

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

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.

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; ZOZULINSKA 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, calpainas e proteassoma que ativam quinases, dissociam a ligação protética 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 retículo 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 condensamento 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 sítio 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 acetores 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).

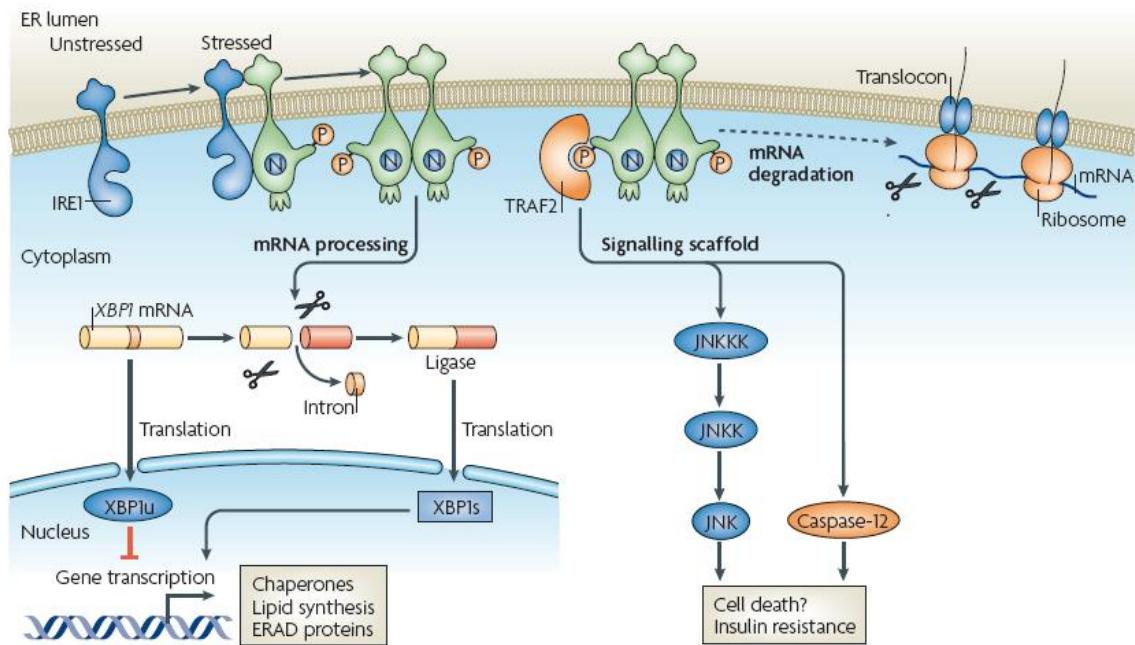
O RE é também o depósito primário de cálcio da célula. Tanto a formação de novas proteínas como a função exercida pelas chaperonas exigem altos níveis de cálcio intraluminal. A formação de proteínas no RE necessita de grande quantidade de energia, o ATP também é necessário para manter as funções das 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.

