UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**AMILÓIDE SÉRICA A: AÇÃO SOBRE LEUCÓCITOS E POSSÍVEL
PARTICIPAÇÃO NA MANUTENÇÃO DO ESTADO INFLAMATÓRIO
CRÔNICO NO DIABETES**

Elaine Hatanaka

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Profa. Dra. Ana Campa

São Paulo
2004

18119

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**AMILÓIDE SÉRICA A: AÇÃO SOBRE LEUCÓCITOS E POSSÍVEL
PARTICIPAÇÃO NA MANUTENÇÃO DO ESTADO INFLAMATÓRIO
CRÔNICO NO DIABETES**

Elaine Hatanaka

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Profa. Dra. Ana Campa

São Paulo
2004

DEDALUS - Acervo - CQ

30100010529

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Hatanaka, Elaine

H361a Amilóide sérica A: ação sobre leucócitos e possível participação na manutenção do estado inflamatório crônico no diabetes / Elaine Hatanaka. -- São Paulo, 2004. 140p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia. Orientador: Campa, Ana

1. Patologia química 2. Diabetes mellitus 3. Bioquímica celular I. T. II. Campa, Ana, orientador.

616.07 CDD

Elaine Hatanaka

AMILÓIDE SÉRICA A: AÇÃO SOBRE LEUCÓCITOS E POSSÍVEL
PARTICIPAÇÃO NA MANUTENÇÃO DO ESTADO INFLAMATÓRIO
CRÔNICO NO DIABETES

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Ana Campa
orientador/presidente

Profa. Dra. Maria Tereza Zanella
1º examinador

Prof. Dr. Rui Curi
2º examinador

Profa. Dra. Zuleica Bruno Fortes
3º examinador

Profa. Dra. Primavera Borelli Garcia
4º examinador

São Paulo, 1 de fevereiro de 2005.

"É egoísmo, próprio de imaturos, pensar só nos frutos, quando se planta; a colheita não é a melhor recompensa para quem semeia; já somos bastante gratificados pelo sentido de nossas vidas, quando plantamos, já temos nosso galardão só em fruir o tempo largo da gestação, já é um bem que transferimos, se transferimos a espera para gerações futuras, pois há um gozo intenso na própria fé, assim como há calor na quietude da ave que choca os ovos no seu ninho. E pode haver tanta vida na semente, e tanta fé nas mãos do semeador, que é um milagre sublime que grãos espalhados há milênios, embora sem germinar ainda não morreram".

Raduan Nassar

À minha orientadora profa. Ana Campa,
agradeço não somente pela orientação neste trabalho,
mas também pelos anos de dedicação, carinho,
paciência e principalmente,
muita sabedoria.

Aos meus pais

Quando penso em educação, fica claro para mim, que as coisas mais essenciais da vida, aprendi com vocês. Através de exemplos certos e é claro, algumas vezes errados, vocês contribuíram em todos os aspectos na minha formação.

A vocês, *Dona Denise e Seu Luiz*,
minha eterna gratidão.

Ao Alexandre

Amar, verbo intransitivo.

Meu amor, você foi o responsável por toda a base emocional que me deu paz,
tranquilidade e harmonia durante estes anos.
"Brigadão".

Agradecimentos

À minha enorme família, irmãos, cunhados, tios e agregados pela união que existe entre nós.

À todos os docentes e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP, especialmente do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas e ao pessoal da secretária da pós-graduação, pela contribuição durante estes anos.

À Dra. Patrícia Teófilo Monteagudo e ao Dr. Mauro Sérgio Martins Marrocos, pela indispensável cooperação na casuística deste estudo.

Ao “clube da Luluzinha”, fiéis colegas de bancada, Cristiani Bürger, Silvana Sandri, Maria Rita Rodrigues, Flavia Mamy, Sabrina Okada, Flavia Garcia, Alziana Pedrosa, Sueli Silva, Silene Migliorini, Lilin e Paula Kujbida pelo convívio durante estes anos e pelo crescimento que cada uma de vocês plantou em todas nós. Especialmente a Sabrina e a Flávia pelo apoio técnico.

Aos professores Dr. Bayardo Baptista Torres (IQ-USP) e Dr. Hugo Aguirre Armelin (IQ-USP) por toda ajuda.

Ao Valdecir F. Ximenes, pela ajuda e treinamento incondicional.

Às amigas Suely Lamarão, Sandra Mello Reis e Flávia Cassiola, simplesmente pela amizade.

Aos pacientes e amigos doadores de sangue.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

1	LISTA DE ABREVIATURAS.....	3
2	RESUMO.....	5
3	ABSTRACT.....	6
4	INTRODUÇÃO.....	7
5	REVISÃO DA LITERATURA.....	9
5.1	AMILÓIDE SÉRICA A (SAA)	9
5.2	NEUTRÓFILOS, CÉLULAS MONONUCLEARES E INFLAMAÇÃO.	11
5.3	PRIMING E BURST OXIDATIVO.....	13
5.4	DOENÇA GRANULOMATOSA CRÔNICA.....	16
5.5	CITOCINAS	16
5.5.1	Interleucina 8 (IL-8).....	17
5.5.2	Fator de necrose tumoral alpha (TNF- α).....	18
5.5.3	Interleucina 1 beta (IL-1 β)	19
5.5.4	Receptor Antagonista de IL-1 (IL-1ra).....	20
5.6	VIAS DE SINALIZAÇÃO PARA EXPRESSÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS	20
5.6.1	Sinalização via fator de transcrição NF- κ B	22
5.6.2	Sinalização via receptores de superfície celular associado à proteína G triméricas.....	23
5.7	DIABETES E FAGÓCITOS	24
6	OBJETIVOS.....	27
7	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
7.1	CASUÍSTICA DO ESTUDO COM DGC	28
7.2	CASUÍSTICA DO ESTUDO COM PACIENTES DIABÉTICOS	28
7.3	MATERIAL	30
7.3.1	Reagentes.....	30
7.3.2	Equipamentos.....	30
7.4	MÉTODOS.....	31
7.4.1	Preparo de soluções.....	31
7.4.2	Preparo do zimosan.....	31
7.4.3	Isolamento de neutrófilos.....	32
7.4.4	Isolamento de células mononucleares	32
7.4.5	Cultura de neutrófilos e células mononucleares	33
7.4.6	Consumo de oxigênio de neutrófilos.....	33
7.4.7	Medidas de emissão de luz por quimioluminescência.....	34
7.4.8	Incubação de neutrófilos com SAA e alguns inibidores da cascata de sinalização.....	34
7.4.9	Incubação de neutrófilos com SAA ou LPS e alguns inibidores de NF- κ B.....	34
7.4.10	Incubação de neutrófilos com SAA ou LPS e toxina pertussis	35
7.4.11	Viabilidade Celular.....	35
7.4.12	Determinação de citocinas	35
7.4.13	Determinação de SAA.....	38
7.4.14	Migração celular.....	39
7.4.15	Análise estatística dos dados	39
8	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
8.1	VIAS DE SINALIZAÇÃO ATIVADAS POR SAA PARA A LIBERAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS	41
8.1.1	Resultados.....	41
8.1.1.1	Efeito de inibidores da MAPK e PI3K na liberação de IL-8 e TNF- α de neutrófilos humanos.	41
8.1.1.2	Efeito dos inibidores do NF- κ B na liberação de IL-8, TNF- α de neutrófilos humanos.....	43
8.1.1.3	Efeito da toxina pertussis na liberação de IL-8 de neutrófilos humanos.....	45
8.1.2	Discussão.....	46
8.2	SAA E PRIMING DE NEUTRÓFILOS	48
8.2.1	Resultados.....	48
8.2.2	Discussão.....	53
8.3	EFEITO DA SAA NA LIBERAÇÃO DE IL-8 E TNF- α EM PACIENTES COM DGC	55

8.3.1	<i>Resultados</i>	55
8.3.2	<i>Discussão</i>	59
8.4	FUNÇÃO DA SAA NA PROGRESSÃO DO DIABETES MELLITUS.....	61
8.4.1	<i>Resultados</i>	62
8.4.1.1	Efeito da SAA na liberação de IL-8, TNF- α , IL1 β e IL-1ra de neutrófilos e células mononucleares de pacientes diabéticos.....	62
8.4.1.2	Efeito da SAA na quimiotaxia de neutrófilos e células mononucleares de pacientes diabéticos.....	64
8.4.1.3	Dosagens séricas de SAA, IL-8, TNF- α , IL1 β e IL-1ra.....	67
8.4.2	<i>Discussão</i>	68
8.5	UTILIZAÇÃO DE SAA COMO MARCADOR DO ESTADO INFLAMATÓRIO SUBCLÍNICO CRÔNICO NO DIABETES MELLITUS TIPO 2.....	71
8.5.1	<i>Resultados</i>	72
8.5.2	<i>Discussão</i>	76
8.6	UM ACHADO AO ACASO: INFLUÊNCIA IMUNOMODULATÓRIA DA SOLUÇÃO HIPEROSMOLAR DE NaCl SOBRE A LIBERAÇÃO DE IL-8, TNF- α , IL-1 β E IL-1RA DE NEUTRÓFILOS E CÉLULAS MONONUCLEARES.....	78
8.6.1	<i>Resultados</i>	78
8.7	DISCUSSÃO	86
9	CONCLUSÕES	88
10	CONSIDERAÇÕES FINAIS	90
11	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
12	ANEXO I: MEDICAÇÃO	109
13	ANEXO II: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA HU-USP	110
14	ANEXO III: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA FCF-USP	111
15	ANEXO IV: TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS INFORMAÇÃO	112
16	ANEXO V: IDENTIFICAÇÃO DOS PACIENTES DO PROJETO DE PESQUISA	113
17	ANEXO VI: TRABALHOS PUBLICADOS NO PERÍODO	114
17.1	HYPERRESPONSIVENESS OF NEUTROPHILS FROM GP 91 ^{PROX} DEFICIENT PATIENTS TO LIPOPOLYSACCHARIDE AND SERUM AMYLOID A	
17.2	SERUM AMYLOID A-INDUCED mRNA EXPRESSION AND RELEASE OF TUMOR NECROSIS FACTOR -ALPHA (TNF-A) IN HUMAN NEUTROPHILS.	
17.3	THE ACUTE PHASE PROTEIN SERUM AMYLOID A PRIMES NEUTROPHILS.	
17.4	mRNA EXPRESSION AND RELEASE OF INTERLEUKIN-8 INDUCED BY SERM AMYLOID A IN NEUTROPHILS AND MONOCYTES.	
17.5	. APOLIPOPROTEINS A-I AND A-II DOWNREGULATE NEUTROPHILS FUNCTIONS.	
18	ANEXO VII: CURRICULUM VITAE	137

1 Lista de abreviaturas

Apo: apolipoproteína

Apo AI: apolipoproteína AI

Apo AII: apolipoproteína AII

DAG: diacil glicerol

DGC: doença granulomatosa crônica

DM: diabetes mellitus

DMSO: dimetil sulfóxido

EDTA: ácido etileno diamino tetraacético

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.

EMC: matriz extracelular

ERK: proteína regulada por sinais extracelulares

ERO: espécies reativas do oxigênio

fMLP: formil-metionil-leucil-phenilalanina

G-CSF: fator estimulador de colônia de granulócitos

GM-CSF: fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos

HDL: lipoproteína de alta densidade

HRP: peroxidase de raiz forte

IL-1: interleucina 1

IL-1 β : interleucina 1 beta

IL-10: interleucina 10

IL-13: interleucina 13

IL-1ra: receptor antagonista para interleucina 1

IL-4: interleucina 4

IL-6: interleucina 6

IL-8: interleucina 8

INF- γ : interferon gama

IP₃: inositol trifosfato

JNK/SAPKs: proteínas quinases ativadas por estresse

LCAT: lecetina colesterol acil transferase

LDL: lipoproteína de baixa densidade

LPS: lipopolissacarídeo

MAPK: proteínas quinases ativadas por mitógenos

M-CFS: fator estimulador de colônia de macrófagos

MEK: MAP/ERK quinase

MIP1 β : proteína inflamatória

MIP1 α : proteína inflamatória de macrófago 1 alfa

MPO: mieloperoxidase

NF- κ B: fator nuclear κ B

NO: óxido nítrico

PBMC: células mononucleares periféricas sangüíneas

PGE₂: prostaglandina E₂

PI3K: fosfatidil inositol 3 quinase

PKC: proteína quinase C

PMA: acetato de forbol miristato

PMN: polimorfonuclear (s)

ROS: espécies reativas de oxigênio

SAA: amilóide sérica A

SOD: superóxido dismutase

TGF- β : fator de crescimento tumoral

TK: tirosina quinase

TNF: fator de necrose tumoral

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

TNF- β : fator de necrose tumoral beta

2 Resumo

A proteína de fase aguda, amilóide sérica A (SAA), exerce função importante na resposta inflamatória, estimulando a expressão e a liberação de TNF- α , IL-8 e IL-1 β em neutrófilos e células mononucleares (1, 2, 3, 4). Visando obter mais informação sobre o processo, estudamos as vias de sinalização envolvidas na liberação dessas citocinas, após as células serem estimuladas com SAA. Para tal, avaliamos o efeito de alguns inibidores da cascata de sinalização e evidenciamos indiretamente a participação das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e da fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K) (2, 3). Com a utilização de inibidores específicos, observamos que há inibição da liberação de IL-8 quando utilizamos um antagonista da proteína Gi e observamos também a participação do fator de transcrição, NF- κ B na liberação de IL-8 e TNF- α promovida por SAA. Utilizando pacientes deficientes no sistema NADPH oxidase, ou seja, portadores da doença granulomatosa crônica (DGC) mostramos que não havia a participação desse sistema na síntese e liberação dessas citocinas, visto que observamos hiper-sensibilidade nos neutrófilos desses pacientes, com uma maior produção de TNF- α e de IL-8, tanto em células estimuladas e não estimuladas (5). As concentrações séricas de SAA e IL-8 nos pacientes estudados apresentaram-se também aumentados em relação ao grupo controle. Adicionalmente SAA apresenta outro efeito pró-inflamatório, demonstramos que ela é capaz de tornar neutrófilos mais responsivos a estímulo opsonizado (6). Este conjunto de dados nos levou a acreditar na possibilidade da SAA exercer uma função importante na progressão de doenças crônicas, que se caracterizam pelo aumento permanente da SAA sérica. Neste sentido estudamos o efeito da SAA no diabetes mellitus tipo 2 e mostramos que neutrófilos e células mononucleares desses pacientes quando estimuladas por SAA têm um aumento na liberação de IL-8 e IL-1 β e um aumento na quimiotaxia quando comparadas com células do grupo controle. Desta forma acreditamos que SAA contribua na manutenção do estado inflamatório crônico no diabetes e no aparecimento de complicações vasculares.

3 Abstract

We previously described that the acute phase protein serum amyloid A (SAA) is a potent stimulus for the expression and release of $\text{TNF-}\alpha$, IL-8 and IL-1 β (1, 2, 3, 4). The signaling involved in this process was here studied through the effect of signaling inhibitors. The participation of MAPK, PI-3K pathways, Gi protein coupled receptors and the NF- κ B on the signaling cascade was indirectly evidenced (2, 3). The NADPH oxidase system seems to be not required in the release of cytokines promoted by SAA because neutrophils from patients with Chronic Granulomatous Disease (CGD - NADPH system deficiency) also responded to SAA. Indeed neutrophils from CGD patients release larger amounts of IL-8 and $\text{TNF-}\alpha$ than neutrophils from control individuals, under basal and stimulated conditions (5). Moreover SAA showed to be a priming agent rendering the neutrophils more responsive to opsonized particles (6). These data reinforce our hypothesis that SAA has a participation in the progression of chronic diseases in which the serum concentration of this protein is permanently increased. To evaluate the proinflammatory character of SAA we chosen diabetes mellitus type 2. This study makes the novel observation that neutrophils and mononuclear cells of diabetics were more responsive to SAA in the induction of the proinflammatory cytokine IL-1 and the proangiogenic and chemotactic protein IL-8 secretion. Cell migration was also increased. It is well known that patients with diabetes mellitus have an increased prevalence of vascular disease and correlation exists between the increased prevalence of vascular disease and cytokine production. Thus, we believe that the hyperresponsivity of leukocytes to SAA may be relevant to the proinflammatory conditions associated to vascular complications in diabetic patients.

INTRODUÇÃO

4 Introdução

Assim que um processo inflamatório é iniciado, há alteração no perfil de síntese hepática com síntese e liberação de grandes quantidades de proteínas de fase aguda, dentre as quais a amiloide sérica A (SAA) (7). Sabe-se que na concentração presente no sangue, durante a resposta de fase aguda, SAA é ativa em leucócitos. Recentemente foi demonstrado pelo nosso grupo que SAA é um potente estímulo para a liberação de TNF- α , IL-8 e IL-1 β de neutrófilos e células mononucleares humanas (1, 2, 3, 4). Vários pontos são relevantes quando consideramos que a SAA é um estímulo potente para a liberação de citocinas a partir de neutrófilos. Neste trabalho, realizamos uma primeira incursão na questão da sinalização celular para produção de citocinas em resposta a SAA. Dessa forma selecionamos alguns inibidores para a PI-3K, MEK, p38 MAPK, um antagonista da proteína Gi que medeia a ativação de receptores associados a ela, inibidores do fator de transcrição NF- κ B e neutrófilos deficientes no sistema NADPH oxidase.

Outra questão importante é a possibilidade da SAA aumentar a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) por neutrófilos. Neste caso ela poderia estar ativando como um estímulo direto à produção de ROS (*burst* oxidativo) ou então atuar como um *priming* sensibilizando a célula quando da adição de um segundo estímulo. Em estudo realizado pelo grupo observamos que SAA não foi capaz de ativar o *burst* oxidativo de neutrófilos. Desta forma é importante conhecer se SAA induz o *priming* de neutrófilos.

