuclear neutrophil functions. **J. Leukoc. Biol.**, v. 76, p. 1104–1110, 2004.
- WANG, X. Z.; HARDIG, H. P.; ZHANG, Y.; JOLICOEUR, E. M.; KURODA M.; RON, D. Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. **Embo J.**, v. 17, p. 5708-5717, 1998.
- WARD, P. A. Leukotaxis and leukotactic disorders. **Am. J. Pathol.**, v. 77, p. 520-538, 1974.
- WELCH, H. C.; CODWELL, W. J.; ELLSON, C. D.; FERGUNSON, G. J.; ANDREWS, S. R.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; HAWKINS, P. T.; STEPHENS, L. R. P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P3- and G $\beta\gamma$ -regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. **Cell**, v. 108, p. 809-821, 2002.
- WIERUSZ-WYSOCKA, B.; WYKRETOWICZ, A.; KLIMAS, R. The influence of increasing glucose concentrations on selected functions of polymorphonuclear neutrophils. **Acta Diabetol. Lat.**, v. 25, p. 283–288, 1988.
- WIERUSZ-WYSOCKA, B.; WYSOCKI, H.; WYKRETOWICZ, A.; SZCZEPANIK, A.; SIEKIERKA, H. Phagocytosis, bactericidal capacity, and superoxide anion (O₂⁻) production by polymorphonuclear neutrophils from patients with diabetes mellitus. **Folia Haematol.**, v. 112, n. 5S, p. 658-668, 1985.
- WILSON, R. M.; REEVES, W. G. Neutrophil phagocytosis and killing in insulin-dependent diabetes. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 63, n. 2, p. 478-484, 1986.

WITKO-SARSAT, V.; REUTER, N.; MOUTHON, L. Interaction of proteinase 3 with its associated partners: implications in the pathogenesis of Wegener's granulomatosis. **Curr Opin Rheumatol.**, v. 22, n. 1, p. 1-7, 2010.

WITKO-SARSAT, V.; RIEU, P.; DESCAMPS-LATSCHA, B.; LESAVRE, P.; HALBWACHS-MECARELLI, L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. **Lab. Invest.**, v. 80, n. 5, p. 617-653, 2000.

WOLFF, S. P. Diabetes mellitus and free radicals. **Brit. Med. Bull.**, v. 49, n. 3, p. 642-652, 1993.

WOSNIAK J. R. J.; SANTOS, C. X. C.; KOWALTOWSKI, A. J.; LAURINDO, F. R.; Cross-talk between mitochondria and NADPH oxidase: Effects of mild mitochondrial dysfunction on agiotensin II-mediated increase in Nox isoform expression and activity in vascular smooth muscle cells. **Antiox Redox Signal.**, v. 11, p. 1265-1278, 2009.

XU, L.; VOLOBOUEVA, L. A.; OUYANG, Y.; EMERY, J. F.; GIFFARD, R. G. Overexpression of mitochondrial Hsp70/Hsp75 in rat brain protects mitochondria, reduces oxidative stress, and protects from focal ischemia. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 29, p. 365-374, 2009.

YI, S.; BHATE, C.; SCHWARTZ, R. A. Sweet's syndrome: an update and review. **G. Ital. Dermatol. Venereol.**, v. 144, n. 5, p. 603-612, 2009.

YOSHIDA, H.; MATSUI, T.; HOSOKAWA, N.; KAUFMAN, R. J.; NAGATA, K.; MORI K. A. Time dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. **Dev. Cell.**, v. 4, p. 265-271, 2003.

YU, L.; ALVA, A.; SU, H.; DUTT, P.; FREUNDT, E.; WELSH, S. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. **Science**, v. 304, p. 1500–1502, 2004.

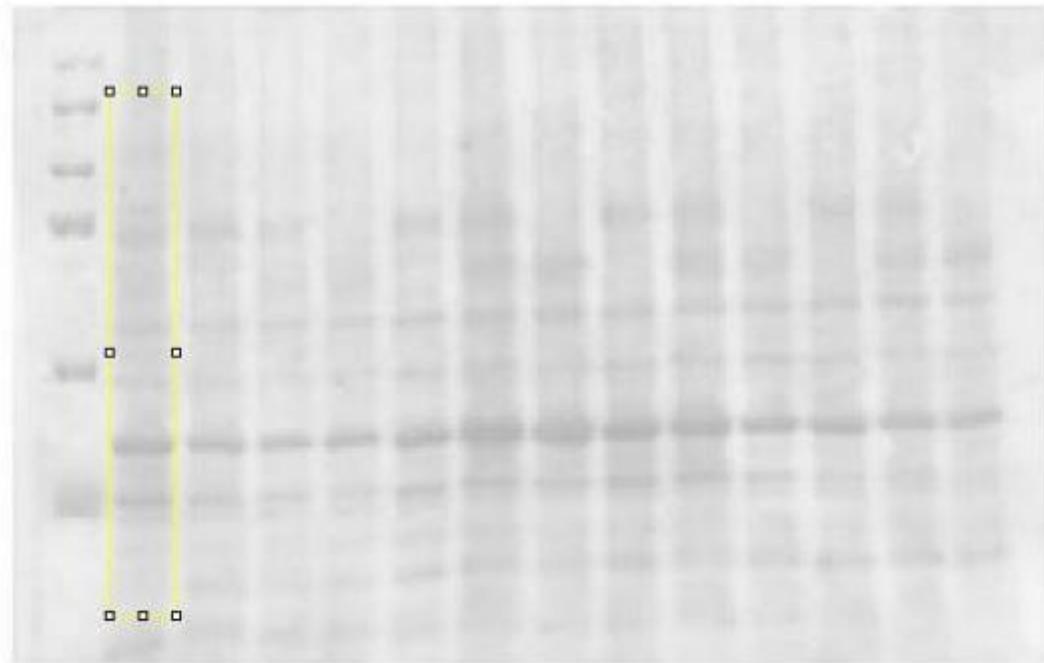
ZHANG, X.; DING, L.; SANDFORD, A. J. Selection of reference genes for gene expression studies in human neutrophils by real-time PCR. **BMC Mol. Biol.**, v. 6, n. 1, p. 4-10, 2005.

ZINSZNER, H.; KURODA, M.; WANG, X.; BATCHVAROVA, N.; LIGHTFOOT, R. T.; REMOTTI, H.; STEVENS, J. L.; RON, D. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. **Genes Dev.**, v. 12, n. 7, p. 982-995, 1998.