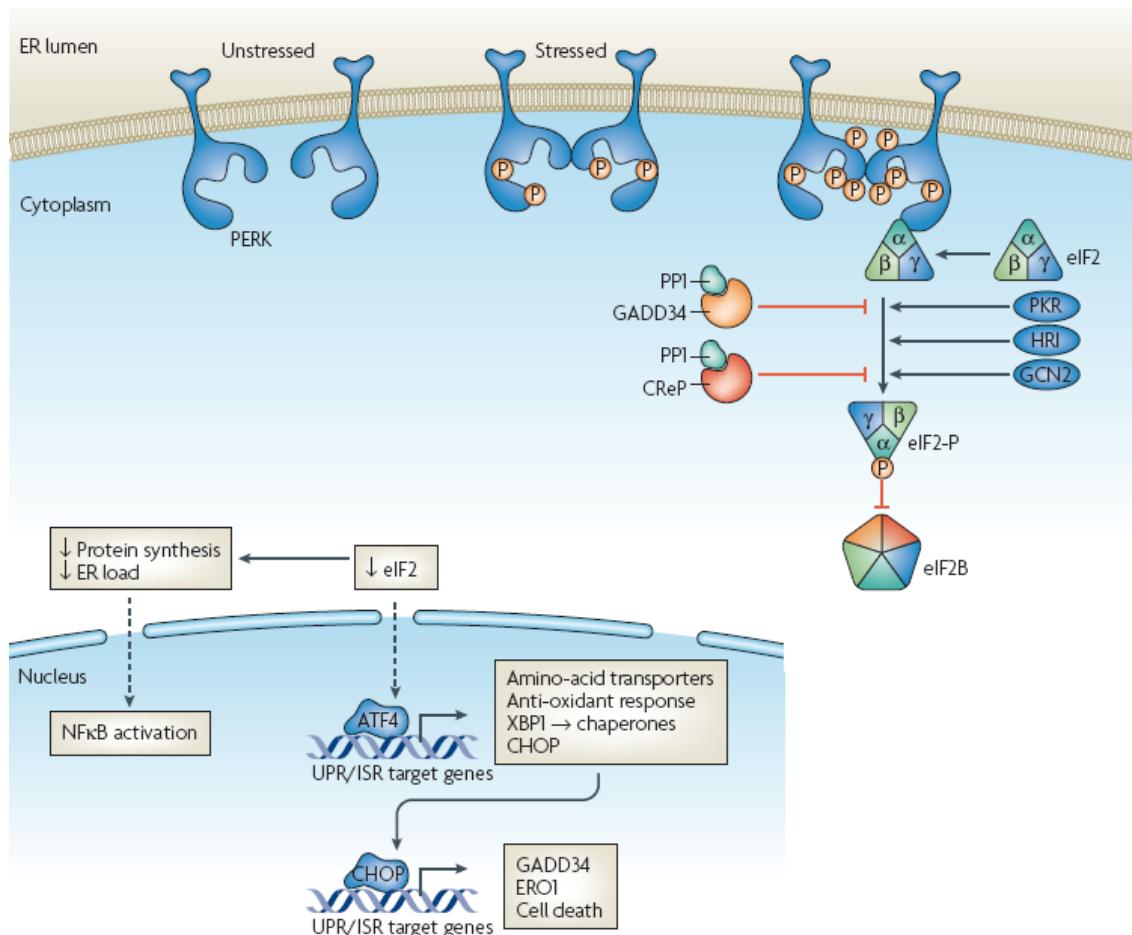


Em situações de estresse no retículo endoplasmático, IRE-1 se dimeriza, autofosforila no seu domínio quinase citosólico e atua como endoribonuclease.

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.

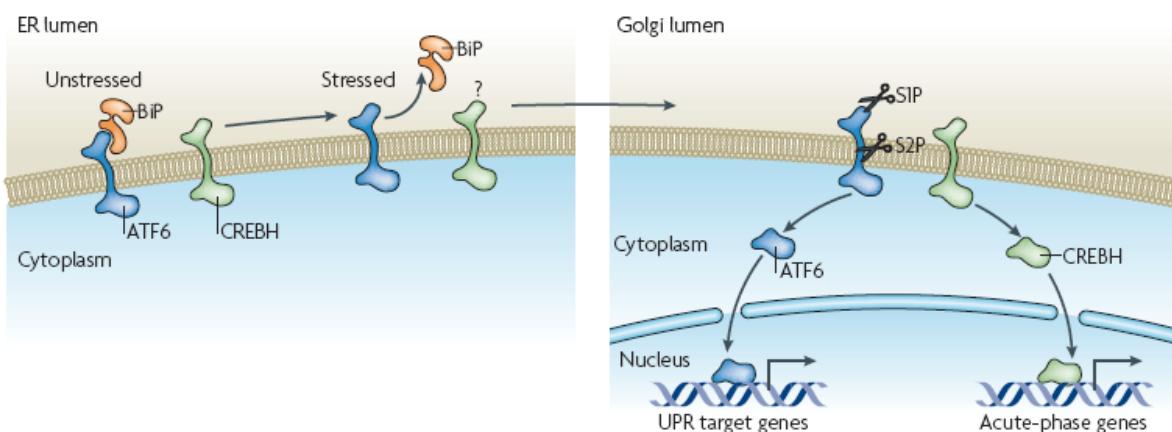


Em resposta ao estresse de RE, PERK dimeriza, se autofosforila, promovendo assim sua ativação. A fosforilação da subunidade α do eIF2 na Ser51, inibe o eIF2B de reciclar o eIF2 em sua forma ativa ligada a GTP. O resultado reduz atividade do eIF2B e o complexo eIF2 passa a exercer todas as funções importantes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