Em algumas doenças crônicas como na artrite reumatóide (8), Alzheimer (9) e no diabetes mellitus (10), as concentrações séricas de SAA estão constantemente elevadas, acreditamos que nestes casos a SAA pode estar funcionando como um estímulo endógeno constante para esses pacientes, exercendo função importante na gênese e progressão destas doenças. Neste trabalho estudamos os efeitos da SAA em neutrófilos e células mononucleares de pacientes com diabetes mellitus Tipo 2. Avaliamos também se SAA pode estar contribuindo para a manutenção do estado inflamatório sub-clínico crônico do diabetes e conseqüentemente contribuindo para o aparecimento de complicações vasculares nestes pacientes.

Apesar da SAA ser objeto de estudo de vários pesquisadores, sua função biológica continua indefinida. Acreditamos que resultados de nosso grupo mostrando

a capacidade de SAA causar o aumento na expressão e liberação de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e IL-8 por neutrófilos e células mononucleares (1, 2, 3, 4) contribuam significativamente para a compreensão do significado biológico deste reativo de fase aguda. Esperamos que este estudo permita estender ainda mais a compreensão do modo de ação da SAA.

*REVISÃO DA
LITERATURA*

5 Revisão da literatura

5.1 Amilóide Sérica A (SAA)

As SAA são pequenas apolipoproteínas (12 kD), encontradas na circulação em baixas concentrações (1 a 10µg/mL), mas que durante a resposta de fase aguda podem ter sua concentração sérica aumentada em até 1000 vezes (7, 11). Na circulação a SAA se associa à HDL e passa a compor até 70% do total de proteínas desta lipoproteína (12), tornando-se a apoproteína predominante (apo SAA), excedendo a apo AI (a mais abundante apoproteína da HDL nativa). A subfração 3 da HDL (HDL₃) parece ser a aceptora preferencial da partícula, embora quantidades significativas de apo SAA sejam encontradas associadas com outras lipoproteínas (13). SAA pode constituir de 17% a 87% das apolipoproteínas totais da HDL de fase aguda e, conseqüentemente, as porcentagens de apo AI livre podem aumentar numa relação direta com a concentração de SAA. A afinidade das apolipoproteínas pela HDL é apo A-II > SAA > apo A-I (14).

Assim, como outras proteínas de fase aguda, o fígado é o maior sítio de expressão da SAA (15). Além dos hepatócitos, existem fortes evidências da sua síntese em monócitos, células endoteliais e fibroblastos. SAA também pode ser observada em lesões arterioscleróticas (16, 17), na micróglia de pacientes com Alzheimer (9) e em células presentes no foco inflamatório de pacientes com artrite reumatóide (8).

O mecanismo molecular envolvido na expressão gênica e liberação de SAA é complexo (18). Algumas regiões promotoras para a expressão da SAA respondem a LDL minimamente modificada (19), ésteres de forbol, IL-1 e IL-6 contendo sítios para múltiplos fatores de transcrição. Entre os fatores de transcrição podemos citar NF-κB, fator nuclear para IL-6 e Sp1 (20).

A liberação de SAA é induzida transientemente em 72 a 96 horas após o estímulo inflamatório inicial e rapidamente retorna ao nível normal. Algumas citocinas como interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e interleucina-6 (IL-6) (que age sinergicamente com IL-1), são capazes de estimular a síntese hepática de SAA durante o processo de fase aguda. Fatores de crescimento e outros produtos originados de células envolvidas com a resposta imune também

podem estimular a síntese desta proteína (15). Por outro lado sua síntese pode ser totalmente inibida pela presença de receptor antagonista para interleucina-1 (IL-1ra) (21). O fato da regulação da expressão de SAA ser complexa e envolver múltiplos mecanismos moleculares é um forte indício da importância biológica desta, principalmente se levarmos em conta que evolutivamente os genes da SAA foram bem conservados, existindo há cerca de 400 milhões de anos (22).

Diversos efeitos biológicos têm sido descritos para SAA. Em camundongos, SAA inibe a febre induzida por IL-1 e TNF- α e *in vitro* inibe a síntese de PGE₂ (23). Em linfócitos humanos, SAA previamente incubada com a matriz extracelular (ECM) induz aumento na liberação de TNF- α de maneira dose dependente (24). SAA também age como um indutor das collagenases (25), inibição de linfócitos e da proliferação de células endoteliais (26, 27), inibição da agregação plaquetária (28), modificação do *burst* oxidativo de neutrófilos em resposta a fMLP (29, 30), inibição da adesão de linfócitos T a proteínas da matriz extra celular (ECM) (31), indução da adesão, migração e infiltração no tecido de monócitos, neutrófilos, linfócitos e mastócitos, indução de PGI₂ em células endoteliais e formação de complexos com proteínas da matriz extracelular (32, 33, 34). Resultados obtidos em nosso laboratório mostraram que a SAA é um potente estímulo para a liberação de TNF- α , IL-1 β e IL-8 de neutrófilos e células mononucleares humanas (1, 2, 3, 4).

Alguns trabalhos que procuraram identificar os receptores de superfície celular de SAA mostraram que a atividade quimiotática induzida por SAA de células fagocíticas humanas é mediada pelo FPRL1, um receptor transmembrana associado a proteína G, que apresenta baixa afinidade por N-formil peptídeos (fMLP) e alta afinidade por lipoxina A4 (35). A integrina CD18/CD11b e (LCAM-1) foram implicados na adesão de neutrófilos e monócitos às células endoteliais (36). Finalmente, o receptor para plaquetas GPIIb/IIIa (integrina α IIb β 3) foi sugerido como o receptor para adesão de plaquetas imobilizado por SAA (28). Elevação transiente na concentração de cálcio citoplasmático com participação da proteína quinase C e da proteína G sensível a toxina pertussis esta envolvida na migração de células fagocíticas humanas induzida por SAA (8). Desta forma podemos dizer que a resposta celular a SAA apresenta complexas bases moleculares, envolvendo interações entre múltiplos domínios funcionais e moléculas específicas de superfície.

5.2 Neutrófilos, Células Mononucleares e Inflamação.

Define-se inflamação como uma reação complexa do tecido conjuntivo vascularizado, que envolve o plasma e as células circundantes tanto nos vasos sangüíneos como as dos componentes extravasculares do tecido conjuntivo. A inflamação normalmente é dividida em dois padrões: agudo e crônico. O padrão agudo tem uma duração relativamente curta, de minutos a alguns dias, e suas principais características são a exudação de líquidos e proteínas plasmáticas e a emigração de fagócitos (neutrófilos e monócitos), predominando leucócitos polimorfonucleares. A inflamação crônica, por outro lado, tem duração maior e associa-se com a presença de linfócitos e macrófagos e também com a proliferação dos vasos sanguíneos e do tecido conjuntivo (37).

Células mononucleares e neutrófilos são produzidos na medula óssea pela hematopoiese. Os monócitos circulam no sangue periférico por aproximadamente 18-72 horas, migram para os tecidos e se diferenciam em macrófagos teciduais. Algumas células passam a residir em tecidos específicos, tornando-se macrófagos fixos, e outras permanecem móveis e são denominadas de macrófagos livres. Durante a resposta imune estas células podem ser ativadas por uma variedade de estímulos e a atividade fagocítica destas células pode ser aumentada pela secreção de citocinas por células T_h ativadas, pelos mediadores da resposta inflamatória e componente da parede celular bacteriana. Um dos ativadores mais potentes é o interferon-gama ($IFN-\gamma$) secretado por células T_h ativadas (38).

Os eventos que levam a uma resposta inflamatória são caracterizados pelo reconhecimento do sítio de injúria por células inflamatórias, o recrutamento específico de leucócitos ao dano com a finalidade de tentar restabelecer a relação normal entre as matrizes parenquimal, estromal e extracelular. A regulação molecular deste complexo sistema fisiológico envolve a interação entre células da superfície, da matriz extracelular e mediadores solúveis como as quimiocinas (39).

Neutrófilos representam aproximadamente de 50 a 60% do total de leucócitos circulantes e constituem a “primeira linha de defesa” contra agentes infecciosos que penetram as barreiras físicas do corpo. Uma vez iniciada a resposta inflamatória, neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas para o sítio de infecção ou injúria (40). Neutrófilos são capazes de fagocitar e matar microorganismos invasores

e assim exercem uma função importante na defesa do hospedeiro contra todas as classes de agentes infecciosos. Sua atividade microbicida origina-se de processos oxidativos e não oxidativos, os quais são ativados simultaneamente após fagocitose. Embora a destruição de agentes infecciosos ocorra intracelularmente há também a liberação de moléculas citotóxicas no meio extracelular e estas podem causar dano aos tecidos (41, 42).

Cerca de 10^{11} neutrófilos são produzidas por dia em um adulto normal, estas circulam por 7-10 horas e depois migram para os tecidos onde tem poucos dias de duração (43). A sobrevivência dos neutrófilos pode ser aumentada após exposição a LPS, estreptococos inativados, IL-1 β , TNF- α , IL-6, INF- γ , G-CSF e GM-CSF (44, 45). Na circulação sanguínea os neutrófilos formam uma população heterogênea, existindo populações de neutrófilos em diferentes estágios de ativação, de dormentes até muito ativados. *Priming* é o mecanismo no qual neutrófilos dormentes adquirem um estado de pré ativação, o qual permite uma resposta mais intensa quando em contato com um estímulo (46, 47).

Fisiologicamente, os neutrófilos podem ser encontrados em sítios extravasculares, como por exemplo, em cavidades e líquidos corporais, entretanto, estas células podem ser recrutadas da circulação para sítios de inflamação. O evento inicial deste recrutamento é o aumento na aderência de neutrófilos ao endotélio vascular em decorrência das alterações hemodinâmicas que conduzem a migração transendotelial e hemoconcentração local. Estes eventos acontecem na dependência de estímulos lesivos, de IL-1, TNF- α e outros mediadores inflamatórios. Após estímulo, neutrófilos produzem espécies reativas de oxigênio, que são de vital importância na atividade microbicida, tumoricida, e inflamatória destas células. A destruição celular do microorganismo invasor é dependente da ativação do sistema NADPH oxidase, ou seja, da geração de espécies reativas de oxigênio e mobilização de cátions no fagossomo. Durante um processo inflamatório, citocinas interagem com receptores na superfície dos neutrófilos, interferindo na sua atividade funcional e na evolução da resposta inflamatória (48).

Após associação com receptores de membrana, partículas opsonizadas e o peptídeo sintético N-formil-metionil-fenilalanina (fMLP) ativam a via de produção de ERO (ativação da PKC). Estéres de forbol, por exemplo, PMA que não atua via receptor ativa diretamente a PKC. A PKC ativa é capaz de levar ao arranjo do

sistema multienzimático NADPH oxidase, através da fosforilação de seus componentes citossólicos $p47^{phox}$ e $p67^{phox}$ (49, 50).

5.3 *Priming e burst oxidativo*

O *burst* oxidativo produz ânion superóxido através da redução de oxigênio molecular por elétrons provenientes do NADPH. Este evento ocorre através da ativação do complexo NADPH oxidase e envolve o aumento do consumo de oxigênio, de glicose e de agentes redutores (51, 52).

O complexo enzimático NADPH oxidase, é formado por componentes que se encontram dissociados na célula em repouso. Estes componentes são a $p40^{phox}$, a $p47^{phox}$ e a $p67^{phox}$, agrupadas num complexo proteico citoplasmático de 240kDa. Também há o citocromo b_{558} , composto pelas proteínas $p22^{phox}$ e $gp91^{phox}$, localizadas nas membranas das vesículas secretórias e dos grânulos específicos citoplasmáticos. Participam ainda do complexo outras duas proteínas de baixo peso molecular ligantes de nucleotídeo guanina: a Rac 2, e a Rap1a (50, 51).

No neutrófilo ativado, ocorre a fosforilação do componente citossólico $p47^{phox}$, resultando na migração de todo o complexo para a membrana plasmática. Uma vez na membrana, o complexo associa-se ao citocromo b_{558} que migrou para a mesma através da fusão das vesículas secretórias e dos grânulos específicos. a Rac1 liga-se simultaneamente ao trifosfato de guanina (GTP) e migra para a membrana juntamente com o complexo citossólico, assim ocorre a ativação dos neutrófilos (Esquema 1) (49, 50, 51, 52).

Esquema 1: Acoplamento dos componentes do sistema NADPH oxidase após ativação dos neutrófilos (modificado de Babior, 1999) (51).

Além do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) produzido inicialmente outras EROs mais potentes são geradas a partir deste precursor (Esquema 2). Peróxido de hidrogênio (H_2O_2), é formado a partir de ânion superóxido por dismutação espontânea e/ou ação catalítica da superóxido dismutase (SOD). Ácido hipocloroso (HOCl) pode ser formado através da reação entre H_2O_2 com os íons cloreto (Cl^-) na presença de MPO (mieloperoxidase). Cloraminas secundárias podem ser geradas pela reação de HOCl com compostos contendo nitrogênio. Existem dois mecanismos possíveis para a produção de radical hidroxila ($\bullet OH$) por neutrófilos: reação de Fenton, onde H_2O_2 reage com íons metálicos, como íons ferro ou através de reação de ácido hipocloroso (HOCl) com ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (51, 52, 53).

O oxigênio singlete (1O_2) pode ser produzido pela reação de H_2O_2 com o HOCl. A enzima óxido nítrico sintase oxida L-arginina formando L-citrulina e óxido nítrico. Tem sido também demonstrado que ânion superóxido reage com óxido nítrico formando peroxinitrito ($ONOO^-$).

Esquema 2: Possíveis espécies oxidantes produzidos pelos neutrófilos humanos após ativação do sistema NADPH oxidase (Hampton *et al.*, 1998) (53).

Múltiplos processos de transdução de sinal estão envolvidos no *priming*, no *burst* oxidativo de neutrófilos e na liberação de citocinas pelos mesmos. *Priming* e ativação apresentam-se como processos bioquímicos inseparáveis. Por exemplo, a atividade de neutrófilos pré-ativados pode ser resultado de uma alteração de uma ou mais componentes do sistema de transdução. Isto pode incluir fluxo de cátions livres (Na^+ , K^+ e Ca^{+2}), mudanças no potencial de membrana, ativação de proteases intracelulares, mudanças no ácido araquidônico e metabolismo fosfolipídico ou fosforilação de proteínas específicas e mudanças na concentração intracelular de nucleotídeos citossólicos. Pequenas mudanças podem iniciar o *priming* e grandes levam a ativação do *burst* oxidativo, incluindo degranulação (54, 55, 56).

São conhecidos dois caminhos distintos de ativação da NADPH oxidase, um Ca^{+2} dependente que leva a ativação da PKC dependente de Ca^{+2} , e o outro Ca^{+2} independente e não envolve a fosfolipase C ou proteína quinase C, ambas as vias parecem ser funcionais na ativação do *burst* oxidativo (54).

5.4 Doença Granulomatosa Crônica

O *burst* oxidativo e a importância do sistema NADPH oxidase passaram a ser mais investigado quando a Doença Granulomatosa Crônica (DGC) foi associada a um decréscimo no consumo de oxigênio, produção de ERO e um conseqüente defeito na morte de microorganismos invasores, deixando os pacientes muito mais susceptíveis a infecções que pessoas normais. A DGC é uma rara doença herdada, que acomete cerca de 1 a cada 250 000 nascidos, cerca de dois terços dos casos mostram um padrão de herança ligado ao cromossomo X, e o restante é autossômico recessivo. As causas mais conhecidas da doença são defeitos em qualquer um dos genes que codificam uma das quatro proteínas *phox* do sistema NADPH (gp91^{phox}, p22^{phox}, p47^{phox} e p67^{phox}) (57, 58, 59).

Os pacientes apresentam infecções bacterianas e fúngicas recorrentes, geralmente desde os primeiros anos de vida. Ocorre dificuldade do controle da infecção por neutrófilos e pode resultar em granulomas compostos por macrófagos ativados. Na DGC é comum também o aparecimento de complicações inflamatórias estéreis, esta última condição tem sido associada não somente com a deficiência da produção de ânions superóxido, mas também com significantes alterações na homeostase do Ca^{+2} , um elemento importante na resposta efetora de neutrófilos (60, 61).

5.5 Citocinas

Citocinas são proteínas secretadas pelas células do sistema imune inato e adaptativo, sendo mediadores importantes da resposta imune. Durante a fase aguda, células inflamatórias, acumuladas no sítio inflamatório produzem uma série destes mediadores. Estes são capazes de induzir inúmeras respostas e têm por função contribuir na regulação sistêmica e local para uma nova homeostase (62 ,63, 64).

As citocinas representam transmissores solúveis essenciais de comunicação célula a célula. Além de coordenarem as respostas imune e inflamatória, têm uma função essencial na transmissão de sinais para proliferação, diferenciação e função de várias células alvo, produzindo efeitos biológicos quando ligadas a receptores

específicos de alta afinidade (62). A maioria das células apresenta um pequeno número destes receptores, entretanto somente uma porcentagem deles precisa estar ocupado para produzir uma resposta máxima. Portanto, mesmo baixas concentrações de citocinas podem induzir efeitos biológicos *in vivo* (63).

A secreção de citocinas é um evento rápido e autolimitado. Essas proteínas não são usualmente armazenadas como moléculas pré-formadas e sua síntese é normalmente iniciada pela transcrição gênica como resultado de uma ativação celular. A liberação de algumas citocinas pode, adicionalmente, ser controlada por mecanismos pós-transcricionais, como a liberação proteolítica de um precursor ativo proveniente de um inativo (64).

5.5.1 Interleucina 8 (IL-8)

A citocina pró-inflamatória IL-8 faz parte da sub-família α das quimiocinas. Esta quimocina pode ser produzida por vários tipos celulares, incluindo monócitos, linfócitos, granulócitos, fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos, hepatócitos, células mesangiais e condrócitos. A IL-8 atua principalmente como quimioatraente para neutrófilos, células T, basófilos e linfócitos; age também como fator de ativação e fator angiogênico, sendo produzida rapidamente após um estímulo inflamatório. Receptores para IL-8 têm sido identificados em neutrófilos, basófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, células endoteliais e em eritrócitos (65, 66).