ZOZULINKA, D.; MAJCHRZAK, A.; SOBIESKA, M.; WIKTOROWICZ, K.; WIERUSZ-WYSOCKA, B. Serum interleukin-8 level is increased in diabetic patients. **Diabetologia**, 42: 117–118, 1999. Goto Y, Kakizaki M, Masaki N. Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding. **Tohoku J. Exp. Med.**, v. 119, p. 85–90, 1976.

APÊNDICE A - Membranas coradas componceau para normalização das bandas

Exemplo de membrana corada com *ponceau* em escala de cinza para normalização das análises das densidades ópticas das bandas obtidas por WB.



De acordo com Aldridge et al., uma região de cada faixa de corrida foi selecionada para obtenção da densidade óptica (OD) pelo programa ImageJ®. A OD da banda correspondente à proteína de interesse obtida por quimioluminescência foi normalizada pela densidade óptica da faixa correspondente. Segundo Aldridge et al. (2008) e Romero-Calvo et al., essa normalização é mais eficiente do que a normalização por β actina, especialmente se a quantidade de proteína aplicada no gel ultrapassa 50 μ g.

APÊNDICE B - Trabalho submetido à PLoS ONE referente ao projeto BEPE

Paper referente ao projeto de Bolsa de auxílio à Pesquisa no Exterior (BEPE-FAPESP) submetido à PLoS ONE no dia 18/07/2013.

Número: PONE-D-1329943

O projeto BEPE foi desenvolvido nos laboratórios dos professores Dr. Allen Volchuk (Universidade de Toronto, ON, Canadá) e Dr. Sergio Grinstein (Sickkids Hospital, ON, Toronto)

Esse projeto recebeu o apoio financeiro da FAPESP.

Número do processo: 2012/05349-9

Vigência: 23/07/2012 a 22/01/2013 (6 meses)

02/08/13

Zimbra

Zimbra**wilsonk@icb.usp.br**

PLOS ONE: A manuscript number has been assigned to NADPH Oxidase-Dependent Production of Reactive Oxygen Species induces Endoplasmatic Reticulum Stress in Neutrophil-like cells.

De : PLOS ONE <plosone@plos.org>

Qua, 24 de Jul de 2013 18:44

Remetente : em pone 0 34a76f 89780a92
<em.pone.0.34a76f.89780a92@editorialmanager.com>

Assunto : PLOS ONE: A manuscript number has been assigned to NADPH Oxidase-Dependent Production of Reactive Oxygen Species induces Endoplasmatic Reticulum Stress in Neutrophil-like cells.

Para : Wilson Mitsuo Tatagiba Kuwabara
<wilsonk@icb.usp.br>

Dear Mr. Kuwabara,

On Jul 18 2013 10:42PM, we received your Research Article entitled "NADPH Oxidase-Dependent Production of Reactive Oxygen Species induces Endoplasmatic Reticulum Stress in Neutrophil-like cells." by Wilson Mitsuo Tatagiba Kuwabara; Liling Zhang; Irmgard Schuiki; Rui Curi; Allen Volchuk; Tatiana Carolina Alba-Loureiro.

Your manuscript has been assigned the manuscript number: PONE-D-13-29943.

We will keep you informed about the progress of your manuscript or you can check the status by logging into your account.

Please be aware that you will NOT be required to complete the 'Open-Access Agreement' field until your manuscript is accepted for publication. You may also be asked to provide your article and figure files in a different format at this time (please see the 'Format Requirements' section of the Manuscript Guidelines for more information:
<http://www.plosone.org/static/guidelines.action#format>)

Please visit everyONE (<http://blogs.plos.org/everyone>), the PLOS ONE community blog for authors who have published with us (as well as our readers), where you will be able to find out what the journal is thinking, changing and doing.

Thank you for submitting to PLOS ONE.

If you have any inquiries or other comments regarding this manuscript, please contact plosone@plos.org.

Thank you for choosing PLOS ONE.

Best wishes,

PLOS ONE

NADPH Oxidase-Dependent Production of Reactive Oxygen Species induces Endoplasmatic Reticulum Stress in Neutrophil-like cells.

Wilson Mitsuo Tatagiba Kuwabara^a, Liling Zhang^b, Irmgard Schuiki^b, Rui Curi^a, Allen Volchuk^b and Tatiana Carolina Alba Loureiro^a

^aDepartment of Physiology and Biophysics - Institute of Biomedical Sciences – University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

^bDivision of Cellular and Molecular Biology, Toronto General Research Institute, University Health Network, ON M5G 1L7, Canada.

Abstract

ROS primarily produced via NADPH oxidase play an important role for killing microorganisms in neutrophils. In this study we examined if ROS production in Human promyelocytic leukemia cells (HL60) differentiated into neutrophil-like cells (dHL60) induce ER stress and activation of the unfolded protein response (UPR) and whether this is dependent on NADPH oxidase activity. To induce ROS production cells were treated with PMA or by chronic hyperglycemia. Chronic hyperglycemia however, failed to induce ROS production and did not cause activation of the UPR. PMA, a pharmacologic NADPH oxidase activator, induced ER stress in dHL60 cells, in a manner that is independent of calcium signaling. NADPH oxidase inhibitor, Diphenyleneiodonium (DPI), abolished both ROS production and UPR activation. These results show that ROS produced by NADPH oxidase induce ER stress by PERK and IRE1 pathways in dHL60 cells, and this process is independent of calcium mobilization.

Introduction

Neutrophils are essential components of the innate immune system and have an important role in initiating and sustaining the inflammatory process. These cells synthesize proteins that participate in their own effector functions and in the inflammatory response, such as polypeptides, cytokines, chemokines, growth factors and interferons [1]. Neutrophils depend on the activation of NADPH oxidase [2] and hence the generation of reactive oxygen species (ROS) for their microbicidal activity [3; 4]. The dead neutrophils ingestion by macrophages is the main mechanism to remove neutrophils recruited to the inflamed site and, then, to promote the resolution of inflammation [5]. The high demand for the production of proteins and inflammatory responses require the endoplasmatic reticulum (ER), an important organelle to maintain cell homeostasis [6].