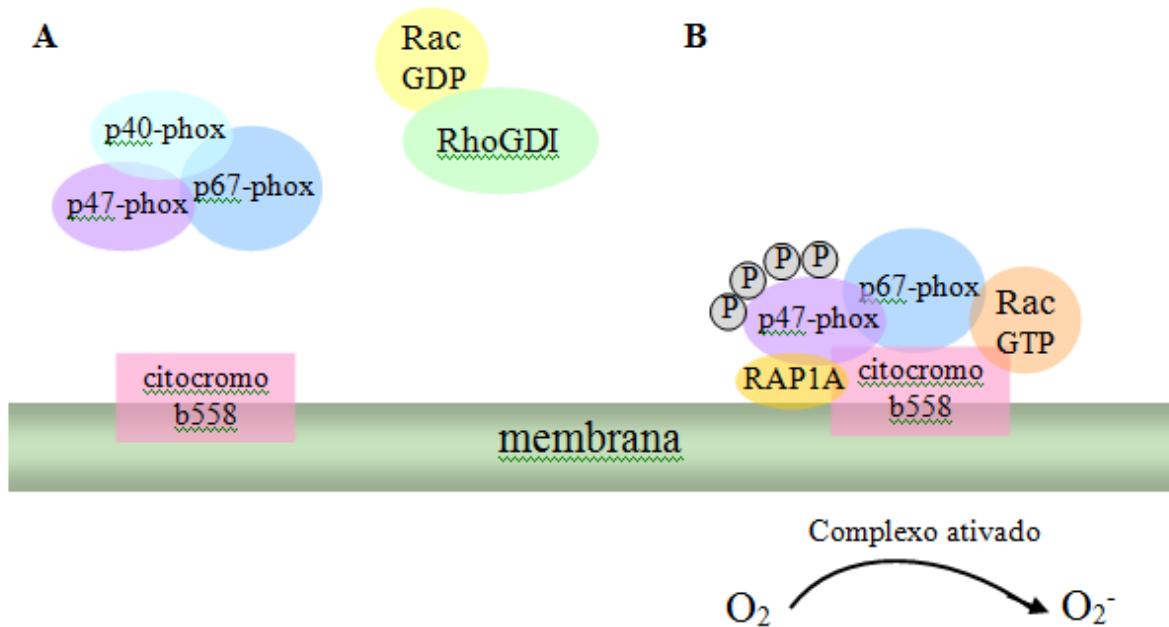
Em condições normais ATF6 e CREBH se localizam na membrana do RE. Em condições de estresse, Bip se dissocia de ATF6 para se ligar a proteínas mal formadas e impedir a agregação das mesmas. Essa dissociação faz com que ATF6 e CREBH sejam translocados para o Complexo de Golgi. Os detalhes dessa translocação 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 p47phox.

Fonte: (EMORY UNIVERSITY, 2013)(Modificado).

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:

$$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$$

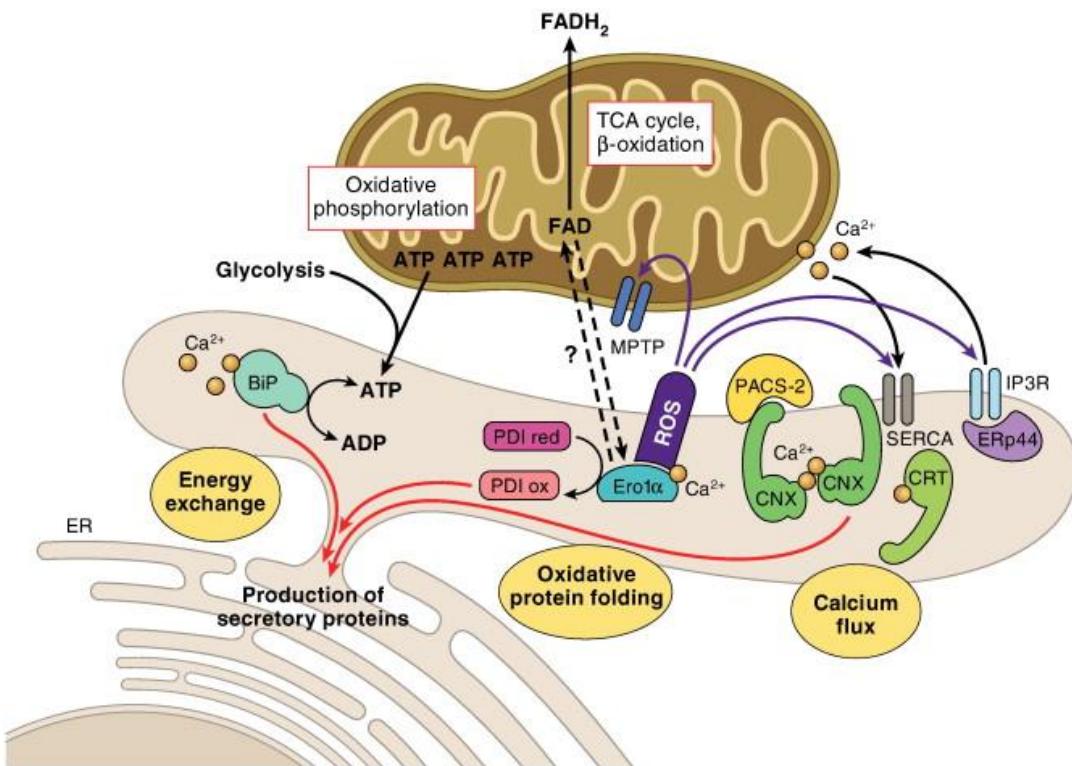
como em fluídos biológicos a concentração livre de ferro é limitada, a interação entre H_2O_2 e O_2^- , para formar $\cdot\text{OH}$, é então catalisada e limitada pela concentração livre de ferro. A reação de Haber-Weiss:

$$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2^- \rightarrow \text{O}_2 + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$$

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 $\text{HCO}_3\cdot$, 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.

CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou que neutrófilos de ratos diabéticos quando estimulados com PMA apresentam maior susceptibilidade a morte devido a 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.; YOUNK, 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 fromthe lumen ofthe endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional andtranslational 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**, 2010. In press.

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.; SZCZEPANI \acute{K} , A.; SIEKIERKA, H. Phagocytosis, bactericidal capacity, and superoxide anion (O $_2^-$) 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.