Embora inicialmente considerada um produto de monócitos, é conhecido que neutrófilos são fonte importante de IL-8. Quando isolados do sangue periférico, os neutrófilos não expressam mRNA para IL-8, a não ser que seja em cultura. C5a, fMLP e leucotrieno B não são bons estímulos quando comparados com LPS (67, 68). Estudos indicam a indução de expressão para o gene e a liberação de IL-8 por neutrófilos se dá através de uma via sensível à toxina pertussis (67). Através da liberação de IL-8, os neutrófilos adquirem a capacidade de amplificar o recrutamento de neutrófilos adicionais no sítio inflamatório. A produção de IL-8 pode ser esperada em infecções, isquemia, trauma e em outros distúrbios de homeostase tecidual, desde que as concentrações de IL-1 e TNF- α estejam elevadas. Nestas condições é provável que IL-8 seja a causa principal da acumulação local de neutrófilos (68, 69).

5.5.2 Fator de necrose tumoral alpha (TNF- α)

O fator de necrose tumoral (TNF) é o principal mediador da resposta imune imediata a vírus e bactérias gram negativas é também um dos principais responsáveis por muitas das complicações sistêmicas que ocorrem em infecções severas (64).

São descritas duas diferentes formas de TNF: TNF- α , uma proteína solúvel não-glicosilada de 17 kDa e TNF- β , uma glicoproteína secretada de 25 kDa. São produtos de diferentes genes e são produzidas por diferentes tipos celulares. O TNF- α é um potente mediador parácrino e endócrino de funções inflamatórias e imunes que regulam o crescimento e a diferenciação de uma variedade de tipos celulares. É seletivamente citotóxico para muitas células transformadas, especialmente em combinação com IFN- γ (62, 64).

TNF- α é secretado por monócitos e por macrófagos ativados, e por muitas outras células incluindo células B, células T e fibroblastos. Existem dois receptores para TNF (TNF-RI e TNF-RII) e ambos ligam TNF- α e TNF- β . São membros da superfamília NGFR/TNFR com quatro repetições ricas em cisteína no domínio extracelular. A maioria dos efeitos biológicos observados parece ser mediada através de TNF-RI (64, 66).

A principal função fisiológica do TNF é estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para o sítio de infecção e ativar essas células a erradicar micróbios. TNF exerce esses efeitos por diferentes ações nas células do endotélio vascular e leucócitos, entre elas podemos citar a indução da expressão de moléculas de adesão (integrinas e selectinas) no endotélio (64).

TNF age em hepatócitos aumentando a síntese de proteínas séricas como a SAA e fibrinogênio. A combinação destas proteínas hepáticas induzidas por TNF e de IL-1 e IL-6 (citocinas da imunidade inata) constituem a resposta de fase aguda a um estímulo inflamatório (64).

É conhecido que TNF- α induz o estresse oxidativo em alguns tipos celulares e que a adição de antioxidantes, redução da pressão de oxigênio (pO_2) ou a super-expressão de superóxido dismutase (SOD) aumenta a sobrevivência dessas células, sugerindo que os radicais de oxigênio estão envolvidos nos efeitos citotóxicos do TNF (70, 71).

5.5.3 Interleucina 1 beta (IL-1 β)

A principal função de IL-1 é agir como mediador da resposta inflamatória do hospedeiro contra infecções e outros estímulos inflamatórios. Existem duas formas de IL-1, denominadas IL-1 α e IL-1 β , apresentando pelo menos 30% de homologia uma com a outra. Ambas as formas ligam-se aos mesmos receptores de superfície celular e medeiam as mesmas atividades biológicas (72).

Os efeitos biológicos de IL-1 semelhantes ao de TNF- α dependem da quantidade de citocina liberada. Em baixas concentrações IL-1, atua como mediador local da inflamação, atuando sobre fagócitos mononucleares e endotélio vascular, aumentando ainda mais a síntese de IL-1 e induzindo a síntese de IL-6. IL-1 atua sobre células endoteliais aumentando a atividade pró-coagulante e a expressão de moléculas de superfície que medeiam a adesão leucocitária. Quando secretada em quantidades maiores, IL-1 entra na corrente sanguínea e exerce efeitos endócrinos. IL-1 sistêmica compartilha com o TNF- α a capacidade de causar febre, induzir a síntese de proteínas de fase aguda e iniciar a caquexia. Embora existam muitas semelhanças entre TNF- α e IL-1, IL-1 não ativa diretamente os leucócitos, mas faz com que os fagócitos mononucleares e as células endoteliais sintetizem quimiocinas que ativam os leucócitos, IL-1 também não causa dano tecidual, nem induz a apoptose, podendo apenas potencializar os danos causados por TNF- α . Mesmo em concentrações sistêmicas altas IL-1 não é letal e não compartilha com TNF- α a capacidade de aumentar a expressão de moléculas de MHC (64, 71).

5.5.4 Receptor Antagonista de IL-1 (IL-1ra)

O receptor antagonista de IL-1 (IL-1ra) é membro da família de IL-1 que se liga a receptores de IL-1, mas não induz nenhuma resposta intracelular. A produção de IL-1ra é estimulada por substâncias como citocinas, componentes virais e bacterianos. IL-1ra é produzida predominantemente por células hepáticas e apresenta características de uma proteína de fase aguda (64, 72).

Duas variantes estruturais foram descritas para IL-1ra: sIL-1ra, uma isoforma de 17-kDa que é secretada por monócitos, macrófagos, neutrófilos e outras células e icIL-1ra, uma isoforma de 18-kDa que permanece no citoplasma de células epiteliais, monócitos e fibroblastos (72).

O uso de anticorpos anti-IL-1ra tem demonstrado que IL-1ra endógena é uma proteína antiinflamatória natural importante em doenças como artrite, colite e doença granulomatosa pulmonar (72, 73).

5.6 Vias de sinalização para expressão de citocinas inflamatórias

Um dos primeiros eventos observados após a ativação de neutrófilos é a rápida indução de fosforilação de proteínas, a qual desempenha um papel essencial na regulação das funções dessas células. Neutrófilos estimulados com ésteres de forbol e fMLP apresentam ativação de diversas quinases, incluindo proteínas tirosina quinase (PTK), proteína quinase C (PKC), proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e proteínas quinases dependentes de cálcio/calmodulina (74).

Proteínas quinase ativadas por mitógeno (MAPKs) formam uma família de serina/treonina proteínas quinase envolvidas em diversas funções celulares como diferenciação, proliferação, movimento e morte celular. A cascata de sinalização das MAPK está organizada hierarquicamente em três módulos seguidos. MAPKs são fosforiladas e ativadas pelas MAPKs-quinases (MAPKKs), as quais são fosforiladas e ativadas pelas MAPKKKs. As MAPKKKs por sua vez são ativadas pela interação com pequenas GTPases e/ou proteínas quinases, conectando desta forma o módulo MAPK aos receptores de superfície celular ou estímulos externos. O esquema abaixo mostra um modelo geral para a ativação das diferentes cascatas que fazem parte da família das MAPKs (75).

Esquema 3: Modelo geral para a ativação de todas MAPKs (A) e das diferentes cascatas que fazem parte das MAPKs (B) (75).

Leucócitos respondem a estímulos extracelulares (como LPS, vírus, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{INF-}\gamma$) com ativação de serina/treonina proteínas quinases, que receberam a denominação de SAPK (stress activated protein quinase), também conhecidas como c-JNKs. Um outro membro da família MAPK é as p38 MAPKs, que assim como as c-JNKs, também são ativadas por diversos estímulos extracelulares como estresse, citocinas pro-inflamatórias como IL-1 e $\text{TNF-}\alpha$, choque por calor e hipermorosmolaridade. Mecanismos dependentes de cálcio também estão envolvidos na produção de citocinas (76, 77, 78).

Compostos derivados do pirimidilimidazol são antiinflamatórios e bloqueiam a produção de citocinas induzidas pelo TNF e por LPS, inibem a cadeia de quinases p38 MAPKs, mostrando a importância desta via na liberação de citocinas. A p38 MAPK parece ser a principal quinase envolvida na produção de IL-8, enquanto ERK e JNK são induzidas em associação para a expressão desta citocina (77).

Outra via importante na indução de citocinas é a das proteínas tirosina quinase (PTK). PTK participam na transcrição e processamento de muitos sinais extra e intracelular são críticas na regulação de fatores de crescimento, diferenciação e estão intensamente envolvidas com oncogêneses (74).

Tem sido demonstrado que estímulos que agem via receptor de tirosina quinase ativam o *burst* oxidativo de neutrófilos. Existem algumas evidências da importância da PI-3K na quimiotaxia, mudança de forma de neutrófilos e ativação da MAPK. PI-3K ativa a proteína quinase B/Akt a qual é um importante componente da maquinaria de sobrevivência da célula. Akt leva a fosforilação do I κ B, com ativação do NF- κ B (75).

5.6.1 Sinalização via fator de transcrição NF- κ B

A expressão de citocinas em diversos tipos celulares é dependente da ativação de fatores de transcrição tal como o fator nuclear κ B (NF- κ B). Esta mesma via opera em neutrófilos, onde foi bem caracterizada (79). NF- κ B é um complexo multiproteico que pode ativar uma grande variedade de genes envolvidos em reações de defesa primária de organismos superiores (80). Sua principal função é induzir rápida e coordenadamente os genes pró-inflamatórios em resposta a estímulos patogênicos externos (81). Em células não estimuladas, NF- κ B se encontra no citoplasma em um complexo inativo pela ligação a uma subunidade inibitória chamada I κ B. Estímulos patogênicos provocam a liberação de I κ B (82) e a conseqüente entrada do NF- κ B no núcleo, que se liga aos elementos controles do DNA, induzindo assim, a síntese de mRNA.

A ativação de NF- κ B é rapidamente aumentada por uma grande variedade de agentes, incluindo as citocinas IL-1 e TNF, vírus, LPS, ésteres de forbol, luz UV e radiações ionizantes (80).

Baixas concentrações de H₂O₂ ativam NF- κ B e vários antioxidantes testados não somente suprimem a ativação de NF- κ B por H₂O₂, mas também por todos os outros indutores até então testados. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio formadas no citoplasma após estimulação de células parecem servir como segundos mensageiros para regular positivamente a expressão gênica de citocinas. Dentre as diversas citocinas a expressão da IL-8 parece ser particularmente sensível a mudanças na concentração de espécies reativas de oxigênio (79, 83, 84)

Esquema 4: Representação esquemática da ativação de NF- κ B.

5.6.2 Sinalização via receptores de superfície celular associado à proteína G triméricas

As proteínas G fazem parte de uma grande família de proteínas envolvidas na sinalização para hormônios, mediadores lipídicos, fatores de crescimento, citocinas entre outras substâncias com funções biológicas diversas, podendo estar ligadas a receptores de membrana (receptores acoplados a proteína G heterodimérica) ou solúveis no citoplasma como a Ras e Rac que são recrutadas nos caminhos de sinalização por proteínas adaptadoras (85).

Os receptores acoplados a proteína G heterodiméricas (triméricas), também conhecidos como de sete-hélices ou de serpentina possuem três subunidades, α , β , e γ e são formados por uma superfamília dividida em subfamílias de acordo com as diferentes classes de ligantes. Estima-se que existam cerca de mil receptores diferentes associados a proteína G, sendo reconhecidas 23 diferentes cadeias α , 6 cadeias β e 12 cadeias γ , codificadas, por pelo menos, 17 genes diferentes (85).

Atualmente as proteínas G triméricas são classificadas principalmente como: G_s estimulam a adenilato ciclase; G_i inibem a adenilato ciclase; G_q estimulam outras proteínas efetoras de membrana, as fosfolipases, que hidrolizam os fosfolípidos de membrana gerando outros tipos de segundos mensageiros; G_o/G_i que regulam a abertura e fechamento de canais de K^+ , Ca^{+2} e Na^+ e ativam a tirosina quinase;

G_{11}/G_{12} cujas proteínas efetoras ainda não são totalmente conhecidas; G_{13} que estimula mudanças nos canais iônicos e rearranjos no citoesqueleto; G_{olf} que são ativadas por moléculas odorante e ativam a adenilato ciclase e G_t ativadas pela luz e cujos efetores são fosfodiesterases de cGMP (86).

Em neutrófilos a ativação da fosfolipase C- β pela G_{aq} resulta na clivagem de fosfolipídios de membrana gerando segundos mensageiros como diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3). O diacilglicerol pode ser clivado para liberar ácido araquidônico e também ativar a PKC. A PKC ativa induz a fosforilação do I κ -B que libera o NF- κ B para ativar a transcrição de genes específicos, também pode ativar a MAPK que ativa a proteína ELK-1 que liga-se ao DNA para iniciar a transcrição, além de poder fosforilar os componentes $p47^{phox}$ e $p67^{phox}$ do sistema NADPH oxidase (39, 74).

A ligação de um agonista a proteína G_{as} , leva à estimulação da adenilato ciclase com aumento do cAMP, este ativa a PKA.

Resumindo, os receptores acoplados a proteína G normalmente iniciam uma ou mais seqüências de reações bioquímicas efetuadas por interações do tipo proteína-proteína que chegam a traduzir o sinal até o núcleo, onde normalmente, a última reação é uma interação do tipo proteína-ácido nucleico, resultando em alteração de expressão gênica.

5.7 Diabetes e fagócitos

Diabetes mellitus é uma síndrome caracterizada por anormalidade no metabolismo e hiperglicemia devido à deficiência na secreção de insulina e/ou resistência à insulina. Pode ser classificada em diversos tipos abrangendo duas grandes classes as primárias e as secundárias. As primárias são classificadas como Tipo 1 e Tipo 2 e as secundárias ocorrem em decorrência de outras doenças associadas como pancreatite crônica, tumores hormonais, hemocromatose, drogas, etc (87).

O diabetes mellitus primária representa um grupo heterogêneo de desordens sendo a hiperglicemia uma característica comum aos tipos. O diabetes Tipo 1 é caracterizado por destruição das células beta pancreáticas predominantemente por processos autoimunes é geralmente condicionada geneticamente, ou desencadeada

por vírus ou drogas. O diabetes Tipo 2 está frequentemente associada à obesidade e/ou à idade. O paciente apresenta resistência periférica à insulina e falência gradual das células beta pancreáticas. Neste caso a causa primária é desconhecida. Pode ocorrer: diminuição do número de receptores para insulina, secreção de insulina com defeito e sem ação metabólica e alterações pós-receptores (intracelulares) (87).

Pacientes diabéticos são mais susceptíveis a infecções apresentando altos índices de mortalidade e morbidade. A correlação entre susceptibilidade a infecções e controle na concentração glicêmica mostra que a falta de controle principalmente na presença de cetoacidose, esta associada à baixa resistência a infecções devido em parte à deficiência nas funções de leucócitos (88-94). Neutrófilos de pacientes diabéticos apresentam uma produção maior de ROS no estado basal e menor quando as células são estimuladas quando comparado com controle (88, 89, 90). Outras deficiências como redução na quimiotaxia (91), na liberação de enzimas lisossomais (92) e diminuição na longevidade aumentando o clearance de neutrófilos (93, 94) são também reportados como causadores da maior susceptibilidade a infecções apresentada nestes pacientes. É conhecido que pacientes diabéticos têm aumento nas concentrações séricas de NO, IL-8 e TNF- α , aumento das concentrações séricas basais de SAA (10), migração e quimiotaxia espontânea de leucócitos, aumento na expressão de CD11a, CD11b e CD18.

A toxicidade da glicose, quantidade excessiva de radicais livres e decréscimo nas propriedades antioxidantes, devido à deficiência de vitamina C, E e bilirrubina, por exemplo, são reportados como causadores das complicações crônicas dos pacientes com diabetes. Espécies reativas de oxigênio produzidas por neutrófilos podem danificar não somente o DNA, mas também a dupla camada lipídica celular, as quais por sua vez causam complicações vasculares nestes pacientes (95). As complicações podem ocorrer na microvasculatura (retinopatia e nefropatia), ou na macrovasculatura (insuficiência coronariana) (96, 97, 98).

As concentrações séricas basais de SAA em doenças crônicas como diabetes (10), arteriosclerose (16, 17), reumatismo (8) e Alzheimer (9) apresentam-se aumentados, este fato sugere a existência de um modulador endógeno constante para esses pacientes, uma vez que SAA exerce um efeito pró-inflamatório estimulando a síntese e liberação de citocinas como IL-8, TNF- α e IL-1 β em neutrófilos e monócitos humanos (1, 2, 3, 4). Por exemplo, o aumento na expressão de IL-8 causado por SAA pode implicar em fatores pró-inflamatórios como lesão de

tecidos, angiogênese e recrutamento de neutrófilos (64, 66, 68). Um estudo mostrou que altas concentrações de glicose podem levar a indução de SAA3 no tecido adiposo *in vivo*, assim com em células adiposas (99), outro dado interessante é que além das concentrações séricas de SAA estarem aumentadas em pacientes com diabetes, existe uma correlação positiva da concentração de SAA sérica com a concentração de microalbuminúria urinária em pacientes com complicações renais decorrentes do diabetes (10).

OBJETIVOS

6 Objetivos

O objetivo geral deste projeto foi estudar as vias de sinalização ativadas por SAA para a liberação de citocinas pró-inflamatórias, o efeito de SAA sobre o *priming* de neutrófilos e a função da SAA na progressão do diabetes mellitus.