The ER is present in all eukaryotic cells. All proteins transiting the secretory pathway in the cells first enter the ER, undergo conformational changes, form complexes and are exported in vesicles to the Golgi apparatus for subsequent secretion. The ER has a unique microenvironment that favors the correct formation of proteins from the very beginning, when the nascent polypeptide chains enter the ER lumen. ER is also the primary intracellular calcium store. Both the formation of new proteins and the function performed by chaperones require high levels of intraluminal calcium [7]. Impairment in ER function results in ER stress, alteration in calcium

signaling and redox dysfunction. The accumulation of unfolded proteins leads to activation of a signaling cascade known as the Unfolded Protein Response (UPR). The UPR is detailed in some reviews [8; 9; 10; 11]. Briefly, the ER stress response involves activation of three ER components: Inositol-Requiring kinase 1 (IRE1), double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase (PERK) and Activating transcription factor 6 (ATF6) [7; 12; 13]. When the unfolded protein concentration increases in the lumen of the ER, the chaperone GRP78 or Bip dissociates from PERK, IRE1 and ATF6 to bind to the unfolded proteins and prevent agglomeration. This causes the activation of these branches as follows: IRE1 oligomerize with other molecules of IRE1, leading to autophosphorylation of its cytoplasmic domain and consecutive activation of the IRE1 ribonuclease (RNase) [10]. This RNase cleaves XBP1 (X-box binding protein) mRNA to remove an intron of 26 nucleotides. The result of the removal of the 26 introns is the spliced XBP1 (sXBP1) that activates the transcription of several genes involved in the UPR. PERK dimerizes and autophosphorylates itself, leading to activation of the kinase eIF2 α (eukaryotic translation factor 2 α) by phosphorylation on Ser51. [7]. Although the phosphorylation of eIF2 α inhibits general protein synthesis, it is necessary for translation of various mRNAs. A transcription factor whose translation is activated by phosphorylation of eIF2 α is ATF4 (Activating Transcription Factor 4) [12], which belongs to the CREB (cAMP-response element binding) family and activates several genes involved in the control of UPR, including chaperones like Bip and GRP94, and also genes involved in the suppression of oxidative stress, metabolism and transport of aminoacids. ATF6 is translocated to the Golgi apparatus where it is cleaved by Site-1 (S1P) and Site-2 (S2P) proteases that release the 50-kDa domain as an active transcription factor (ATF650). The ATF650 migrates to the nucleus and activates the transcription of several genes involved in ER quality control [10; 13].

Reactive Oxygen Species (ROS) may activate UPR by changing the redox state in the ER lumen. ROS are produced by the ER during basal cell metabolism and it is increased during ER stress [14; 15]. Several cell types, especially phagocytes as neutrophils, express proteins of the Nox family and produce ROS by using NADPH [15; 16; 17]. The NADPH oxidase is an enzyme complex consisting of cytoplasmic proteins ($p40^{\text{phox}}$, $p47^{\text{phox}}$ and $p67^{\text{phox}}$) and membrane proteins ($gp91^{\text{phox}}$ or Nox2 and $p22^{\text{phox}}$) to form a flavo-hemoprotein known as cytochrome b558 [18; 19]. NADPH oxidase transfers the electron of the complex to the oxygen molecule in the phagosome or in the cytosol, generating superoxide anion [20; 21; 22; 23] and hydrogen peroxide, which is formed by spontaneous dismutation or by superoxide dismutase (SOD) activity [3; 24]. Most of the generated hydrogen peroxide is consumed by neutrophil myeloperoxidase [25; 26]. This enzyme catalyzes the formation of HOCl by oxidation of chloride ions [27; 28], the primary oxidant bactericidal agent produced by neutrophils [23; 29]. Increasing evidence show that ROS produced by the NADPH oxidase are important mediators in the activation of the ER stress [14; 15; 30; 31; 32]. However, the contribution of NADPH oxidase in the setting of the ER stress in neutrophils has never been studied. Thus, the aim of this study was to examine if ROS produced through NADPH oxidase cause ER stress and activate UPR in neutrophil-like cells. We found that activation of NADPH oxidase by Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA) stimulation produced an increase in ROS, induced ER stress and activation of UPR.

Materials and Methods

HL60 Cell Culture and differentiation

Human HL-60 cells were obtained from American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA) and grown in endotoxin-free RPMI 1640 medium containing 5.5 mM glucose, 10% heat-inactivated FBS at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Media was changed every 3 days. To differentiate HL60 cells into neutrophil-like cells (dHL60), 1.25% DMSO was added to the media for 6 days as previously reported [3, 4]. After the differentiation, dHL-60 cells (1x10⁶ cells/ml) were cultured for 24 h in 5.5 mM [normal glucose (NG)] or 25 mM glucose (HG). The nonphysiological sugar, 19.5 mM mannitol (MN), was used to examine the impact of the osmotic pressure exerted by glucose.

Flow cytometry analysis

To assess the production of ROS, dHL60 cells were labeled with 10µM DHR 123 (Dihydrorhodamine 123) and stimulated with 200 nMPMA or PMA+ DPI (10µM) (Diphenyleneiodonium). For flow cytometric quantification of ROS, cells (1.5 x 10⁶) were incubated or not with DPI for 20 min before the stimulus with PMA. PMA was added 15 min before the analysis. Undifferentiated HL60 cells were used as negative control. Following treatments, flow cytometric analyses were conducted on a FACSLSR II (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) flow cytometer. Cells were excited using laser line at 488 nm. The emission filter setup was the band pass filter 510/20. Data analysis was performed using the BD FACS Diva software version 6.0.

Intracellular calcium concentration

dHL60 cells (1.5 x 10⁶) were incubated for 24h under the following conditions: NG, HG and MN. Then, cells were labeled with Indo-1-AM (5µM) for one hour at 37 ° C. After incubation, cells were washed with Ca²⁺ buffer (150mM NaCl, 4mM KCl, 25mM HEPES, 3mM CaCl₂, 5mM pyruvate, 10mM glucose, pH7.3) and kept at room temperature prior to analysis. For calcium influx measurements, dHL60 were resuspended in Ca²⁺ buffer with 1mg/mL albumin (BSA). For ER calcium content, cells were washed and kept in Ca²⁺ free buffer (150mM NaCl, 4mM KCl, 25mM HEPES, 5mM pyruvate, 10mM glucose, 2mM EGTA, pH7.3). After labeling the cells with Indo-1-AM, the intracellular calcium changes were monitored by fluorimetry (F-2500, HITACHI) at 37 ° C under constant agitation. PMA (1µM) or fMLP (1µM) were tested to change calcium influx. The ionophore, ionomycin (1µM), was used in the ER calcium content measurements and also to calibrate the curve with magnesium chloride (2mM) (MnCl₂). Intracellular calcium was calculated as previously reported [33].