Desta forma, nossos objetivos específicos foram:

- (1) Avaliar através do uso de inibidores da MAPK, PI3K, NF- κ B e da proteína G_i o caminho envolvido na cascata de sinalização para a liberação das citocinas IL-8 e TNF- α promovida por SAA em neutrófilos.
- (2) Avaliar o efeito de SAA sobre o *priming* de neutrófilos
- (3) Avaliar em neutrófilos de pacientes com DGC, a resposta a LPS e SAA sobre a liberação de TNF- α e IL-8 e verificar as concentrações séricas de SAA e IL-8.
- (4) Avaliar em pacientes diabéticos a resposta a LPS e SAA sobre a liberação das citocinas IL-8, TNF- α , IL-1 β e IL-1ra em neutrófilos e células mononucleares.
- (5) Verificar se neutrófilos e células mononucleares de pacientes diabéticos com complicações diabéticas crônicas respondem a SAA de forma diferente de pacientes diabéticos sem complicações e por fim comparar as concentrações séricas de SAA, IL-8, TNF- α , IL-1 β e IL-1ra entre os grupos.
- (6) Avaliar em pacientes diabéticos a resposta a fMLP e SAA de neutrófilos e células mononucleares sobre a migração celular.
- (7) Avaliar o efeito o aumento da osmolaridade sobre a liberação de IL-8, TNF- α , IL-1 β e IL-1ra de neutrófilos e células mononucleares.

MATERIAL E MÉTODOS

7 Material e Métodos

7.1 Casuística do estudo com DGC

Devido ao fato da DGC ser uma doença rara, foram estudados somente dois pacientes com DGC. Nos dois casos, temos herança ligada ao cromossomo X, com deficiência na expressão de gp91^{phox}. A caracterização do tipo de deficiência foi realizada por ensaios moleculares realizados pelo grupo do Prof. Dr. Antônio Condino-Neto do Departamento de Pediatria da UNICAMP. Também foi incluso no estudo um grupo de indivíduos sadios como controle (n=10).

7.2 Casuística do estudo com pacientes diabéticos

Foram inclusos no grupo 33 pacientes com diabetes mellitus Tipo 2 não insulino dependentes de ambos os sexos. Foram analisados 18 pacientes com diabetes mellitus sem complicações clínicas manifestas (DM) e 15 pacientes com complicações microvasculares avançadas (DMC). Também foi incluso um grupo de 15 indivíduos sadios como controle.

Critérios de inclusão: Foram selecionados pacientes diabéticos (segundo os critérios estabelecidos pela *American Diabetes Association*) com tempo conhecido de doença superior a 8 anos, de ambos os sexos e sem distinção de raça. Nos pacientes diabéticos com complicações, a retinopatia foi caracterizada pelo fundo de olho com retinopatia pré-proliferativa, proliferativa ou tratada com laser. A nefropatia foi caracterizada pela proteinúria de 24 horas persistentemente superior a 0,5g/24h. Os pacientes foram pareados pela idade e tempo conhecido da doença (88,93).

Critérios de exclusão: Foram excluídos do estudo pacientes com alergias, infecção, inflamação, viroses ou tomando anti-agregantes plaquetários, assim como gestantes e pacientes realizando hemodiálise.

O grupo controle foi selecionado também pela faixa etária, uma vez que as funções de neutrófilos são alteradas com o aumento da idade. De todos os pacientes foi anotada a idade, sexo, tempo de conhecido de doença (tabela 1) e medicação (Anexo I) para comparação.

Tabela 01: A tabela mostra a relação entre o sexo masculino (M) e feminino (F), a idade média dos grupos $\pm$ o desvio padrão e o tempo conhecido de diabetes entre os grupos estudados.

	Sexo (M:F)	Idade (média $\pm$ sd)	Tempo conhecido de diabetes (média $\pm$ sd)
Controle	6:9	59 $\pm$ 16	---
DM	6:12	61 $\pm$ 13	12 $\pm$ 5
DMC	8:7	57 $\pm$ 14	16 $\pm$ 8

Cada paciente foi esclarecido sobre o projeto de pesquisa e forneceu consentimento formal para a participação no estudo. O estudo foi aprovado pelo conselho de ética do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (anexo II) e pelo conselho de ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (anexo III). Seguem em anexo os modelos do termo de consentimento pós-informação (anexo IV) e a ficha de identificação dos pacientes no projeto de pesquisa (anexo V), preenchidas pelo paciente e pelos médicos envolvidos respectivamente no Hospital Universitário.

7.3 Material

7.3.1 Reagentes

Os reagentes dextran, Histopaque^R (d = 1,077), lipopolissacarídeo de *E.coli* sorotipo, 026:B6, L-glutamina, Hepes, meio de cultura RPMI 1640 estreptomicina, penicilina, soro fetal bovino, EDTA, glicose, acetato de forbol miristato (PMA), luminol e zimosan foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Da empresa Merk (Darmstadt, Alemanha) obtivemos bicarbonato de sódio, cloreto de sódio, fosfato de sódio dibásico, fosfato de potássio monobásico, cloreto de potássio e dimetilsulfóxido (DMSO). Os inibidores PD98059, SB203580 e wortmanina foram obtidos da Calbiochem-Novabiochem Corporation (La Jolla, CA). Os *kits* DuoSet para determinação por ELISA das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-1ra e IL-8 foram adquiridos da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). As dosagens de SAA foram realizadas através de kit comercial (Tridelta, Maynooth Co. Kildare). Soro fetal bovino foi adquirido da GIBCO BRL - Life Technologies. Heparina foi adquirida da Roche. Recombiante humano de amilóide sérica A (SAA) da Prepro Tech Inc (Rocky Hill, NJ).

7.3.2 Equipamentos

Autoclave vertical modelo 103 FABBE-PRIMA; balança analítica AG204 Mettler Toledo; banho maria 37°C com agitador orbital, modelo 102/109. 089, FANEN; centrífuga de bancada, Incibrás, modelo IV rotor swing; centrífuga refrigerada Himac CR 20B2 Hitachi, rotor RPR 20-2; estufa de CO₂ com controle de temperatura e pressão, Harris, modelo CNW300a; leitor de Elisa, modelo SLT-Spectra; luminômetro EG&G Berthorl LB 96V de microplaca; microscópio óptico modelo 81186 da Nikon; oxígrafo da "Yellow Springs Instruments", modelo 5300; pHmetro Micronal B374; sonificador Cole-Parmer 8853.

7.4 Métodos

7.4.1 Preparo de soluções

Solução estoque de luminol (1,0 mM) foi obtida pela dissolução deste em água deionizada, a adição de NaOH foi necessária para solubilização do mesmo. A solução foi armazenada a -20°C. Amilóide sérica A (SAA) 1,0 mg, liofilizada, foi ressuspensa em água deionizada 1,0 mL, aliquoteada e estocada a -20°C. Solução estoque de LPS foi feita a partir da solubilização deste em solução salina (NaCl 0,9%) e mantida a -20°C. Solução estoque de fMLP (0,057M) foi obtida pela dissolução deste em DMSO e armazenada a -20°. Solução estoque de PMA foi preparada através da diluição deste em DMSO (100 µM/mL). Tampão fosfato salino (PBS) foi preparado na concentração de 0.1M em pH7.4. Todos os reagentes e soluções foram preparados utilizando procedimentos e materiais livre de contaminação por endotoxina.

7.4.2 Preparo do zimosan

Zimosan (500 mg) foi diluído em 50 mL de tampão PBS. A mistura foi fervida por uma hora sob agitação, depois de deixada esfriar e sonicada em quatro ciclos de 15 segundos cada, com um intervalo de 15 segundos a 70W. Após este procedimento foi centrifugada a 500 rpm por 5 minutos, a 4°C, lavada três vezes com PBS (2000 rpm, 20 min, 4°C), ressuspensa em 50 mL de PBS (10 mg/mL) e estocada a -70°C.

A opsonização do zimosan foi realizada misturando-se 6,0 mL de uma mistura de soro humano fresco com 2,0 mL de zimosan (10 mg/mL). A mistura de zimosan e soro foi incubada a 37°C por uma hora com agitação constante. Após este procedimento centrifugou-se a 2000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi desprezado. O sedimento foi então lavado três vezes com tampão PBS, após a última lavagem, o sedimento foi resuspenso em 1,0 mL de tampão PBS, as partículas foram contadas e congeladas a -20°C por até uma semana.

7.4.3 Isolamento de neutrófilos

Neutrófilos (PMN) foram obtidos a partir de sangue periférico de doadores voluntários e coletado em heparina (10UI/ml de sangue). Neutrófilos foram isolados pelo método descrito por Boyum (100). Sangue (10mL) foi diluído v:v com PBS Dulbecco 10 mM a pH 7.4 contendo 100mM CaCl_2 , 50 mM MgCl_2 e glicose 1mg/mL e cuidadosamente adicionado sobre 5mL de um gradiente comercial Ficoll-Hypaque (Histopaque^R; $d=1.077$). O tubo foi centrifugado a 2500 rpm a temperatura ambiente por 20 minutos. O sobrenadante, rico em células mononucleares foi descartado, e 10 mL de dextran 5% foi adicionados ao sedimento. O tubo foi homogenizado e mantido por 30 minutos a temperatura ambiente para permitir a sedimentação de eritrócitos. O sobrenadante resultante, rico em granulócitos, foi recuperado, lavado com PBS e novamente centrifugado a 2500 rpm, a temperatura ambiente por 5 minutos. Após, o *sedimento* foi submetido a tratamento hipotônico com 10mL de água destilada gelada para promover a lise de eritrócitos contaminantes. Após 1 minuto, a isotonicidade foi reestabelecida pela adição de 2,5 mL de NaCl 2.7% e 7,5 mL de PBS e novamente o tubo foi centrifugado a 2500 rpm a temperatura ambiente por 5 minutos. O sedimento foi ressuspensão em meio de cultura. As células foram contadas em câmara de Neubauer para posterior cultura. Todos os procedimentos foram realizados utilizando reagentes e materiais livres de endotoxina.

7.4.4 Isolamento de células mononucleares

Células mononucleares (PBMC) foram obtidas a partir de sangue periférico, coletado em heparina (10UI/mL de sangue), de doadores voluntários. Sangue (10mL) foi diluído v:v com PBS Dulbecco 10 mM a pH 7.4 contendo 100mM CaCl_2 , 50 mM MgCl_2 e glicose 1mg/mL e cuidadosamente adicionado sobre 10mL de um gradiente comercial Ficoll-Hypaque (Histopaque^R; $d=1.077$). O tubo foi centrifugado a 2500 rpm a temperatura ambiente por 20 minutos. O sobrenadante, rico em células mononucleares foi coletado e foram adicionados 40mL de tampão PBS ao tubo. O tubo foi homogenizado e centrifugado a 1800 rpm a temperatura ambiente por 10

minutos, ao sedimento novamente foi adicionado 40 mL de tampão PBS e centrifugado a 2500 rpm a temperatura ambiente por 10 minutos, esta última etapa de lavagem foi novamente repetida e ao final o sedimento foi ressuspensão em meio de cultura. As células foram contadas em câmara de Neubauer. Todos os procedimentos foram realizados utilizando reagentes e materiais livres de endotoxina.

7.4.5 Cultura de neutrófilos e células mononucleares

O meio de cultura utilizado foi RPMI 1640 suplementado com Hepes 2,32g/L, L-glutamina 0.3g/L, bicarbonato de sódio 2.0g/L, estreptomicina 100µg/mL, penicilina 100UI/mL e 10% soro fetal bovino. O meio foi filtrado em 0.22µm (Millipore-Sigma) e acondicionado em frasco de vidro previamente esterilizado. Todo o procedimento foi realizado em fluxo laminar. Neutrófilos (2.5×10^6 células/mL) ou células mononucleares (1.5×10^6 células/mL) foram mantidas em placas Nunc® de fundo chato e foram submetidos a 2, 18 ou 24 horas de cultura em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Células foram incubadas na presença de estímulos e inibidores desejados. O material submetido a cultura foi recolhido e centrifugado em frasco de plástico estéril de 0.5mL a 500g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante livre de células foi coletado e submetido a congelamento em tubos cryogênicos a -80°C até o momento do ensaio de quantificação de citocinas.

7.4.6 Consumo de oxigênio de neutrófilos

Neutrófilos (2.5×10^6 células/mL) foram incubados com SAA por 5 minutos e ativados em seguida com fMLP, zimosan opsonizado e zimosan não opsonizado em diferentes concentrações. O consumo de oxigênio foi acompanhado utilizando um oxígrafo Yellow Spring. O controle positivo deste ensaio foi feito com PAF. O protocolo utilizado foi essencialmente o descrito por Konderman *et al.*, 1989 (101).

7.4.7 Medidas de emissão de luz por quimioluminescência

O Efeito de SAA no *burst* respiratório de neutrófilos foi avaliado através do ensaio de quimiluminescência na presença de luminol (1×10^{-5} M). Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados com SAA por 5 minutos e ativados em seguida com zimosan opsonizado e zimosan não opsonizado em diferentes concentrações à temperatura de 37°C.

7.4.8 Incubação de neutrófilos com SAA e alguns inibidores da cascata de sinalização

Os inibidores selecionados e suas concentrações foram: PD 98059 (inibidor da MEK, 50 μ M), SB 203580 (inibidor da P38 MAPK, 10 μ M), wortmanina (inibidor da PI-3K, 100 nM) (104, 105, 106, 107).

Estes compostos foram solubilizados em DMSO (wortmanina, PD98059 e SB203580) e adicionados 15 minutos antes da adição de SAA ou LPS. As células foram mantidas em cultura de 2 e 24 horas e os valores de citocinas foram comparados aos valores obtidos na ausência dos inibidores. A concentração de DMSO foi menor que 0,1% por ensaio. Esta quantidade de DMSO não afetou a quantidade de IL-8 e TNF- α mensurados (84).

7.4.9 Incubação de neutrófilos com SAA ou LPS e alguns inibidores de NF- κ B

Os inibidores selecionados e suas concentrações foram: L- cisteína (0,3 mM), dexametasona (1,0 μ M/ensaio), 2-mercaptoetanol (14 mM/ensaio) e glutatona (10 mM/ensaio).

Estes compostos foram solubilizados em solução aquosa e adicionados 15 minutos antes da adição de SAA ou LPS. As células foram mantidas em cultura de 24 horas e os valores de citocinas foram comparados aos valores obtidos na ausência dos inibidores.

7.4.10 Incubação de neutrófilos com SAA ou LPS e toxina pertussis

Diferentes concentrações de toxina pertussis (1,0 - 1000 ng/mL) foram adicionadas 1 hora antes da adição de SAA ou LPS. As células foram mantidas em cultura de 24 horas e após determinou-se os valores de IL-8 do sobrenadante das culturas celulares.

7.4.11 Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi determinada com azul de Trypan (0,1%). Amostras de células (20 μ L) foram resuspendidas em tampão PBS e misturadas a 20 μ L da solução de azul de Trypan. A mistura foi colocada em lamínula e observada no microscópio (aumento de 40 vezes). A integridade da membrana foi avaliada pela não entrada do corante na célula.

7.4.12 Determinação de citocinas

Citocinas foram mensuradas por imunoensaio quantitativo. As determinações de IL-8, TNF- α , IL-1 β e IL-1ra foram realizadas através de placas de ELISA montadas e padronizadas a partir de *kits* DuoSet da R&D System (Minneapolis, MN, USA).

Para a padronização dos métodos de dosagem e determinação das citocinas comparamos três tipos de placas, placas para cultura Nunc de fundo chato, placas Maxisorp (cod. 442404, Nunc-Immuno Module) e placas Polysorp (cod. 469957, Nunc-Immuno Module). Optamos por trabalhar com a placa Polysorp onde obtivemos uma melhor relação entre a absorbância e a concentração das citocinas na construção da curva padrão. Abaixo demonstramos dois modelos de curvas obtidas com a padronização dos kits para dosagem de IL-8 (a) e TNF- α (b), utilizando a placa Polysorp (Figura 1). O preparo das placas e o procedimento de medida são descritos abaixo.

Figura 1: Modelos de curvas obtidas com a padronização dos kits para dosagem de IL-8 (a) e TNF- α (b), utilizando placa Polysorp.

O princípio básico do teste é a imobilização de um dos reagentes em uma fase sólida, enquanto outro reagente pode ser ligado a uma enzima, com preservação tanto da atividade enzimática como da imunológica do antígeno. No nosso caso, a fase sólida, ou seja, o anticorpo de captura é formado por anti-TNF- α , IL-8, IL-1 β ou IL-1ra humana (dependente do ensaio), diluída em PBS e o anticorpo de detecção utilizado foi anti-TNF- α , IL-8, IL-1 β ou IL-1ra humano biotilada (dependente do ensaio). Na revelação da reação utilizamos estreptavidina conjugada com peroxidase de raiz forte (HRP) (diluição 1:200 com o reagente diluente). O substrato utilizado foi uma mistura 1:1 de H₂O₂ e tetrametilbenzidina (TMB). A reação foi terminada pela adição de H₂SO₄ (2N). A leitura foi realizada em 450 nm e uma leitura de correção em 540 nm. A leitura de correção foi importante para eliminar qualquer interferente presente na placa.

O procedimento abaixo é igual para a dosagem de TNF- α , IL-8, IL-1 β ou IL-1ra, mudando apenas as concentrações finais dos anticorpos que esta indicada na tabela 2.

	Concentração de uso			
	IL-8	TNF- α	IL-1 β	IL-1ra
Ac. captura	4 μ g/mL	4 μ g/mL	4 μ g/mL	10 μ g/mL
Ac. detecção	20ng/mL	300ng/mL	0,1pg/mL	0,1pg/mL

Preparo da Placa:

1. O anticorpo de captura foi diluído em PBS, na concentração final desejada. Foram colocados 100 μ L do anticorpo diluído por poço, a placa foi coberta e incubada por 20 horas a temperatura ambiente.
2. No dia seguinte, os poços foram aspirados e lavados com tampão de lavagem (0,05% Tween 20 em PBS, pH 7.4) três vezes seguidas. Cada lavagem contendo 400 μ L do tampão. Todo o tampão foi removido após a última lavagem.
3. As placas foram bloqueadas adicionando 300 μ L de tampão bloqueador (1% de BSA, 5% de sucrose em PBS com 0,05% de NaN₃). As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 1 hora.
4. As lavagens e aspirações foram repetidas e as placas foram secas à vácuo.

Procedimento de dosagem:

1. Quando necessário fizemos a diluição de amostras ou padrões com o reagente diluente (0,1% de BSA, 0,05% Tween 20 em tampão Tris-salina, pH 7.4).
2. 100 μ L de amostra foi colocada por poço. As placas foram cobertas com fita adesiva e incubada por 2 horas a temperatura ambiente.
3. As aspirações e lavagens do passo dois da preparação das placas foram repetidas
4. 100 μ L do anticorpo de detecção diluído no reagente diluente foi adicionado. A placa foi coberta novamente com fita adesiva e incubada por duas horas a temperatura ambiente.

5. As aspirações e lavagens do passo 2 da preparação das placas foram repetidas
6. Foi adicionado 100 μ L de estreptavidina-HRP (diluída 1:200 no reagente diluente), e a placa foi incubada 20 minutos a temperatura ambiente evitando luz direta.
7. As aspirações e lavagens do passo 2 da preparação das placas foram repetidas
8. Foi adicionado 100 μ L da solução substrato em cada poço e a placa incubada durante 20 minutos a temperatura ambiente evitando luz direta. A solução substrato foi preparada diluindo-se o reagente colorido A (H₂O₂) e o reagente colorido B (tetrametilbenzidina) na proporção 1:1.
9. Foi adicionado 50 μ L da solução *stop* (H₂SO₄, 2N) em cada poço e homogeneizando.
10. A densidade óptica das placas foi determinada imediatamente a 450/550 nm.
11. Os resultados foram expressos através da construção de uma curva padrão linear com oito pontos, de concentrações conhecidas. A linearidade na determinação de IL-8 foi considerada de 50 pg/mL até 2000 pg/mL, para TNF- α o método foi considerado linear em concentrações entre 12,5 pg/mL até 1000 pg/mL, para IL- β de 19,5 pg/mL até 2500 pg/mL e para IL-1ra de 1,9 pg/mL até 250 pg/mL

7.4.13 Determinação de SAA

As dosagens de SAA foram realizadas em soro através de *kit* comercial (Tridelta, Maynooth Co. Kildare). O princípio do teste é a imobilização de um dos reagentes em uma fase sólida, enquanto outro reagente é ligado a uma enzima, com preservação da atividade enzimática e imunológica do antígeno. No nosso caso, a fase sólida foi formada por um anticorpo monoclonal específico para SAA. Na revelação da reação utilizamos anticorpo monoclonal anti-SAA biotilado. O substrato utilizado foi uma mistura de streptavidina-peroxidase e tetrametilbenzidina (TMB). A reação foi terminada pela adição de solução *stop*. A leitura foi realizada em 450 nm e uma leitura de correção em

650 nm. As amostras de soro utilizadas nas dosagens foram coletadas e estocadas a -80°C até o momento da determinação.

7.4.14 Migração celular

Os ensaios de migração celular foram efetuados segundo princípio de Boydem, 1962, (102). Utilizamos placas com múltiplas câmeras de duplos compartimentos, ChemoTx, Neuro Probe (Gaithersburg, MD). Nos compartimentos inferiores de cada câmera foram colocados 29 μL de fator quimiotático diluído em PBS com 0,01% de albumina. As suspensões de neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) e células mononucleares ($1,5 \times 10^6$ células/mL) foram colocadas nos compartimentos superiores, em volumes de 25 μL . Nos compartimentos inferiores foram colocados os estímulos quimiotáticos diluídos em solução de PBS com 0,01% de albumina. Como fator quimiotático clássico utilizamos fMLP.

Após incubação das câmaras por 60 minutos para neutrófilos e 120 minutos para células mononucleares em atmosfera úmida a 37°C foi realizada a contagem do número de células que migraram em câmera de Neubauer.

7.4.15 Análise estatística dos dados

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média ou média $\pm$ desvio padrão, de no mínimo três experimentos. As análises foram realizadas através de comparações entre o grupo controle e os grupos que receberam os diferentes tratamentos, dependendo do ensaio. O tipo de teste utilizado dependeu do comportamento dos resultados amostrais e do tamanho da amostra. Dado que nossos resultados foram paramétricos, aplicamos os testes Student-Neuman-Keus ou teste-t.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

8 Resultados e Discussão

Visando o melhor entendimento do leitor, os resultados e a respectiva discussão foram agrupados em seis partes.

- (I) Vias de sinalização ativadas por SAA para a liberação de citocinas inflamatórias.
- (II) Efeito de SAA sobre o *priming* de neutrófilos.
- (III) Função da SAA na liberação de IL-8 e TNF- α por neutrófilos na doença granulomatosa crônica.
- (IV) SAA como um possível elo entre diabetes mellitus Tipo 2 e complicações vasculares decorrentes da doença.
- (V) SAA como um possível marcador do estado inflamatório sub-clínico no diabetes mellitus Tipo 2.
- (VI) Um achado ao acaso: Influência imunomodulatória da solução hiperosmolar de NaCl sobre a liberação de IL-8, TNF- α , IL-1 β e IL-1ra de neutrófilos e células mononucleares

8.1 Vias de sinalização ativadas por SAA para a liberação de citocinas inflamatórias

Vários pontos são relevantes quando consideramos que a SAA é um estímulo potente para a liberação de citocinas a partir de neutrófilos. Nesta primeira parte do trabalho, realizamos uma primeira incursão na questão da sinalização celular para produção de citocinas em resposta a SAA. Dessa forma selecionamos alguns inibidores para a PI-3K, MEK, p38 MAPK, um antagonista da proteína G_i que medeia a ativação de receptores associados a ela e inibidores do fator de transcrição NF- κ B.

8.1.1 Resultados

8.1.1.1 Efeito de inibidores da MAPK e PI3K na liberação de IL-8 e TNF- α de neutrófilos humanos.

A figura 2 mostra o efeito de wortmanina, PD98059 e SB 203580 em resposta a liberação de IL-8 (Figura 2A) e de TNF- α (Figura 2B) induzida por SAA.

Para IL-8 foram utilizados sobrenadantes de culturas após 24 horas de incubação de neutrófilos com SAA (Figura 2A), enquanto que para TNF- α foram utilizados sobrenadantes obtidos após 2 horas de incubação (Figura 2B). A escolha destes tempos deveu-se aos resultados obtidos pelo grupo onde foi observado que a liberação de IL-8 só era vista após tempos longos de incubação enquanto que para TNF- α há um efeito inicial. Em todos os casos foi observado inibição das citocinas frente a concentrações usuais de wortmanina, PD98059 e SB 203580.

Figura 2: Efeito da wortmanina (100nM), PD98059 (50 μ M) e SB203580 (10 μ M) na liberação de IL-8 (A) e TNF- α (B) de neutrófilos estimulados. Os neutrófilos (2.5×10^6 células/mL) foram pré incubados com o inibidor durante 15 minutos e então adicionado SAA (17 μ g/mL) e incubados por 2 horas para a quantificação de TNF- α e 24 horas para quantificação de IL-8. Os dados provém de 5 experimentos e são referentes a média $\pm$ SD. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

8.1.1.2 Efeito dos inibidores do NF- κ B na liberação de IL-8, TNF- α de neutrófilos humanos.

As figuras 3 e 4 mostram o efeito de dexametasona, 2-mercaptoetanol e glutatona na liberação de IL-8 e TNF- α respectivamente de neutrófilos estimulados com LPS e SAA após incubação de 24 horas. A figura 4 mostra também o efeito de L-cisteína para TNF- α . Observamos que em todos os casos em maior ou menor grau ocorreu inibição da liberação das citocinas

Figura 3: Efeito da dexametasona (1,0 μ M), 2-mercaptoetanol (14 mM) e glutatona (10 mM) na liberação de IL-8 de neutrófilos estimulados com LPS (2,0 μ g/mL) ou SAA (17 μ g/mL) após incubação de 24 horas. Os dados são de 3 experimentos e são referentes a média $\pm$ SD. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Figura 4: Efeito de L -cisteína (0,3mM), dexametasona (1,0 μ M), 2-mercaptoetanol (14 mM) e glutatona (10 mM) na liberação de TNF- α de neutrófilos estimulados com LPS (2,0 μ g/mL) ou SAA (17 μ g/mL) após incubação de 24 horas. Os dados são de 3 experimentos e são referentes a média $\pm$ SD. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

8.1.1.3 Efeito da toxina pertussis na liberação de IL-8 de neutrófilos humanos

A participação da proteína G (tipo Gi) e, portanto FPRL1 na indução de citocinas por SAA foi avaliada pelo efeito da toxina pertussis na expressão e liberação de IL-8. Observamos uma forte inibição na liberação da IL-8 mesmo em concentrações tão baixas quanto 1 ng/mL (Figura 5).

Figura 5: Efeito da toxina pertussis (TP) (1 – 1000 ng/mL) na liberação de IL-8 de neutrófilos estimulados com LPS (2,0 µg/mL) ou SAA (17 µg/mL) após incubação de 24 horas. Os dados são de 3 experimentos e referentes a média ± SD. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

8.1.2 Discussão

Esperando que SAA exerça um importante papel na patogenia de doenças inflamatórias, é importante elucidar os mecanismos pelos quais a ação indutora de SAA age na célula. A cascata de sinalização iniciada por SAA ainda não é totalmente conhecida. Atualmente sabe-se que SAA induz a migração de monócitos e neutrófilos, através de uma elevação transiente na concentração de cálcio citoplasmático envolvendo a proteína quinase C (103).

A mobilização de Ca^{+2} e quimiotaxia induzida por SAA em neutrófilos se dá através do receptor FPRL1, um receptor que atua via proteína G (tipo Gi) e é inibido pela toxina pertussis (35, 103). Toxina Pertussis inibe a produção de IL-8 induzida em neutrófilos por fMLP. Neste caso a inibição da produção de IL-8 pode ser vista tanto para as contrações de mRNA expressas quando para a liberação da proteína (67). Diferenças na inibição de IL-8 pela toxina pertussis quando neutrófilos são estimulados por SAA ou fMLP, ou LPS poderiam se originar dos diferentes perfis temporários para essas citocinas com estes diferentes estímulos. Por exemplo, a cinética de produção de IL-8 induzida por LPS compreende 2 fases, na primeira, a liberação de IL-8 é induzida diretamente pelo estímulo, na segunda fase, o aumento de IL-8 ocorre devido à prévia liberação de $\text{TNF-}\alpha$ e IL-1 β .

Em neutrófilos, membros da família MAPK são fosforilados em resposta a diversos estímulos extracelulares e exercem função chave na indução de IL-8 por LPS. Neste trabalho utilizamos inibidores de duas vias, MAPK e PI3K, para verificar se SAA é capaz de ativa-las.

Wortmanina, um metabólito fúngico com potente atividade antiinflamatória é inibidor seletivo da PI-3K, capaz de bloquear a estimulação por formil peptídeos inibir a fagocitose, o *burst* respiratório e a exocitose causados pela ativação da PI3K em neutrófilos (104, 105, 106).

Compostos pirimidil imidazólicos, como SB203580, apresentam um notável efeito inibitório na produção de IL-1 e $\text{TNF-}\alpha$ de monócitos estimulados com LPS, devido a forte e seletiva inibição da p38 quinase da família das MAPK. Outro inibidor da via da MAPK utilizado foi o PD98059, que é específico da via da proteína quinase quinase ativada por mitógenos (MEK1) (107, 108).

Pelos resultados podemos concluir que a SAA é capaz de ativar ambas as vias MAPK e PI3K na liberação de IL-8 e TNF- α de neutrófilos humanos. Este mesmo padrão foi mostrado também para outros estímulos como GM-CSF, PAF, fMLP (77).

Citocinas e fMLP induzem a migração celular, a ativação da PKC e a mobilização de cálcio usando vias de sinalização dependentes de proteína G. Nossos resultados demonstram que a liberação de IL-8 de neutrófilos estimulados com SAA é dependente da sinalização via proteína G_i .

Estudos demonstraram que SAA induz adesão e quimiotaxia de monócitos, polimorfonucleares e mastócitos humanos tanto *in vivo* quanto *in vitro* através da ativação dos caminhos de sinalização sensíveis a toxina pertussis. A incubação das células com toxina pertussis inibe a mobilização de cálcio em resposta a rSAA, sugerindo que ambos, quimiotaxia e aumento na concentração de cálcio citoplasmático são mediados por FPRL1, um receptor acoplado a proteínas da classe G_i sensível a toxina pertussis (35, 67, 103).

Genes ativados pelo NF- κ B codificam citocinas, receptores envolvidos com a resposta imune e proteínas de fase aguda, sendo este um fator transdutor de sinal especializado na resposta imune. Neste trabalho observamos que L-cisteína, 2-mercaptoetanol, glutathiona e dexametasona inibiram a liberação de IL-8 e TNF- α em neutrófilos estimulados com SAA. Estes compostos possuem atividade antioxidante e estão incluídos no grupo de compostos capazes de inibir eventos precursores da ativação do NF- κ B (80).

NF- κ B pode ser ativado por espécies derivadas do H_2O_2 , desta forma diversos antioxidantes inibem a mobilização deste fator como por exemplo compostos que contêm grupos sulfidríla que podem agir como seqüestradores de radicais livres. L - cisteína, 2-mercaptoetanol e glutathiona, são seqüestradores de grupos sulfidríla e mostraram-se potentes inibidores da indução de NF- κ B em células Jurkat estimuladas com TNF (80) assim como no nosso caso inibiram a produção de TNF- α e IL-8 por SAA.

8.2 SAA e *priming* de neutrófilos

A possibilidade de a SAA aumentar a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) por neutrófilos é uma questão importante. Neste caso ela poderia estar ativando como um estímulo direto à produção de ROS ou então atuar como um *priming* sensibilizando a célula quando da adição de um segundo estímulo. Em estudo realizado pelo grupo observamos que SAA não foi capaz de ativar o *burst* oxidativo de neutrófilos (109). Desta forma é importante conhecer se SAA induz o *priming* de neutrófilos.

8.2.1 Resultados

Na figura 6 é mostrado o consumo de oxigênio observado quando neutrófilos são estimulados por fMLP e fMLP mais PAF, um composto reconhecido que é capaz de levar ao *priming* de neutrófilos.

Ao contrário de PAF não observamos aumento no consumo de oxigênio, quando pré tratamos as células com SAA e adicionamos fMLP após 5 minutos de incubação (Figuras 7 e 8). Este dado foi comparado com as células não incubadas com SAA. Nestes mesmos experimentos para observar se havia um efeito *priming* de SAA, tentamos aumentar o período de incubação das células com SAA antes da adição do estímulo (fMLP), e também variamos a concentração de fMLP e de SAA, mesmo assim, constatamos não haver efeito.

Apesar de não termos observado *priming* de neutrófilos quando fMLP é adicionado como segundo estímulo, este foi observado quando fMLP foi substituído por $1,0 \times 10^6$ partículas de zimosan/mL. É importante ressaltar que para observar esse efeito é necessário baixa concentração de zimosan, ou seja uma concentração que por si só não desencadeia o *burst* oxidativo (Figura 9), pois o mesmo não é visto em concentrações maiores de zimosan (dado não mostrado). Observamos também que o efeito de indução de *priming* é dependente da concentração de SAA (Figura 10) e da opsonização do zimosan (Figuras 11 e 12).

Figura 6: Cinética do consumo de oxigênio de neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) ativados por fMLP ($0.1 \mu\text{M}$), a seta indica o momento da adição de fMLP com (●) e sem (□) PAF ($0.1 \mu\text{M}$). A cinética é representativa de três ensaios.

Figura 7: Comparação do consumo de oxigênio entre um *priming* clássico PAF ($0.1 \mu\text{M}$) e SAA ($33 \mu\text{g/mL}$). Tanto PAF como SAA foram incubados com neutrófilos ($2,5 \cdot 10^6$ células/mL) 5 minutos antes da adição de fMLP ($0.1 \mu\text{M}$). Os dados são representativos de 3 experimentos (média $\pm$ SD) e representam o consumo de oxigênio durante 90 segundos após a adição de fMLP. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Figura 8: Cinética do consumo de oxigênio de neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) ativados com fMLP ($0.1 \mu\text{M}$). Os neutrófilos foram incubados dez minutos com SAA ($33 \mu\text{g/mL}$) antes da adição do estímulo. A cinética é representativa de três ensaios.

Figura 9: Cinética do consumo de oxigênio de neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) ativados com diferentes concentrações de zimosan. Os neutrófilos foram incubados 5 minutos com SAA antes da adição do estímulo.

Figura 10: Consumo de oxigênio mostrando o efeito *priming* variando concentrações de SAA (3- 33 μg/mL). Neutrófilos (2.5×10^6 células/mL) foram pré incubados durante 5 minutos com SAA antes da adição de zimosan (1.0×10^6 partículas/mL). O consumo de oxigênio foi calculado durante 90 segundos após a adição de zimosan. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos. Através do cálculo do coeficiente de correlação de Pearson observamos uma correlação perfeita positiva ($r=0,995$; $SD=0,22$, $p=0,0048$; $n=4$). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Figura 11: Consumo de oxigênio mostrando o efeito *priming* utilizando zimosan opsonizado (1.0×10^6 partículas/mL) e sem opsonizar (1.0×10^6 partículas/mL). Neutrófilos (2.5×10^6 células/mL) foram pré incubados durante 5 minutos com SAA (33 μg/mL) antes da adição de zimosan. Os dados representam o consumo de oxigênio durante 90 segundos após a adição do estímulo.

Figura 12: Cinética da emissão de luz de neutrófilos (2.5×10^6 células/mL) estimulados com zimosan opsonizado (1.0×10^6 partículas/mL) e sem opsonizar (1.0×10^6 partículas/mL).

8.2.2 Discussão

Em trabalho realizado pelo grupo foi observado que SAA não foi capaz de ativar o *burst* oxidativo, quando comparada com estímulos clássicos, porém se compararmos a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) de células em cultura com e sem SAA (Figura 13), observamos um ligeiro aumento na produção de ROS quando adicionamos zimosan opsonizado (109).

Figura 13: Quimiluminescência de neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) estimulados com SAA (a) e com diferentes estímulos (LPS (b), PMA (c) e zimosan opsonizado (d)) mais SAA (109).