XBP-1 mRNA Splicing

Total RNA was isolated from dHL60 cells ($1,5 \times 10^6$) using TRIzol reagent (Invitrogen) and RNeasy® Mini Kit (Qiagen). The RNA was reverse transcribed to single-stranded cDNA using the High-Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). The resulting cDNA was used for the PCR analysis. Human XBP-1 cDNA was amplified by OneStep RT-PCR kit (Qiagen) using primers that flank the intron excised by IRE1 exonuclease activity as previously described (21). Primer sequences used to amplify human XBP-1 were: 5'-TTA CGA GAG AAA ACT CAT GGC C-3' and 5'- GGG TCC AAG TTG TCC AGA ATG C -3'. The protocol used for the RT-PCR was as follows: 50 °C (30 min); 95 °C (15 min); 35 cycles of 94 °C (1 min), 55 °C (1 min), 72 °C (1min); 72 °C (10 min). RT-PCR products were resolved on a 3% agarose gel and visualized using ethidium bromide.

Western Blot Analysis

Cells (1×10^7) were transferred to tubes and centrifuged at 1,200 rpm for 10 min at 4°C. The pellet was washed with 1 ml of cold phosphate-buffered saline (PBS) and centrifuged at 1,200 rpm for 10 min at 4 °C. The pellet was resuspended in 60µl of Triton X100 lysis buffer. Proteins were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked for 1h at room temperature with 5% skim milk and incubated with the specific primary antibodies overnight. Following incubation with secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase, the bands were detected with the enhanced chemiluminescence system (Amersham Biosciences). Immunoblots were scanned and quantified using the ImageJ® software. The following commercial primary antibodies were used: anti-phospho-eIF2α (catalog number 9721, 1:500; Cell Signaling), γ-tubulin (T6557, 1:1000; Sigma).

Data Analysis

Results are presented as mean \pm S.E. Statistical significance was found by two wayANOVA followed by the Bonferroni test. $p \leq 0.05$ was considered statistically significant.

Results

HL60 cell is a tumor cell line that was isolated from a single patient with acute promyelocytic leukemia and can be differentiated *in vitro* into a variety of blood cell types [34]. To differentiate them into neutrophils polar components such as DMSO or retinoic acid are used. After differentiation, although they are not identical to primary neutrophils, neutrophil-like cells (dHL60) express all the components of NADPH oxidase and its functionality is similar to primary neutrophils [34; 35; 36; 37].

HL60 cells differentiated into neutrophils were used as a model to study the effect of ROS production on ER stress and UPR activation. Although chronic hyperglycemia has been shown to increase ROS levels in various cell types [38; 39; 40; 41] it failed to increase ROS production in dHL60 cells as detected by DHR 123 [42](Figure 1a). However, we observed a 5-fold increase in ROS production after PMA stimulus in dHL60 cells but not by undifferentiated HL60 cells (Figure 1b). PMA activates PKC, which promotes the assembly of NADPH oxidase proteins [43]. Undifferentiated HL60 cells were used as a negative control; since they do not

express the nox proteins as much as dHL60 [44] and ROS production is not expected to be increased by PMA. However, as compared to the dHL60, undifferentiated HL60 have higher basal ROS levels, which reflect a higher metabolic rate [15, 45] (Figure 1b). ROS production stimulated by PMA in dHL60 cells is mostly NADPH oxidase dependent since DPI, a specific inhibitor of the NADPH oxidase [16], significantly inhibited ROS production (Figure 1b).

ER stress can be caused by depletion of ER calcium stores as is pharmacologically induced using thapsigargin [46]. To examine if PMA or high glucose affect cellular calcium levels, intracellular calcium dynamics were measured by using Indo-1-AM an ester of the calcium sensitive dye Indo-1[47]. Ionomycin and MnCl₂ were used to determine the maximum and the minimum concentration of intracellular calcium, respectively. These values are essential to calibrate the curve and calculate the final concentration of calcium induced by the stimuli [33]. PMA did not cause any alteration in the calcium influx (Figure 2A) compared to fMLP used as a positive control (Figure 2B). Similarly, chronic hyperglycemia did not cause variations of the ER calcium content nor differences in the calcium influx when cells were stimulated with fMLP (Figure 2D-F).

Finally, we examined if ROS produced through NADPH-dependent induces ER stress in dHL60 cells. ER stress is inferred by monitoring activation of either ER stress sensors (PERK, IRE1, ATF6) or induction of UPR target genes [13]. To monitor activation of the PERK pathway we examined phosphorylation of eIF2α, a target of the PERK kinase. dHL60 cells were treated with PMA for 1 and 4 h in the presence or absence of DPI and phospho-eIF2α levels were measured by western blot analysis (Figure 3a). PMA lead to an increase in p-eIF2α levels after 1 and 4 hour of stimulus and DPI completely inhibited this effect (Figure 3a) suggesting that PMA activated the PERK branch of the UPR through ROS produced by NADPH oxidase activation.

We also monitored activation of the IRE1 pathway by measuring spliced XBP1 mRNA levels by RT-PCR. Similarly, PMA increased the levels of spliced XBP-1 after 1 and 4h of treatment and this effect was inhibited by DPI (Figure 3b). Thus, activation of the IRE1pathway by PMA is dependent on ROS production and not on PKC activation *per se*. Hyperglycemia, on the other hand, failed to cause UPR activation and there was no significant difference between the conditions after PMA stimuli (Figure 4).

Discussion

It has long been thought that neutrophils were terminally differentiated cells lacking activity of transcription and protein synthesis. In fact, neutrophils exhibit high ability to conduct *de novo* synthesis of various proteins such as cytokines and chemokines with immunomodulatory properties [1; 48]. The ER of these cells is functional and should be considered as a key organelle in the viability of the cell, especially in the activated states, when the production of secretory proteins increases [49]. However, neutrophils when activated are also large producers of ROS primarily via NADPH oxidase. Given that ROS can induce ER stress [14; 15; 30; 31; 32], a situation that would increase unfolded and misfolded proteins in the ER, we sought to determine if this is the case.

We found that dHL60 cells treated with the PKC activator PMA resulted in a large increase in ROS production that correlated with induction of ER stress markers (phosphorylation of eIF2 α ; PERK pathway) and splicing of XBP1; IRE1 pathway). Importantly, DPI a specific inhibitor of the NADPH oxidase protein complex assembly, that does not inhibit PKC [43], prevented ROS induction and the activation of investigated ER stress markers.