Neste trabalho observamos que quando utilizamos zimosan opsonizado em baixas concentrações foi possível identificar que SAA foi capaz de induzir o *priming* de neutrófilos ao contrário de quando utilizamos fMLP. É importante ainda ressaltar que este efeito depende da opsonização de zimosan visto que ele não pode ser observado quando utilizamos zimosan não opsonizado como estímulo.

Priming e ativação celular estão associados com alterações bioquímicas e mudanças na expressão de uma variedade de moléculas da superfície celular,

priming também pode resultar em mudanças conformacionais nas moléculas β_2 integrinas de adesão, como CD11b/CD18, as quais aumentam sua atividade para ligantes endoteliais, favorecendo a quimiotaxia.

Sabe-se que receptores para a região Fc da IgG (Fc γ R) medeiam a interiorização de partículas opsonizadas por neutrófilos e fagócitos mononucleares humanos. Neutrófilos humanos constitutivamente expressam dois estruturalmente distintos Fc- γ R, Fc- γ RIIa e Fc- γ RIIb e podem ser induzidos a expressar Fc- γ RI por IFN- γ (110, 111).

Em trabalho publicado por Badolato *et al*, 2000, foi descrito que neutrófilos tratados com rSAA tem atividade fagocítica anti-*Candida albicans* aumentada, sendo esta atividade muito maior para fungos opsonizados do que em não opsonizados. O trabalho descreve que neutrófilos estimulados com rSAA tem aumento na expressão de Cd16, Fc- γ RII e Cd11c na membrana. Partículas opsonizadas interagem com esses receptores Fc, desta forma foi observado um aumento na fagocitose quando *Candida albicans* opsonizada foi utilizada como alvo para fagócitos estimulados por rSAA. Concluíram assim que a estimulação com rSAA regula a expressão dos mesmos receptores que *Candida albicans* opsonizada, CD11b, Cd11c e Cd16, na superfície celular (112).

Desta forma, podemos sugerir que o efeito *priming* de SAA em PMN estimulados com zimosan é totalmente ou parcialmente dependente da expressão de receptores. Assim teríamos SAA induzindo a ativação de receptores para partículas opsonizadas, mas não desencadeando o *burst*. Somente quando adicionamos zimosan opsonizado temos a ativação da PKC que levará ao arranjo do sistema multienzimático NADPH oxidase, através da fosforilação de seus componentes citossólicos p47^{phox} e p67^{phox}.

Este efeito *priming* da SAA é interessante porque muitas doenças crônicas como diabetes (10), aterosclerose (1617), reumatismo (8) e neoplasias (113) apresentam concentrações séricas de SAA aumentada, sugerindo a existência de um modulador endógeno constante para esses pacientes.

8.3 Efeito da SAA na liberação de IL-8 e TNF- α em pacientes com DGC.

No sentido de avaliarmos se ocorria compartilhamento das vias de ativação do complexo NADPH oxidase na liberação de IL-8 e TNF- α promovida por SAA, realizamos ensaios com neutrófilos provenientes de pacientes com DGC.

8.3.1 Resultados

Nas tabelas 2 e 3 respectivamente, observamos que neutrófilos provenientes dos dois pacientes com DGC liberam altas quantidades de IL-8 e TNF- α . Este aumento foi observado tanto para neutrófilos estimulados como para não estimulados. A produção basal em neutrófilos de IL-8 foi superior a sete vezes na DGC (Tabela 3), enquanto a de TNF- α foi de três e 7 vezes maior nas duas amostras analisadas (Tabela 4). Basicamente o mesmo aumento foi observado em neutrófilos estimulados com SAA e LPS.

Um dado interessante é que o sistema NADPH oxidase não participa da indução de citocinas promovida por SAA, ou seja, mesmo não encontrando produção de espécies reativas de oxigênio nos dois pacientes estudados (Figuras 14 e 15), observamos uma acentuada produção de citocinas (Tabelas 3 e 4).

Em adição a hiper-sensibilidade de neutrófilos provenientes dos pacientes com DGC, nós também observamos que as concentrações séricas de SAA e IL-8 são aumentados na DGC em relação ao grupo controle (Tabela 5).

Tabela 3: IL-8 (pg/mL) encontrada no sobrenadante de cultura de neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) estimulados com LPS ou SAA após incubação de 18 horas. Os dados representam a média $\pm$ SD.

	IL-8 (pg/mL)		
	paciente 1	paciente 2	controles
Neutrófilos	8542	15760	1189 $\pm$ 436 (n=10)***
Neutrófilos + LPS (1 μ g/mL)	27711	48460	6800 $\pm$ 1026 (n=10)***
Neutrófilos + LPS (2 μ g/mL)	29522	-	2263 $\pm$ 434 (n=10)
Neutrófilos + LPS (5 μ g/mL)	-	45000	10477 $\pm$ 1691 (n=3)
Neutrófilos +SAA (17 μ g/mL)	40230	78820	14642 $\pm$ 2652 (n=10)***

***p< 0.001 Comparação entre as médias das concentrações encontradas nos pacientes com DGC e com a média do grupo controle, utilizando o teste t.

Tabela 4: TNF- α (pg/mL) encontrado no sobrenadante de cultura de neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) estimulados com LPS ou SAA após incubação de 18 horas. Os dados representam a média $\pm$ SD.

	TNF- α (pg/mL)		
	paciente 1	paciente 2	controles
Neutrófilos	1254	4025	432 $\pm$ 79 (n=10)***
Neutrófilos + LPS (1 μ g/mL)	-	14130	1672 $\pm$ 78 (n=10)
Neutrófilos + LPS (2 μ g/mL)	4445	14130	1672 $\pm$ 714 (n=3)***
Neutrófilos + LPS (5 μ g/mL)	6040	-	2388 $\pm$ 652 (n=3)
Neutrófilos +SAA (17 μ g/mL)	5460	28260	2943 $\pm$ 598 (n=10)***

***p< 0.001. Comparação entre as médias das concentrações encontradas nos pacientes com DGC e com a média do grupo controle, utilizando o teste t.

Tabela 5: Concentrações séricas de SAA ($\mu\text{g/mL}$) e IL-8 (pg/mL) encontradas nos pacientes com Doença Granulomatosa Crônica e no soro de indivíduos controle ($n=10$). Os dados representam a média $\pm$ SD.

	Concentrações Séricas		
	paciente 1	paciente 2	controles
IL-8 (pg/mL)	117,1	72,8	$36,49 \pm 7,75$ ($n=10$)***
SAA ($\mu\text{g/mL}$)	139,90	98	$13,97 \pm 5,54$ ($n=10$)***

*** $p < 0.001$. Comparação entre as médias das concentrações encontradas nos pacientes com DGC e com a média do grupo controle, utilizando o teste t.

Figura 14: Efeito de SAA ($17 \mu\text{g/mL}$) sobre a quimiluminescência de neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL). Comparação entre paciente 1 e controle. (A) mostra o perfil cinético amplificado por luminol e (B) os valores relativos da área integrada obtidos a partir de (A).

Figura 15: Efeito de SAA (17 $\mu\text{g/mL}$) sobre a quimiluminescência de neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL). Comparação entre paciente 2 e controle. (A) mostra o perfil cinético amplificado por luminol e (B) os valores relativos da área integrada obtidos a partir de (A).

8.3.2 Discussão

As concentrações séricas de IL-8 e TNF- α estão associadas com a severidade da doença em muitos processos inflamatórios/infecciosos. TNF- α é o maior mediador da resposta inflamatória aguda, é importante na ativação de células endoteliais e na expressão de moléculas de adesão. Este fato contribui para o recrutamento e acumulação de fagócitos na área inflamada. Os efeitos iniciados por TNF- α são fortemente doses dependentes. A altas concentrações, TNF- α causa trombose intravascular, queda na pressão sanguínea e hipoglicemia associada com o choque séptico. Em concentrações moderadas, TNF- α medeia os efeitos sistêmicos da inflamação, como febre, liberação hepática de proteínas de fase aguda e hematopoiese. Em baixas concentrações, TNF- α age no endotélio e em leucócitos e induz inflamação aguda (64). Desta forma podemos pressupor que alterações na produção de TNF $\cdot$ causadas por hiper ou hipo-responsividade podem afetar fortemente o progresso da resposta inflamatória.

O mesmo argumento pode ser estendido para IL-8. Em adição a função primária de IL-8 de atrair leucócitos para o sítio da inflamação, IL-8 pode afetar outros processos biológicos como o desenvolvimento de *stem-cells*, angiogênese e a entrada de vírus nas células do hospedeiro (64, 65, 66).

Dado que a excessiva produção de citocinas pode levar a injúria tecidual e a morte celular, a hiper-sensibilidade encontrada em neutrófilos de pacientes com DGC pode levar a uma ativação inapropriada e pode contribuir para o aumento da susceptibilidade a microorganismos invasores e até mesmo para a formação de granulomas neste grupo de pacientes.

A hiper-ativação de neutrófilos tem sido descrita na DGC e atribuída a um influxo acelerado de Ca^{+2} (60, 61). É conhecido que o aumento prolongado nas concentrações de Ca^{+2} intracelular pode estimular a transcrição e síntese de citocinas (114) e conseqüentemente de proteínas de fase aguda como a SAA. SAA por sua vez acelera o influxo de Ca^{+2} e conseqüentemente, poderia estar gerando um acúmulo e ativação de fagócitos retro-alimentado. Citocinas liberadas por fagócitos cronicamente estimulados podem contribuir para a formação de granulomas, encontrados na DGC (Esquema 5).

Esquema 5: Provável mecanismo envolvido na hipersensibilidade de neutrófilos de pacientes com DGC e formação de granulomas.

Nós acreditamos que SAA tenha uma função importante na progressão de doenças crônicas que se caracterizam pelo aumento permanente desta proteína de fase aguda, contribuindo para um estado pró-inflamatório permanente. Este caso pode estar ocorrendo na DGC, ou seja, altas concentrações de SAA podem estar pré-ativando ou ativando neutrófilos. Se considerarmos o aumento na liberação de citocinas uma característica importante da DGC, é razoável imaginar que a administração de inibidores de citocinas possa ser uma alternativa importante para a melhora na qualidade de vida destes pacientes.

8.4 Função da SAA na progressão do diabetes mellitus

A idéia do estudo do efeito da SAA sobre algumas funções de neutrófilos e células mononucleares de pacientes diabéticos surgiu da hipótese de SAA ser um modulador endógeno constante no diabetes. Esta hipótese se justifica pelo aumento permanente nas concentrações séricas basais de SAA na vigência da doença. Adicionalmente existe uma correlação positiva da concentração de SAA sérica com a gravidade de complicações renais diabéticas (10).

Neste capítulo mostramos o efeito da SAA sobre a liberação de IL-8, TNF- α , IL1 β e IL-1ra de neutrófilos e células mononucleares de indivíduos controle e de pacientes com diabetes mellitus Tipo 2 (DM). Avaliamos as concentrações séricas de IL-8, TNF- α , IL-1 β , IL-1ra e SAA no soro dos grupos controle e DM. Por último, estudamos o efeito da SAA na quimiotaxia de neutrófilos e células mononuclear de pacientes diabéticos em relação ao grupo controle.

8.4.1 Resultados

8.4.1.1 Efeito da SAA na liberação de IL-8, TNF- α , IL1 β e IL-1ra de neutrófilos e células mononucleares de pacientes diabéticos.

Observando a figura 16 podemos notar que:

- (I) Neutrófilos e células mononucleares de pacientes diabéticos produzem uma maior quantidade de IL-8 em relação ao grupo controle, isto ocorre tanto para células estimuladas com LPS como para as estimuladas com SAA;
- (II) A liberação de IL-1 β por neutrófilos é maior no grupo DM, isto ocorre tanto para neutrófilos não estimulados como para estimulados quando comparado ao grupo controle. A liberação de IL-1 β estimulada por SAA de células mononucleares do grupo DM é maior em relação ao grupo controle;
- (III) Neutrófilos do grupo DM produzem uma maior quantidade de TNF- α em relação ao grupo controle, isto ocorre tanto para células estimuladas com LPS como para as não estimuladas. A liberação de TNF- α por células mononucleares é similar entre o grupo controle e o grupo com diabetes, isto ocorre tanto para células não estimuladas, como para as estimuladas;
- (IV) Neutrófilos do grupo DM produzem uma maior quantidade de IL-1ra em relação ao grupo controle, isto ocorre tanto para células estimuladas como para as não estimuladas. A liberação de IL-1ra por células mononucleares é similar entre o grupo sadio e o grupo com diabetes, isto ocorre tanto para células não estimuladas, como para as estimuladas.

Figura 16: Efeito de LPS ($1,0\mu\text{g/mL}$ para cultura de células onde foi quantificado IL-8 e $5,0\mu\text{g/mL}$ para cultura de células onde foi quantificados TNF- α , IL-1 β e IL-1ra) e SAA ($17\mu\text{g/mL}$) na liberação de citocinas de neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) e células mononucleares ($1,5 \times 10^6$ células/mL) do grupo controle ($n=15$) e do grupo com diabetes ($n=18$). Os dados representam a média $\pm$ se. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

8.4.1.2 Efeito da SAA na quimiotaxia de neutrófilos e células mononucleares de pacientes diabéticos.

Inicialmente, realizamos a curva dose resposta ao peptídeo sintético: formil-metionil-leucil-phenilalanina (fMLP), um estímulo quimiotático clássico, aqui utilizado como padrão positivo. Na faixa de concentração de fMLP estudada (1 - 10nM), observamos maior migração de neutrófilos do grupo controle em 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ de fMLP, enquanto que para células mononucleares não observamos diferença na migração entre as concentrações de fMLP utilizadas (Figura 17).

A curva dose resposta a SAA revelou-nos na faixa de concentração de SAA estudada (8,5 – 68 $\mu\text{g/mL}$), ocorre maior migração de neutrófilos em 34 $\mu\text{g/mL}$ de SAA e de células mononucleares em 17 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 17).

Utilizamos 34 $\mu\text{g/mL}$ de SAA e de 10 nM de fMLP em ensaios posteriores envolvendo um número maior de pessoas para comparar a migração de neutrófilos, e células mononucleares do grupo controle com o grupo com diabetes mellitus (Figura 18).

Conforme já descrito pela literatura, neutrófilos do grupo DM migraram menos que neutrófilos do grupo controle em resposta a fMLP, já quando utilizamos SAA como estímulo quimiotático observamos que neutrófilos do grupo DM migraram mais (Figura 18). Não observamos diferença entre os grupos na migração de células mononucleares em resposta a fMLP, porém para SAA como estímulo quimiotático observamos que células mononucleares do grupo DM migram mais (Figura 18).

Figura 17: Efeito da concentração de fMLP (1-10nM) e de SAA (8,5–68 µg/mL) na quimiotaxia de neutrófilos (2.5×10^6 células/mL) e células mononucleares (1.5×10^6 células/mL) dos grupos DM (n=4) e controle (n=6). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

Figura 18: Efeito de SAA (34 $\mu\text{g/mL}$) e de fMLP (10nM) na quimiotaxia de neutrófilos (2.5×10^6 células/mL) e células mononucleares (1.5×10^6 células/mL) dos grupos DM (n=12) e controle (n=13). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

8.4.1.3 Dosagens séricas de SAA, IL-8, TNF- α , IL1 β e IL-1ra.

Observamos que pacientes do grupo DM têm uma maior concentração sérica de SAA e IL-8 em relação ao grupo controle (Tabela 6). Os valores não foram significativamente diferentes para a dosagem de TNF- α , IL1 β e IL-1ra.

Tabela 6: Concentrações séricas de SAA, IL-8 TNF- α , IL1 β e IL-1ra encontradas no grupo controle (n=15) e no grupo com diabetes (n=18). Os dados são representativos da média $\pm$ o desvio padrão.

Analito quantificado	controle	DM
SAA (μ g/mL)	1,1 $\pm$ 0,2	3, 4 $\pm$ 1,2 ***
IL-8 (pg/mL)	34,28 $\pm$ 5,9	62,21 $\pm$ 13 ***
TNF- α (pg/mL)	202,08 $\pm$ 26	234,56 $\pm$ 36
IL-1 β (pg/mL)	7,232 $\pm$ 1,7	10,72 $\pm$ 2,3
IL-1ra (pg/mL)	893,9 $\pm$ 107	835,4 $\pm$ 59,2

8.4.2 Discussão

Nossos resultados mostram que neutrófilos e células mononucleares de pacientes diabéticos são mais sensíveis a SAA e liberam quantidades maiores de IL-8 e IL-1 β em relação ao grupo controle. Embora IL-1 β não cause dano tecidual, esta citocina potencializa os danos causados por TNF- α no endotélio vascular e intensifica a síntese de IL-1 β e IL-6, as quais juntamente com TNF- α , induzem a síntese hepática de SAA (64). Desta forma, acreditamos que o eixo SAA $\rightarrow$ citocina $\rightarrow$ SAA possa existir de forma contínua no diabetes. Em relação a IL-8, esta quimiocina age no recrutamento de neutrófilos, lesão de tecidos e angiogênese (65, 66, 68). Todos estes processos são encontrados nas complicações vasculares do diabetes.

Nossa hipótese de que SAA seja um estímulo inflamatório constante em diabéticos é reforçada por dados recentes que descrevem um receptor hepático para SAA que é regulado por glicose e diferentemente expresso no diabetes (117). O Esquema 6 faz uma apresentação das possíveis vias ativas no diabetes e que exploram a associação entre diabetes, SAA e resposta inflamatória.

Esquema 6: Prováveis estímulos inflamatório permanentes no diabetes.

O tema diabetes e inflamação vêm sendo um foco crescente de pesquisas. Sabe-se, por exemplo, que a resistência à insulina está diretamente correlacionada com as concentrações séricas de SAA, PCR e outros mediadores inflamatórios (118). Outros exemplos incluem a ativação do sistema imune inato como valor preditivo de mortalidade por doenças cardiovasculares (119). Estes exemplos suportam a importância de estudos mais aprofundados da relação entre progressão do diabetes e resposta imune. Objetivos estes contemplados no nosso estudo.

Em pacientes com diabetes mellitus as complicações comuns são de duas naturezas, uma envolvendo a resposta imune inata e o aumento da susceptibilidade a infecções (88-94) e a outra envolvendo as complicações macro e micro vasculares crônicas (120). Nos dois casos, a disfunção na liberação de citocinas por células do sistema imune pode modular e influenciar a resposta imune inata prejudicada e o aparecimento de complicações crônicas encontrados na doença. Estudos experimentais e clínicos têm mostrado que neutrófilos e citocinas têm função importante na evolução de complicações macro e micro vasculares (120, 121, 122, 123, 124). Por exemplo, no caso das complicações vasculares crônicas, a disfunção endotelial é considerada um dos possíveis mecanismos para a sua ocorrência, desta forma, citocinas conhecidas por alterarem as funções das células endoteliais como TNF- α , IL-1 β e IL-8 contribuem para o aparecimento de complicações tanto na microvasculatura (retinopatia, neuropatia e nefropatia) (121, 122, 123), quanto na macrovasculatura (insuficiência coronariana) (120).

A desregulação na expressão de L-selectina encontrada em neutrófilos de pacientes diabéticos (124, 125), assim como concentrações elevadas de citocinas como IL-8, TNF- α e IL-6 encontradas no humor vítreo dos mesmos (122, 123) contribuem para o aparecimento da retinopatia diabética proliferativa, complicação microvascular crônica do diabetes decorrente de neovascularização e fibrose e podem de alguma forma estar correlacionados com o aumento da SAA encontrado no diabetes, uma vez que SAA é capaz de aumentar a expressão de moléculas de adesão, aumentar a migração celular para o foco inflamatório (36) e estimular a liberação de citocinas pró-inflamatórias (1, 2, 3). Outro dado interessante é que o processo de angiogênese é dependente da presença de neutrófilos (126).

O tipo de associação feito acima poderia ainda ser aplicado para a neuropatia periférica, caracterizada pela diminuição da condução do impulso nervoso, degeneração axonal e regeneração prejudicada. Citocinas neuropoiéticas como IL-1,

IL-6, TNF- α e TGF- β exibem efeito pleiotópico na homeostase da glia e no sistema nervoso central, periférico e autônomo e a exercem função importante na regeneração e degeneração do nervo na neuropatia diabética. A desregulação nas concentrações locais com o aumento da produção destas citocinas influencia na progressão da doença (123). Outras complicações diabéticas como aterosclerose e a nefropatia também mostram estar diretamente relacionadas a um estado inflamatório permanente propiciando dano tecidual.

O conhecimento do modo de ação da SAA e do sua função nos mecanismos que levam a progressão das complicações diabéticas pode ser uma alternativa interessante no desenvolvimento de drogas que possam retardar ou até mesmo impedir o aparecimento e progressão de complicações. Devemos ainda levar em consideração que existem outras doenças que apresentam aumento permanente nas concentrações séricas de SAA e que a importância desta proteína nestes casos pode ser bem maior do que conhecemos hoje.

8.5 Utilização de SAA como marcador do estado inflamatório subclínico crônico no diabetes mellitus Tipo 2

Um outro objetivo deste trabalho foi verificar como fagócitos de pacientes diabéticos com história clínica e diagnosticada de complicação microvascular respondiam a SAA em relação a pacientes diabéticos sem história clínica de complicação, dado que existe uma correlação positiva da concentração de SAA sérica com a gravidade de complicações renais diabéticas (10) e de citocinas pró-inflamatórias com a resistência à insulina e comprometimento micro e macrovasculares encontrados no diabetes (118).

Inicialmente trabalhamos com dois grupos de diabéticos, um grupo sem complicações vasculares decorrente da doença e outro composto por pacientes diabéticos com complicações microvasculares. Embora a tendência da literatura é acreditar que pacientes diabéticos com complicações vasculares apresentariam um perfil pró-inflamatório mais acentuado que pacientes diabéticos sem complicações decorrentes da doença, nossos resultados demonstraram o oposto, ou seja, pacientes diabéticos com complicações vasculares mostraram um perfil pró-inflamatório menos acentuado que pacientes diabéticos sem complicações.

A partir deste dado, passamos a trabalhar com algumas hipóteses que fornecessem suporte para esta diferença de resultado entre os grupos, como por exemplo:

- (a) Antiinflamatórios não estereoidais, especialmente AAS, que são utilizados por todos os pacientes do grupo diabético com complicação poderiam inibir a síntese de proteínas de fase aguda e citocinas (115).
- (b) Hipotensores, utilizados comumente por diabéticos complicados na prevenção de complicações renais, falência cardíaca congestiva e aterosclerose também poderiam atuar sobre a síntese de citocinas. Neste sentido é conhecido que pacientes que utilizam inibidores da angiotensina II mostram um retardo na progressão da complicação e isto é, em parte, devido aos efeitos antiinflamatórios e anti-oxidantes da droga (116).
- (c) Observamos uma diminuição da produção de IL-8 e TNF- α por neutrófilos de pacientes diabéticos estimulados por SAA na presença de glicose (Figura 22) o que poderia indicar um dos mecanismos ativos no grupo diabético com complicação. No

grupo estudado, sabe-se que pacientes com complicações vasculares decorrentes do diabetes apresentam valores maiores de hemoglobina glicosilada ($7,9 \pm 1,9$) quando comparados ao grupo de diabéticos sem complicação ($6,5 \pm 1,0$). Esta diferença entre os grupos é considerada significativa, $p=0,0058$.

Neste capítulo estudamos como o uso regular de drogas como o ácido acetil salicílico e inibidores da ECA influenciam na liberação de IL-8, TNF, IL-1 β e IL-1ra por neutrófilos e células mononucleares estimuladas com SAA. Também realizamos as dosagens séricas de SAA, IL-8, TNF, IL-1 β e IL-1ra. Desta forma passamos a analisar dois grupos diferentes de pacientes com diabetes mellitus Tipo 2. O grupo com história de complicação vascular que faz uso de drogas como o AAS e inibidores da ECA e o grupo de diabéticos sem história de complicação vascular e que não faz uso destas drogas.

8.5.1 Resultados

Observando a figura 19 podemos notar que:

- (I) Neutrófilos e células mononucleares dos pacientes diabéticos que fazem uso de AAS e inibidores da ECA produzem a mesma quantidade de IL-8 em relação ao grupo sem medicação, isto ocorre tanto para células não estimuladas como para as estimuladas;
- (II) A liberação de IL-1 β por neutrófilos é maior no grupo DM sem medicação, isto ocorre para células não estimuladas. A liberação de IL-1 β em células mononucleares do grupo DM sem medicação é maior em relação ao grupo DM com medicação; isto ocorre tanto para células estimuladas como para células não estimuladas
- (III) Neutrófilos do grupo DM sem medicação produzem uma maior quantidade de TNF- α em relação ao grupo com medicação, isto ocorre para células não estimuladas. A liberação de TNF- α por células mononucleares é similar entre o grupo DM com medicação e o grupo DM sem medicação.
- (IV) A liberação de IL-1ra por neutrófilos e células mononucleares é similar entre o grupo DM com medicação e o grupo sem medicação, isto ocorre tanto para células não estimuladas, como para as estimuladas.

Na tabela 7 observamos uma redução significativa nas concentrações séricas de SAA encontrados no grupo diabético com medicação em relação ao grupo com diabetes mais medicação. Não foi observada diferença significativa nos valores séricos de IL-8 TNF- α , IL1 β e IL-1ra entre os grupos.

Figura 19: Efeito de LPS ($1,0\mu\text{g/mL}$ para cultura de células onde foi quantificado IL-8 e $5,0\mu\text{g/mL}$ para cultura de células onde foi quantificados TNF- α , IL-1 β e IL-1ra) e SAA ($17\mu\text{g/mL}$) na liberação de citocinas de neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) e células mononucleares ($1,5 \times 10^6$ células/mL) de pacientes diabéticos sem medicação ($n=18$) e com medicação ($n=15$). Os dados representam a média $\pm$ se.

Tabela 7: Concentrações séricas de SAA, IL-8 TNF- α , IL1 β e IL-1ra encontrados no grupo diabético sem medicação (n=18) e no grupo com diabetes mais medicação (n=15). Os dados são representativos da média $\pm$ o desvio padrão.

Analito quantificado	DM	
	Sem medicação	Com medicação
SAA ($\mu\text{g/mL}$)	3, 4 $\pm$ 1,2	1,9 $\pm$ 0,4 ***
IL-8 (ng/mL)	62,21 $\pm$ 13	76,17 $\pm$ 19
TNF- α (pg/mL)	234,56 $\pm$ 36	295,06 $\pm$ 78,10
IL-1 β (pg/mL)	10,72 $\pm$ 2,3	18,03 $\pm$ 4,72
IL-1ra (pg/mL)	835,4 $\pm$ 59,2	850,86 $\pm$ 66,86

8.5.2 Discussão

Um achado interessante proveniente deste estudo é que leucócitos de pacientes diabéticos com história clínica de complicação crônica proveniente do diabetes e que fazem uso do ácido acetil salicílico (AAS) e inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), apresentaram menor sensibilidade. Estes mesmos pacientes mostram concentrações séricas de SAA menores que pacientes diabéticos que não tomam medicamentos. Com base nestes resultados acreditamos na possibilidade de o ácido acetil salicílico e/ou inibidores da ECA modulem o estado inflamatório presente em diabéticos, diminuindo as concentrações séricas de SAA e a produção de citocinas pró-inflamatórias por leucócitos, e assim, minimizando a possibilidade de complicações decorrentes do diabetes.

Assim como na DGC (60, 61), neutrófilos de pacientes diabéticos apresentam aumento nas concentrações intracelulares do Ca^{+2} (127, 128), um elemento importante na resposta efetora de neutrófilos. O aumento Ca^{+2} intracelular confere a célula um caráter pré-ativado (46, 101), existindo correlação entre o aumento de Ca^{+2} intracelular com a hiperglicemia (129, 130). É interessante notar que SAA aumenta a formação de metabólitos da cicloxigenase em células ativadas (131). Considerando a elevação da concentração de SAA no diabetes, o efeito *priming* de SAA e sua potente atividade na liberação de citocinas pró-inflamatórias existe a possibilidade de SAA estar medeando, também, a liberação permanente de prostaglandinas e tromboxanos. E, neste caso, fica claro que drogas como o AAS, devem ser essenciais na contenção do estado inflamatório em pacientes diabéticos. É importante ainda lembrar que hipotensores, utilizados comumente por diabéticos complicados na prevenção de complicações renais, falência cardíaca congestiva e aterosclerose também podem atuar sobre a síntese de citocinas. Neste sentido é conhecido que pacientes que utilizam inibidores da angiotensina II mostram um retardo na progressão da complicação e isto é, em parte, devido aos efeitos antiinflamatórios e anti-oxidantes da droga (116).

Além da função pró-inflamatória, outro aspecto importante da SAA está relacionado com o metabolismo de lipídes. A SAA desloca a apoA-I da HDL, prejudicando o transporte reverso do colesterol e modulando a atividade da lecitina colesterol acil-transferase (uma enzima responsável pela esterificação do colesterol) (22). É conhecida a relação entre SAA e doenças arteriais coronarianas (16, 132,

133). Acreditamos que o desenvolvimento da doença, além de estar envolvido com o metabolismo de lipídios, tem uma estreita correlação com SAA, possivelmente mediando o processo inflamatório (adesão de monócitos, migração transendotelial, ativação e produção de citocinas pró-inflamatórias). Além do diabetes, algumas outras doenças que apresentam componente inflamatório e que tem concentrações de SAA sérica permanente aumentadas, como na artrite reumatóide é conhecido o aumento de mortalidade por doenças cardiovasculares (134).

Normalmente com o avanço do diabetes mellitus Tipo 2, decorrente da resistência à insulina ocorre também diminuição na produção deste hormônio. Esta diminuição é decorrente da deposição amilóide pancreática, a qual está associada com a perda de células beta (135, 136, 137). Neste caso é bem caracterizado que há deposição da porção n-terminal do fragmento da SAA (137). Este mesmo tipo de depósito ocorre na artrite reumatóide (138), no Alzheimer (139, 140) e em alguns tipos de câncer (141). Nestes casos, nos parece que o monitoramento das concentrações séricas de SAA e a utilização de drogas que minimizem sua liberação são importantes durante o tratamento destas doenças crônicas.

Como continuidade deste estudo fica a possibilidade de verificar a utilização de SAA como marcador do estado inflamatório subclínico crônico no diabetes mellitus Tipo 2 e conseqüentemente do controle da progressão da doença, uma vez que proteínas de fase aguda e citocinas estão diretamente relacionadas com o controle glicêmico (74) e resistência à insulina (85). Acreditamos que pela facilidade das determinações da concentração sérica de SAA, se houver uma boa correlação clínico-epidemiológica, teremos um bom marcador para o acompanhamento da doença.

Devemos ainda levar em consideração, como já mencionado anteriormente que existem outras doenças que apresentam aumento permanente nas concentrações séricas de SAA e que a importância desta proteína nestes casos pode ser bem maior do que conhecemos hoje.

8.6 Um achado ao acaso: Influência imunomodulatória da solução

hiperosmolar de NaCl sobre a liberação de IL-8, TNF- α , IL-1 β e IL-1ra de neutrófilos e células mononucleares.

8.6.1 Resultados

Nosso objetivo inicial nesta parte do trabalho era verificar a correlação entre glicose e SAA como moduladores combinados para a liberação de IL-8 e TNF- α de neutrófilos e células mononucleares, uma vez que no diabetes mellitus tanto as concentrações séricas de SAA quanto as de glicose apresentam-se aumentadas. Inicialmente verificamos que o aumento nas concentrações de glicose (0-12,5mM), aumenta a liberação de IL-8 por neutrófilos (Figura 20A) e nas condições estudadas, não foi observado um aumento na produção de TNF- α com o aumento na concentração de glicose (Figura 20B).

Quando SAA e glicose são utilizadas em conjunto não observamos variações significativas entre a liberação de TNF- α e IL-8 de neutrófilos e células mononucleares de indivíduos saudáveis estimulados com SAA e com SAA mais glicose (Figura 21), porém ocorre uma diminuição na quantidade de IL-8 produzida tanto por neutrófilos quanto para células mononucleares de pacientes diabéticos na presença de glicose mais SAA, em comparação com a quantidade de IL-8 produzida por células estimuladas com SAA (Figura 22). Este não foi observado para TNF- α (Figura 22).

Para verificar se os efeitos observados eram devido à presença de glicose ou simplesmente devido ao aumento da osmolaridade, utilizamos NaCl nas mesmas concentrações de glicose como controle. Um dado interessante observado foi a diminuição da liberação de IL-8, TNF- α , IL-1 β e IL-1ra com concentrações crescentes de NaCl em neutrófilos e células mononucleares estimuladas com LPS (Figuras 23). Esta mesma diminuição na liberação de IL-8 e TNF- α quando utilizamos NaCl foi também observada quando estimulamos as células com SAA (Figura 24).

É importante salientar que este efeito somente foi observado em baixas concentrações de estímulo, ou seja, de 0,5 μ g/ml para a indução da liberação de IL-

8 e 1 µg/mL para a liberação de TNF- α não tendo sido observado na concentração de 1,0 µg/ml de LPS para a indução da liberação de IL-8 e 5 µg/mL de LPS para a indução da liberação de TNF- α (dado não mostrado) e nem quando utilizamos outro tipo de sal, KI, nas mesmas condições (figura 25).

Figura 20: Efeito de glicose em diferentes concentrações na liberação de IL-8 e TNF- α de neutrófilos humanos ($2,0 \times 10^6$ células/mL). As células foram incubadas durante 18 horas com concentrações crescentes de glicose (0 - 12,5 mM). Os dados são provenientes de 3 experimentos, feitos em duplicata e estão representados através da média $\pm$ se.

Figura 21: Efeito de Glicose (5mM) e SAA (17μg/mL) na liberação de IL-8 e TNF-α de neutrófilos de indivíduos saudáveis (2.5×10^6 células/mL). Os dados são provenientes de 3 experimentos, feitos em duplicata e estão representados através da média $\pm$ se.

Figura 22: Efeito de Glicose (5mM) e SAA (17 μ g/mL) na liberação de IL-8 e TNF- α de neutrófilos (2.5×10^6 células/mL) e células mononucleares (1.5×10^6 células/mL) de pacientes diabéticos (n=4). * p<0, 05; ** p<0, 01; *** p<0, 001.

Figura 23: Efeito de NaCl em diferentes concentrações na liberação de IL-8, TNF- α , IL-1 β e IL-1ra de neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) e células mononucleares ($1,0 \times 10^6$ células/mL) de indivíduos saudáveis. As células foram incubadas durante 18 horas com e sem LPS ($0,5 \mu\text{g/mL}$ para quantificação de IL-8 e $0,5 \mu\text{g/mL}$ para quantificação das demais). Os dados são provenientes de pelo menos 3 experimentos.

Figura 24: Efeito de NaCl (5,0mM) na liberação de IL-8 e TNF- α de neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) de indivíduos saudáveis. As células foram incubadas durante 18 horas com e sem SAA (17 μ g/mL). Os dados são provenientes de pelo menos 3 experimentos e estão representados pela média $\pm$ se. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Figura 25: Efeito de KI em diferentes concentrações na liberação de IL-8, TNF- α e IL-1 β neutrófilos humanos ($2,5 \times 10^6$ células/mL). As células foram incubadas durante 18 horas com e sem LPS ($0,5 \mu\text{g/mL}$). Os dados são provenientes de 2 experimentos e estão representados pela média $\pm$ se.

8.7 Discussão

Nossos resultados mostram diminuição da liberação de IL-8, IL-1 β e IL-1ra com concentrações crescentes de NaCl em neutrófilos e células mononucleares estimuladas com LPS. Estes dados são importantes no cenário de ativação de fagócitos uma vez que é a primeira vez que se demonstra diminuição na liberação de citocinas por solução salina hiperosmolar neste tipo celular. Nossos resultados têm implicações concretas na compreensão dos benefícios da administração de solução salina hiperosmolar em pacientes com choque hemorrágico severo.