Calcium participates in various cellular processes including: cell cycle, protein synthesis, gene expression, muscle contraction, secretion and apoptosis [50]. It is known that ER stress can also be caused by disturbances in ER calcium signaling. For instance, thapsigargin, a specific inhibitor of the ER Ca²⁺-ATPase, depletes Ca²⁺ from the lumen of this organelle, resulting in activation of the UPR [51; 52]. Furthermore, ionomycin, an ionophore that opens the calcium channels of the cell, causes an increase in the influx of Ca²⁺, which promotes ER stress [53]. It is known that fMLP triggers ROS production in dHL60 and it is accompanied by an increased influx of calcium [54]. However, PMA did not induce calcium influx and, thus, the ER stress in dHL60 occurred independently of calcium changes, supporting the proposition that the activation of the UPR occurs only through ROS production.

dHL60 cell potently activates the UPR under conditions of ROS produced in excess by the NADPH-oxidase. We speculate that activation of the UPR may have dual effects depending on the NAPDH oxidase activation state and consequently on the levels of ROS. The UPR can potentially be induced by low levels of ROS to increase ER protein folding capacity to maintain secretory protein production. However, greater NAPDH oxidase activation (as occurs by PMA activation) may lead to rapid induction of UPR and cell death.

ER stress and activation of the UPR may contribute to triggering an exclusive type of death known as NETosis (Neutrophils Extracellular Traps) [16]. NETosis was first reported in 2004 and it has been gaining evidence as a last attempt of the cell to kill the invading microorganisms [16]. NETs are formed of DNA, histones and granules [55; 56] and are projected onto the microorganism. This type of cell death depends on the activation of NADPH oxidase [57] and therefore the production of ROS. When DPI is used NETosis is inhibited [57; 58; 59]. The complete mechanism of how NETs are formed is unknown but they may involve the ER. NADPH oxidase triggered ER stress in neutrophil-like cells could be a mechanism by which ROS lead to NETs formation.

Chronic hyperglycemia is known to induce ROS production in many cell types, but failed to increase ROS levels to cause ER stress in dHL60 cells. This is likely explained by glucose transporters (GLUTs) expression in these cells. Neutrophils and dHL60 express GLUT 1 exclusively [38; 49; 60; 61], which has a low Km and gets saturated such that glucose transport does not increase despite high extracellular levels. It prevents the exposure of the cell to glucotoxicity. GLUT 2 presents a unique high Km for glucose (~17 mM), so the higher the concentration of glucose in the extracellular media, the higher the transport of glucose into the cell [61]. Pancreatic β -cells respond to high glucose concentration by producing and secreting more insulin. So, hyperglycemia overloads the ER and leads it to a stress condition [36; 61; 62].

In summary, ROS produced by NADPH oxidase induce ER stress by PERK and IRE1 pathways in dHL60 cells, and this process is independent of calcium mobilization. Knowledge of the redox state and UPR activation may lead to better understanding of functions of neutrophils, such as phagocytosis, cytokines and chemokines production, NADPH oxidase complex *per se* and cell death process.

Acknowledgements

The authors are indebted to the constant support of Dr. Sergio Grinstein, Hospital for Sick Children, Toronto, Canada. This research was funded by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

References

- [1] Cassatella MA (1999) Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv Immunol* 1999 ; 73 : 369-509.
- [2] Rossi F, Zatti M (1964) Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells. *Experientia* 20(1): 21-23.
- [3] Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT (1973) Biological defense mechanisms: the production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* 52: 741-744.
- [4] Fantone JC, Ward PA (1982) Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol* 107: 397-418.
- [5] Savill J & Haslett C (1995) Granulocyte clearance by apoptosis in the resolution of inflammation. *Semin Cell Biol* 6(6): 385-393.
- [6] López-García P, Moreira D (2006) Selective forces for the origin of the eukaryotic nucleus. *Bioessays* 28(5):525-533.
- [7] Lai E, Teodoro T, Volchuk A (2007) Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda)* 22:193-201.
- [8] Rutkowski DT, Hegde RS (2010) Regulation of basal cellular physiology by the homeostatic unfolded protein response. *J Cell Biol* 189(5): 783-794.
- [9] Tabas I, Ron D (2011) Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol* 3: 184-90.
- [10] Ron D, Walter P (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Bio* 8(7): 519-29.
- [11] Wiseman RL, Haynes CM, Ron D (2010) SnapShot: The unfolded protein response. *Cell* 140(4): 590-590.
- [12] Bernales S, Papa FR, Walter P (2006) Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 487–508.
- [13] Schroder M & Kaufman RJ (2005) The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 74: 739–789.
- [14] Li G, Scull C, Ozcan L, Tabas I (2010) NADPH oxidase links endoplasmic reticulum stress, oxidative stress, and PKR activation to induce apoptosis. *J Cell Biol* 191(6):1113-1125.
- [15] Santos CX, Tanaka LY, Wosniak J, Laurindo FR (2009) Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. *Antioxid Redox Signal* 11:2409–2427.
- [16] Brinkmann VU, Reichard C, Goosmann B, Fauler Y, Uhlemann DS, Weiss Y, Weinrauch A, Zychlinsky A (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303: 1532–1535.
- [17] Chen K, Kirber MT, Xiao H, Yang Y, Keaney JF Jr (2008) Regulation of ROS signal transduction by NADPH oxidase 4 localization. *J Cell Biol* 181(7): 1129-1139.
- [18] Babior BM, Curnutte JT, Kipnes RS (1975) Biological defense mechanisms. Evidence for the participation of superoxide in bacterial killing by xanthine oxidase. *J Lab Clin Med* 85: 235-244.
- [19] Parkos, CA, Allen RA, Cochrane CG, Jesaitis AJ (1987) Purified cytochrome b from human granulocyte plasma membrane is comprised of two polypeptides with relative molecular weights of 91,000 and 22,000. *J Clin Invest* 80(3): 732-742.
- [20] Han C, Freeman JL, Lee T, Motalebi SA, Lambeth JD (1998) Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase. Identification of an activation domain in p67(phox). *J Biol Chem* 273(27): 16663-16668.
- [21] Nisimoto, Y, Motalebi S, Han CH, Lambeth JD (1999) The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558). *J Biol Chem* 274(33): 22999-30005.

- [22] Babior BM (1991) The respiratory burst oxidase and the molecular basis of chronic granulomatous disease. *Am J Hematol* 37(4): 263-266.
- [23] Klebanoff SJ (1968) Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide anti-bacterial system. *J Bacteriol* 95(6): 2131-2138.
- [24] Imlay JA, Linn S (1986) Bimodal pattern of killing of DNA-repair-defective or anoxically grown *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *J Bacteriol*, 166(2): 519-527.
- [25] Klebanoff SJ (1992) Phagocytic cells: products of oxygen metabolism. In: Gallin JI, Goldstein IM Snyderman R, editors, *Inflammation: Basic principles and clinical correlates*. New York: NY Raven, p. 451.
- [26] Kettle AJ, Winterbourn CC (1997) Myeloperoxidase: a key regulator of neutrophil oxidant production. *Redox Rep* 3: 3.
- [27] Agner K (1972) Biological effects of hypochlorous acid formed by "MPO"-peroxidation in the presence of chloride ions. In: Akeson A & Ehrenberg A, editors, *Structure and Function of Oxidation Reduction Enzymes*. New York, NY.: Pergamon, pp. 329-335.
- [28] Harrison JE, Shultz J (1976) Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase. *J Biol Chem* 251(5): 1371-1375.
- [29] Iyer GYN, Islam MF, Quastel JH (1961) Biochemical aspects of pathogenesis. *Nature* 192: 535-541.
- [30] Domigan NM, Charlton TS, Duncan MW, Winterbourn CC, Kettke AJ (1995) Chlorination of tyrosyl residues in peptides by myeloperoxidase and human neutrophils. *J Biol Chem* 270(28): 16542-16548.
- [31] Santos CX, Nabeebaccus AA, Shah AM, Camargo LL, Filho SV, Lopes LR (2013) Endoplasmic Reticulum Stress and Nox-Mediated Reactive Oxygen Species Signaling in the Peripheral Vasculature: Potential Role in Hypertension. *Antioxid Redox Signal* "In Press".
- [32] Wu RF, Ma Z, Liu Z, Terada LS (2010) Nox4-derived H₂O₂ mediates endoplasmic reticulum signaling through local Ras activation. *Mol Cell Biol* 14:3553-68.
- [33] MacDougall SL, Grinstein S, Gelfand EW (1988) Activation of Ca²⁺-dependent K⁺ channels in human B lymphocytes by anti-immunoglobulin. *J Clin Invest* 81(2):449-454.
- [34] Collins SJ (1987) The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood* 70(5): 1233-1244.
- [35] Davis RC, Thomason AR, Fuller ML, Slovin JP, Chou CC, Chada S, Gatti RA, Salser WA (1987) mRNA species regulated during the differentiation of HL60 cells to macrophages and neutrophils. *Dev Biol* 119: 164–174.
- [36] Henderson LM, Banting G, Chappell JB (1995) The arachidonate-activatable, NADPH oxidase-associated H⁺ channel. Evidence that gp91-phox functions as an essential part of the channel. *J. Biol. Chem.* 270,5909–5916.
- [37] Paclet MH, Henderson LM, Campion Y, Morel F, Dagher MC (2004) Localization of Nox2 N-terminus using polyclonal antipeptide antibodies. *Biochem J* 382: 981-6.
- [38] Unger RH (1991) Diabetic hyperglycemia: link to impaired glucose transport in pancreatic beta cells. *Science* 8: 251:1200-1205.
- [39] Liu W, Zhu X, Wang Q, Wang L (2013) Hyperglycemia induces endoplasmic reticulum stress-dependent CHOP expression in osteoblasts. *Exp Ther Med* 5(5):1289-1292.
- [40] Lakshmanan AP, Harima M, Suzuki K, Soetikno V, Nagata M, Nakamura T, Takahashi T, Sone H, Kawachi H, Watanabe K (2013) The hyperglycemia stimulated myocardial endoplasmic reticulum (ER) stress contributes to diabetic cardiomyopathy in the transgenic non-obese type 2 diabetic rats: a differential role of unfolded protein response (UPR) signaling proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 45(2):438-447.
- [41] Sage AT, Holtby-Ottenhof S, Shi Y, Damjanovic S, Sharma AM, Werstuck GH (2012) Metabolic syndrome and acute hyperglycemia are associated with endoplasmic reticulum stress in human mononuclear cells. *Obesity (Silver Spring)* 20(4):748-755.
- [42] Walrand S, Valeix S, Rodriguez C, Ligot P, Chassagne J, Vasson MP (2003) Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. *Clin Chim Acta* 331: 103-10.
- [43] Ellis JA, Mayer SJ, Jones OT (1988) The effect of the NADPH oxidase inhibitor diphenyleneiodonium on aerobic and anaerobic microbicidal activities of human neutrophils. *Biochem J* 251(3): 887-91.
- [44] Lin C, Wang H (2012) NADPH oxidase is involved in H₂O₂-induced differentiation of human promyelocytic leukaemia HL-60 cells. *Cell Biol Int* 36(4):391-395.
- [45] Shimizu Y, Hendershot LM (2009) Oxidative folding: cellular strategies for dealing with the resultant equimolar production of reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal* 11(9): 2317-31.
- [46] Kass GE, Orrenius S (1999) Calcium signaling and cytotoxicity. *Environ Health Perspect* 107 Suppl 1: 25-35.

- [47] Lückhoff A (1986) Measuring cytosolic free calcium concentration in endothelial cells with indo-1: the pitfall of using the ratio of two fluorescence intensities recorded at different wavelengths. *Cell Calcium* 7(4): 233-248.
- [48] Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S (2011) Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 11 : 519-531.
- [49] Ahmed N, Berridge MV (1999) N-glycosylation of glucose transporter-1 (Glut-1) is associated with increased transporter affinity for glucose in human leukemic cells. *Leuk Res* 4: 395-401.
- [50] Coe H, Michalak M (2009) Calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Gen Physiol Biophys* 28: 96-103.
- [51] Lytton J, Westlin M, Hanley MR (1991) Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase family of calcium pumps. *J Biol Chem* 266: 17067-17071.
- [52] Li MQ, Baumeister P, Roy B, Phan T, Foti D, Luo SZ, Lee AS (2000) ATF6 as a transcription activator of the endoplasmic reticulum stress element: thapsigargin stress-induced changes and synergistic interactions with NF-Y and YY1. *Mol Cell Biol* 20: 5096-5106.
- [53] Miyake H, Hara I, Arakawa S, Kamidono S (2000) Stress protein GRP78 prevents apoptosis induced by calcium ionophore, ionomycin, but not by glycosylation inhibitor, tunicamycin, in human prostate cancer cells. *J Cell Biochem* 77: 396-408.
- [54] Bréchard S, Bueb JL, Tscherhart EJ (2005) Interleukin-8 primes oxidative burst in neutrophil-like HL-60 through changes in cytosolic calcium. *Cell Calcium* 37(6):531-40.
- [55] Jaillon SG, Peri Y, Delneste I, Frémaux A, Doni F, Moalli C, Garlanda L, Romani H, Gascan S, Bellocchio (2007). The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *J Exp Med* 204: 793–804.
- [56] Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, Brinkmann V, Jungblut PR, Zychlinsky A (2009) Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog*. 5: e1000639.
- [57] Gray RD, Lucas CD, Mackellar A, Li F, Hiersemann K, Haslett C, Davidson DJ, Rossi AG (2013). Activation of conventional protein kinase C (PKC) is critical in the generation of human neutrophil extracellular traps. *J Inflamm* 10(1) : 12.
- [58] Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A (2007) Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 176: 231–241.
- [59] Lim MB, Kuiper JW, Katchky A, Goldberg H, Glogauer M (2011) Rac2 is required for the formation of neutrophil extracellular traps. *J Leukoc Biol* 90: 771–776.
- [60] Schuster DP, Brody SL, Zhou Z, Bernstein M, Arch R, Link D, Mueckler M (2007) Regulation of lipopolysaccharide-induced increases in neutrophil glucose uptake. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292(4): 845-851.
- [61] Thorens B, Mueckler M (2010) Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298(2).
- [62] Back SH, Kaufman RJ (2012) Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. *Annu Rev Biochem* 81: 767-93.

Figure Legends

Figure 1. Effect of Hyperglycemia (A) and PMA (B) on ROS production. HL60 cells were differentiated into neutrophil-like cells (dHL60) with 1.25% DMSO for 6 days. Cells were stimulated or not with PMA (1 μ M). DPI (10 μ m), a NADPH oxidase inhibitor, was used as a negative control. After 24h treatment with normoglycemic media (5.5mM), hyperglycemic media (25mM) and mannitol (5.5 mM of glucose + 19.5 mM of mannitol), dHL60 cells were marked with DHR (10 μ M) stimulated with PMA and evaluated by flow cytometry. Graph represents the median of fluorescence \pm s.e.m. Results are from 6 independent experiments. (***)) Indicate p <0.001.

Figure 2. Effects of PMA (A), fMLP (B-D) on calcium influx and ER calcium content (E,F). HL60 cells were differentiated into neutrophil-like cells (dHL60) with 1.25% DMSO for 6 days. After 24h treatment with normoglycemic media (5.5mM), hyperglycemic media (25mM) and mannitol (5.5 mM of glucose + 19.5 mM of mannitol), cells were marked with Indo-1 and fluorescence was detected by fluorometry. Graph represents the intensity of fluorescence during the time of analysis (A,C) and Graph bars show the mean of intracellular calcium concentration \pm s.e.m. (B,D). Results are from 4 independent experiments. (**) Indicate p <0.01 and (*) indicate p<0,05.

Figure 3. Effect of PMA and DPI inhibitor on ER stress markers: (A) p-eIF2 α ; (B)sXBP1. HL60 cells were differentiated into neutrophil (dHL60) with 1.25% DMSO for 6 days. Cells were stimulated with PMA (1 μ M) for 1 or 4h. DPI (10 μ m) was used as an inhibitor of ROS production for 1h and 4h. (A) Graph represents the mean \pm s.e.m. of the Optical Density (OD) of the protein bands. (B) Figure represents the complementary cDNA bands of XBP1 and sXBP1. Results are from 3 independent experiments. (C) Control (dHL60 without any stimulus). (D1H) dHL60 + 1h [PMA + DPI]. (P1H) dHL60 + 1h PMA. (D4h) dHL60 + 4h [PMA + DPI]. (P4H) dHL60 + 4h PMA. (***)) Indicates p <0.001.

Figure 4. Effect of HG+PMA on ER stress markers: (A) p-eIF2 α ; (B)sXBP1. HL60 cells were differentiated into neutrophil (dHL60) with 1.25% DMSO for 6 days. After 24 h treatment with normoglycemic media (5.5mM), hyperglycemic media (25mM) and mannitol (5.5 mM of glucose + 19.5 mM of mannitol), cells were stimulated with PMA (1 μ M) for 1 or 4h. (A) Graph represents the mean \pm s.e.m. of the Optical Density (OD) of the protein bands. (B) Figure represents the complementary cDNA bands of XBP1 and sXBP1. Results are from 3 independent experiments.. NG (normoglicemic), MN (Manitol), HG (Hiperglicemic) (N1h) dHL60 NG + 1h PMA. (M1h) dHL60 MN + 1h PMA. (H1h) dHL60 HG + 1h PMA. (N4h) dHL60 NG + 4h PMA. (M4h) dHL60 MN + 4h PMA. (H4h) dHL60 HG + 4h PMA. (***)) Indicates p <0.001.

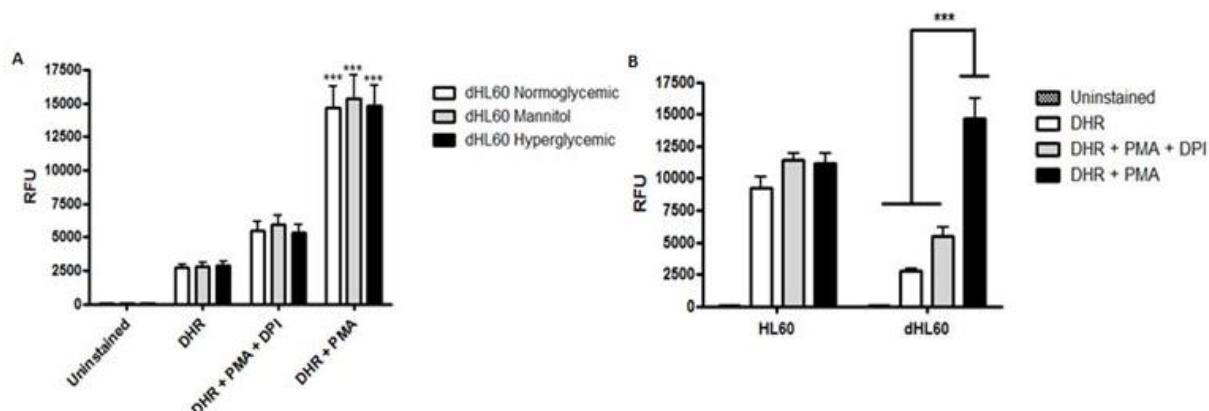


Figure 1. Effect of Hyperglycemia (A) and PMA (B) on ROS production.

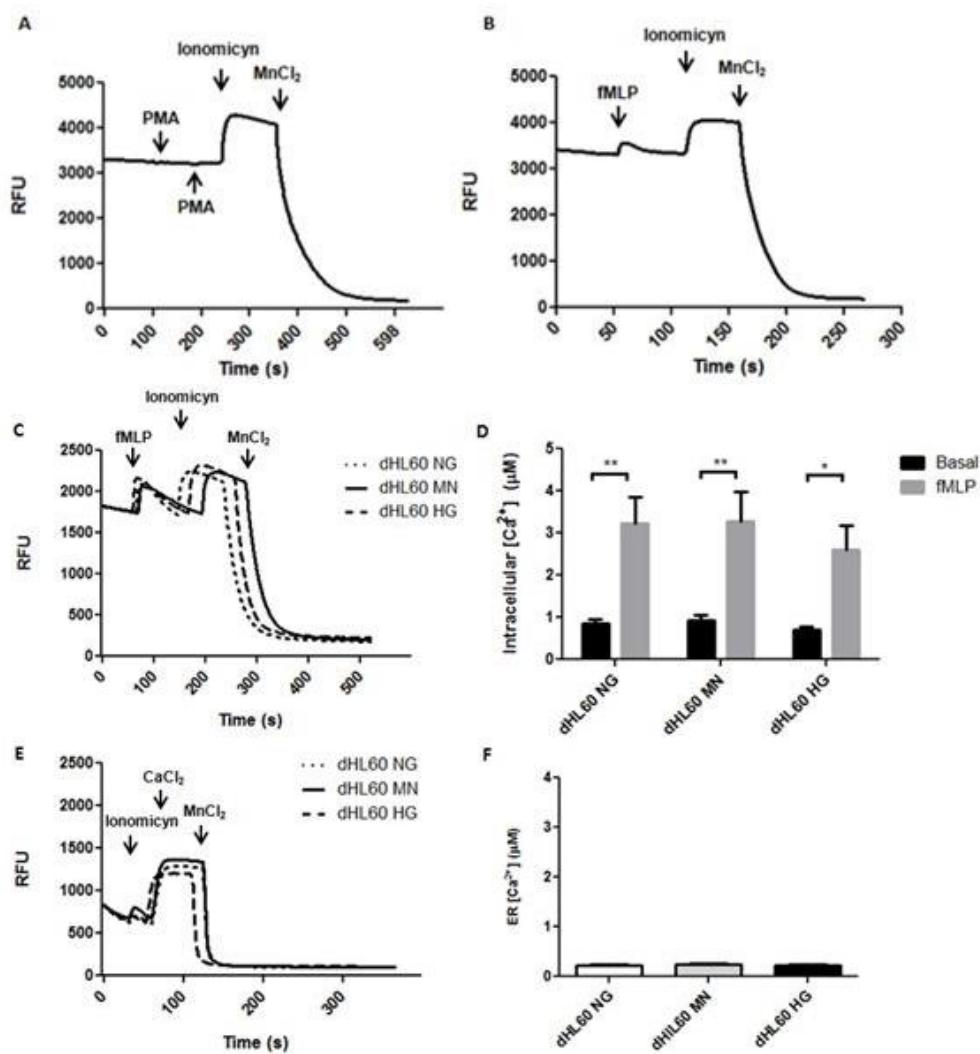


Figure 2. Effects of PMA (A), fMLP (B-D) on calcium influx and ER calcium content (E,F).

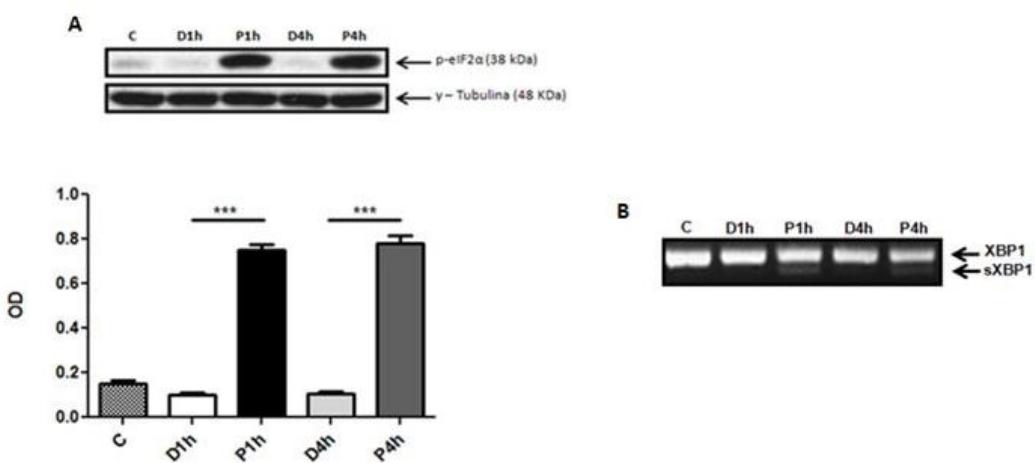


Figure 3. Effect of PMA and DPI inhibitor on ER stress markers: (A) p-eIF2 α ; (B)sXBP1.

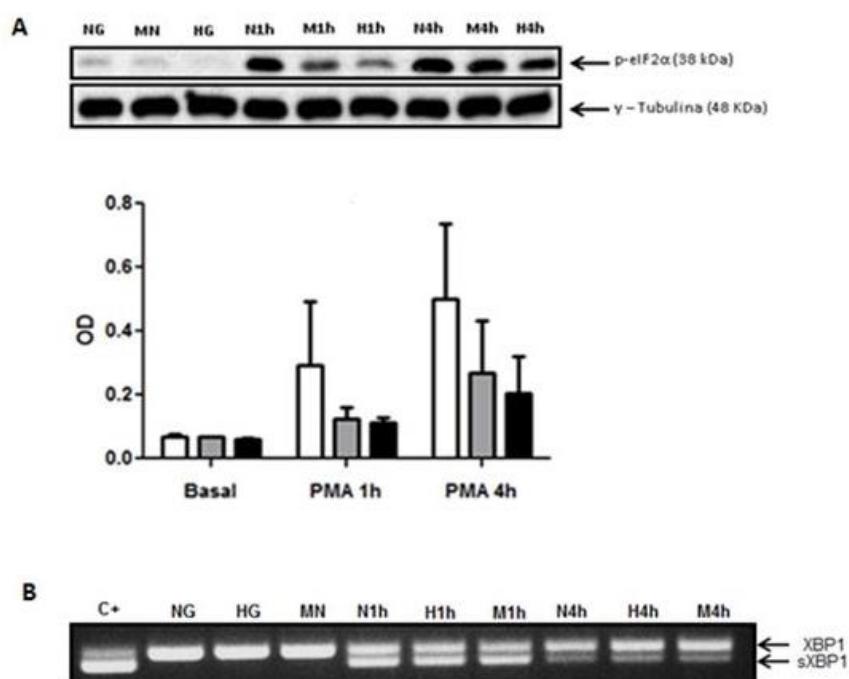


Figure 4. Effect of HG+PMA on ER stress markers: (A) p-eIF2 α ; (B)sXBP1.