A diminuição observada na liberação de citocinas não se limitou a células estimuladas com LPS. Este mesmo padrão foi observado quando estimulamos neutrófilos com SAA. Existem diversos mecanismos bioquímicos que tentam explicar como a célula percebe o estresse osmótico. Primeiro, a célula pode sentir a diferença iônica entre o meio extracelular e intracelular, sendo sugerido que mudanças no citoesqueleto devido ao encolhimento, podem mediar a ativação celular (142, 143, 144). Uma outra hipótese muito interessante é que as células através da percepção do ambiente “apertado” sentem pequenas variações na termodinâmica intracelular, um exemplo seria o encolhimento osmótico induzindo o agrupamento dos receptores (143). Neste sentido, Karin *et al*, (1996) demonstraram que o encolhimento osmótico agrupou os receptores de IL-1, do fator de crescimento epidermal (EGF) de TNF, mesmo na ausência destes ligantes (145).

O fato de não ocorrer modificação na liberação de citocinas quando substituímos NaCl por KI, indica que o efeito observado não é exclusivamente devido ao aumento da osmolaridade, mas possivelmente há a especificidade dos ânions envolvidos. Neste sentido vale ressaltar que existem alguns trabalhos que mostram ativação de vias de transdução de sinal através da ativação de canais Na⁺/H⁺ durante o encolhimento de neutrófilos com o aumento da osmolaridade (146, 147). O mecanismo molecular responsável por esta ativação não é claro (147,148), porém o encolhimento osmótico é um potente indutor da fosforilação de resíduos de tirosina. Inexplicavelmente SAPK, p38, *erk1* e *erk 2* não são detectadas fosforiladas ou ativada por estes canais (146).

Uma aplicabilidade para este achado, é o fato da infusão intravenosa de altas concentrações de NaCl ser utilizada para restabelecer rapidamente a pressão sangüínea e o equilíbrio ácido-base em choques hemorrágico severos (149). A solução hipertônica tornou-se, nos últimos anos, uma alternativa segura e eficiente ao uso do tradicional soro fisiológico na reanimação de vítimas de choque hemorrágico, situação em que a perda excessiva de sangue, geralmente devida ao trauma, pode matar uma pessoa ou deixar seqüelas. Este tipo de solução apresenta uma série de propriedades hemodinâmicas benéficas como a rápida expansão do volume intravascular, a redução do edema endotelial e tecidual e a melhora da viscosidade sangüínea (150, 151, 152, 153).

Além da perda excessiva de sangue, outro problema que surge após o trauma são as complicações pós-traumáticas letais como falência múltipla dos órgãos e sepsi (154, 155, 156), problemas causados principalmente por desregulações no sistema imunológico. Embora a isquemia cause dano tecidual principalmente através da hipóxia induzindo depleção da energia armazenada, a re-oxigenação contribui para o dano tecidual através da formação de espécies reativas de oxigênio, da liberação de citocinas inflamatórias como TNF e IL-1 e leucotrienos que por exemplo, pré-ativam as células do sistema imune a uma resposta exagerada a um estímulo infamatório (153, 157, 158), e neste caso este poderia ser tanto LPS, como um estímulo endógeno como a SAA, o que levaria a um agravamento no quadro.

Neste sentido a ressuscitação hipertônica tem atraído a atenção como uma possível ferramenta para prevenção da inflamação e imunossupressão contendo a resposta imune deletéria em pacientes traumatizados. Nossos resultados estão em concordância com outros recentes estudos que mostram um possível efeito imunomodulatório da ressuscitação com solução salina hipertônica. Powers *et al*; (2003) demonstraram que a administração sistêmica de solução salina hipertônica diminui a produção de TNF- α e aumenta a de IL-10 em macrófagos alveolares tanto em estudos *in vivo* como *in vitro* (159). Outros estudos têm demonstrado que a exposição a hiperosmolaridade *in vivo* e *in vitro* diminui a expressão de moléculas de adesão (CD11b, L-selectina e ICAM-1) em neutrófilos e células mononucleares em resposta a ativação por LPS (160, 161), e também diminui a produção de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos. Neste sentido a hipertonidade pode minimizar danos a órgãos em doenças caracterizadas por neutrófilos/macrófagoa medeando o dano o que é muito comum no dano hepático após choques severos (162, 163,164).

CONCLUSÕES

9 Conclusões

- (I) O processo de liberação de IL-8 e TNF- α promovido por SAA em neutrófilos humanos envolve a participação da p38 MAPK, da PI3K, da proteína Gi e também do fator de transcrição NF- κ B. O sistema NADPH oxidase não participa na síntese e liberação de IL-8 e TNF- α promovido por SAA.
- (II) Neutrófilos de pacientes com DGC são hiper-responsivos, com uma maior produção de TNF- α e de IL-8 em células estimuladas e não estimuladas, existindo fortes indícios da participação de SAA neste processo. As concentrações séricas de SAA e IL-8 nos pacientes estudados apresentaram-se também aumentadas em relação ao grupo controle.
- (III) SAA é capaz de pré-ativar neutrófilos tornando-os mais responsivos a estímulo opsonizado.
- (IV) SAA pode exercer função na progressão de complicações vasculares do Diabetes Mellitus Tipo 2. Pacientes diabéticos além de caracterizam-se pelo aumento permanente da SAA sérica, apresentam neutrófilos e células mononucleares mais responsivos a esta, liberando maiores quantidades de IL-8 e IL-1 β , citocinas com potente atividade nos processos de deteriorização macro e micro vascular.
- (V) A quimiotaxia induzida por SAA também é maior no grupo com diabetes em relação ao controle.
- (VI) Pacientes diabéticos que fazem uso de drogas como o AAS e inibidores da enzima conversora de angiotensina apresentam concentrações séricas de SAA diminuídas, neste caso a SAA pode ser um importante marcador do estado inflamatório sub-clínico crônico do diabetes e também de controle glicêmico, uma vez que a resistência à insulina está relacionada com mediadores inflamatórios.

- (VII) Nossos resultados mostram a Influência imunomodulatória da solução hiperosmolar de NaCl sobre a liberação de IL-8, TNF- α , IL-1 β e IL-1ra de neutrófilos e células mononucleares com diminuição da liberação de IL-8, TNF- α , IL-1 β e IL-1ra com concentrações crescentes de NaCl em células estimuladas com LPS. Esta mesma diminuição na liberação de IL-8 e TNF- α foi encontrada em neutrófilos estimulados com SAA.

10 Considerações Finais

A importância biológica da SAA e a necessidade de estudos mais aprofundados sobre seu modo de ação são suportados por: (i) os genes da SAA existem há cerca de 400 milhões de anos, sendo evolutivamente muito bem conservados, (ii) a regulação da expressão de SAA é complexa e envolve múltiplos mecanismos moleculares, (iii) em processos inflamatórios agudos, a SAA associada a HDL apresenta um caráter não inflamatório, porém no foco inflamatório, quando dissociada apresenta um potente caráter pró-inflamatório.

Acreditando na importância biológica deste reativo de fase aguda, nosso grupo vem tentando exaustivamente responder a diversas questões. Neste sentido, avaliamos as vias de sinalização celular envolvida na liberação IL-8 e TNF- α por neutrófilos, após estímulo por SAA, evidenciando a participação das vias de MAPK e PI3K, do fator de transcrição NF- κ B e da proteína Gi. Estudando pacientes com doença granulomatosa crônica, mostramos que não há participação do sistema NADPH oxidase na síntese e liberação dessas citocinas.

Acreditamos que o estudo dos mecanismos envolvidos na ação indutora de SAA sobre fagócitos abre novos horizontes para estudos posteriores tanto no aspecto de descobrir novas vias de sinalização/transdução de sinal ativadas por SAA como meios de inibi-las ou estimula-las dependendo do interesse clínico. Por exemplo, no processo agudo SAA apresenta importante função na sua resolução induzindo condições para a ativação de células do sistema imune, através do efeito *priming* e da liberação de citocinas pró-inflamatórias envolvidas com a modulação da resposta inflamatória. Porém em processos crônicos como no diabetes mellitus, a concentração sérica de SAA constantemente elevada, funciona como um estímulo endógeno permanente sobre fagócitos, podendo exercer função importante na progressão da doença. Observamos também neste trabalho que AAS e/ou inibidores da ECA podem diminuir as concentrações séricas de SAA. Deste modo SAA poderia ser utilizada como marcador do estado inflamatório além de ser marcador da progressão de complicações vasculares decorrentes do diabetes.

*REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

11 Referências Bibliográficas

1. Furlaneto CJ, Campa A. A novel function of serum amyloid A: a potent stimulus for the release of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , and interleukin-8 by human blood neutrophil. **Biochem Biophys Res Commun** 2000; 268: 405-408.
2. Ribeiro FP, Furlaneto CJ, Hatanaka E, Ribeiro WB, Souza GM, Cassatella MA, Campa A. mRNA expression and release of interleukin-8 induced by serum amyloid A in neutrophils and monocytes. **Mediators Inflamm** 2003; 12: 173-178.
3. Hatanaka E, Furlaneto CJ, Ribeiro FP, Souza GM, Campa A. Serum amyloid A-induced mRNA expression and release of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in human neutrophils. **Immunol Letters** 2004; 91: 33-37.
4. Furlaneto CJ, Ribeiro FP, Hatanaka E, Souza GM, Cassatella MA, Campa A. Apolipoproteins A-I and A-II downregulate neutrophils functions. **Lipids** 2002; 37: 925-928.
5. Hatanaka E, Carvalho BTC, Campa A. Hyperresponsiveness of neutrophils from gp 91phox deficient patients to lipopolysaccharide and serum amyloid A. **Immunol Letters** 2004; 94: 43-46.
6. Hatanaka E, Ribeiro FP, Campa A. Serum Amyloid A Primes Neutrophils. **FEMS Immunol Med Microbiol** 2003; 38: 81-84.
7. Steel DM, Whitehead AS. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. **Immunol Today** 1994; 15: 81-88.
8. Kumon Y, Suehino T, Hashimoto K, Nakatani K, Sipe JD. Local expression of acute phase serum amyloid A mRNA in rheumatoid arthritis synovial tissue and cells. **J Rheumatol** 1999; 26: 785-790.

9. Liang JS, Sloane JA, Wells JM, Abraham CR, Fine RE, Sipe JD. Evidence for local production of acute phase response apoprotein serum amyloid A in Alzheimer's disease brain. **Neurosci Lett** 1997; 225: 73-76.
10. Kumon Y, Suehiro T, Itahara T, Ikeda Y, Hashimoto K. Serum amyloid A protein in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Clin Biochem** 1994; 27: 469-473.
11. Godenir NL, Jeenah MS, Coetzee GA, Vander- Westhuysen DR, Strachan AP, De Beer PC. Standardization of quantification of serum amyloid A protein (SAA) in human serum. **J Immunol Methods** 1985; 83: 217-225.
12. Coetzee GA, Strachan FA, Westhuyzen DR, Hoppe HC, Jeenah MS, Beer FC. Serum Amyloid A - containing human high-density lipoprotein 3. **J Biol Chem** 1986; 261: 9644-9651.
13. Cabana VG, Gidding SS, Getzm Chapman J, Shulman ST. Serum amyloid A and high-density lipoprotein participate in the acute phase response of Kawasaki disease. **Pediatric Res** 1997; 42: 651-655.
14. Husebekk A, Skogen BG. Characterization of amyloid proteins SAA and AA as apolipoproteins of high-density lipoprotein (HDL): displacement of SAA from HDL-SAA complex by apo A-I and apo A-II. **Scand J Immunol** 1987; 25: 375-378.
15. Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. **Immunol Today** 1994; 15: 74-78.
16. Yamada T, Kakiyama T, Fukuda T. Both acute phase and constitutive serum amyloid A are present in atherosclerotic lesions. **Pathol Int** 1996; 48: 797-800.
17. Kumon Y, Sipe JD, Brinckerhoff CE, Schreiber BM. Regulation of extrahepatic apolipoprotein serum amyloid A (apoSAA) gene expression by interleukin-1 alpha alone: synthesis and secretion of apoSAA by cultured aortic smooth muscle cells. **Scand J Immunol** 1997; 46: 284-291.

18. Ray A, Ray BK, Serum amyloid A gene expression level in liver in response to different inflammatory agents is dependent upon the nature of activated transcription factors. **DNA Cell Biol** 1997; 16: 1-9.
19. Ray BK, Chatterjee S, Ray A. Mechanism of minimally modified LDL-mediated induction of serum amyloid A gene in monocyte/macrophage cells. **DNA Cell Biol** 1999; 18: 65-73.
20. Kisilevsky R, Subrahmanyam L. Serum amyloid A changes high density lipoprotein's cellular affinity due to serum amyloid A's principal function. **Lab Invest** 1992; 66: 778-785.
21. Grehan S, Uhlar CM, Sim RB, Herbert J, Whitehead S. Expression of biologically active recombinant mouse IL-1 receptor antagonist and its use in vivo to modulate aspects of acute phase response. **J Immunol** 1997; 159: 369-378.
22. Ureli-Shoval S, Linke PR, Matzner Y. Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states. **Curr Opin hematol** 2000; 7: 64-69.
23. Shainkin-Kestenbaum R, Berlyne G, Zimlichman S, Sorin HR, Nyska M, Danon A. Acute-Phase Protein, Serum Amyloid A, Inhibits IL-1 and TNF induced Fever And Hypothalamic PGE2 in mice. **Scand J Immunol** 1991; 34: 179-183.
24. Preciado-Patt L, Cahalon L, Herskovitz R, Lider O, Pras M, Fridkin M. Serum amyloid A complexes with extracellular matrix induces the secretion of tumor necrosis factor α by human T-lymphocytes. **Lett in Pept Science** 1998; 5: 349-355.
25. Brincherhoff CE, Mitchell TI, Karmilowicz MJ, Kluve-Beckerman B, Benson MD. Autocrine induction of collagenase by serum amyloid A - like and β 2-microglobulin-like proteins. **Science** 1989; 243: 655-657.
26. Peristeris P, Gaspar A, Gross P, Laurent P, Berman H, Bienvenu J. Effects of serum amyloid A protein on lymphocytes, HeLa, and MRC5 cells in culture. **Biochem Cell Biol** 1989; 67: 365-370.

27. Shainkin-Kestenbaum R, Zimlichman S, Lis M, Lidor C, Pomerantz M, Knyzsynski A. Effect of serum amyloid A, HDL-apoprotein on endothelial cell proliferation: implication of an enigmatic protein to atherosclerosis. **Biomed Pept Proteins Nucleic Acids** 1997; 2: 79-84.
28. Zimlichman S, Danon A, Nathan I, Mozes G, Shainkin-Kestenbaum R. Serum amyloid A, an acute phase protein, inhibits platelet activation. **J Lab Clin Med** 1990; 116: 180-186.
29. Linke PR, Bock V, Valet G. Inhibition of the oxidative burst response of N formyl peptide-stimulated neutrophils by serum amyloid A protein. **Biochem Biophys Res Commun** 1991; 176:1100-1105.
30. Gatt ME, Ureli-Shoval S, Preciado-Patt L, Fridkin M, Calco S, Azar Y, Matzner Y. Effect of serum amyloid A on selected in vitro functions of isolated human neutrophils. **J Lab Clin Med** 1998; 132: 414-420.
31. Preciado PL, Levantowsky D, Pras M, Hershkovich R, Lider O, Fridkin M. Inhibition of cell adhesion to glycoprotein of the extracellular matrix by peptides corresponding to serum amyloid A: toward understanding the physiological role of an enigmatic protein. **Eur J Biochem** 1994; 223: 35-42.
32. Xu L, Badolato R, Murphy WJ, Longo DL, Anver M, Hale S. A novel biologic function of serum amyloid A: induction of T lymphocyte migration and adhesion. **J Immunol** 1995; 155: 1184- 1190.
33. Preciato-Patt L, Hershkovich R, Fridlin M, Lider O. Serum amyloid A binds specific extracellular matrix glycoprotein and induces the adhesion of resting CD4+ cells. **J Immunol** 1996; 156: 1189-1195.
34. Hershkovich R, Preciado-Patt L, Fridlin M, Dastyk J, Metcalfe DD, Mekori Y.A. Extracellular matrix-anchored serum amyloid A preferentially induces mast cell adhesion. **Am J Physiol** 1997; 237: 179-187.
35. Su BS, Gong W, Gao LJ, Shen W, Murphy PM, Oppenheim JJ, Wang JM. A seven-transmembrane, G protein-coupled receptor, FPRL1, mediates the

- chemotactic activity of serum amyloid A for human phagocytic cells. **J Exp Med** 1999; 189: 395-402.
36. Badolato R, Wang JM, Murphy WJ, Michiel DF, Baussermann LL. Serum amyloid A is a chemoattractant: induction of migration, adhesion and tissue infiltration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes. **J Exp Med** 1994; 180: 203-209.
37. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Inflamação e reparação em **Patologia Estrutural e Funcional**. Ed Guanabara Koogan S.A. 45-83, 1996.
38. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborn B.A. Cells and organs of the immune system. In: **Immunology**. Ed Kubi 44-45, 2000.
39. Keane PM, Strieter RM. Chemokine signaling in inflammation. **Crit Care Med** 2000; 28: 13-26.
40. Scheleimer RP, Freeland HS, Peters SP, Brown KE, Derse CP. An assessment of the effects of glucocorticoids on degranulation, chemotaxis, binding to vascular endothelium and formation of leukotriene B₄ by purified human neutrophils. **J Pharmacol Exp Ther** 1989; 250: 598-605.
41. Huizinga TWJ, Roos D, Von Dm Borne AEG. Neutrophils Fcγ receptors: a two-way bridge in the immune system. **Blood** 1990; 75: 1211-1214.
42. Borregaard N, Lollike K, Kjeldsen L, Sengelov H, Bastholm L, Nielsen MH, Bainton DF. Human neutrophils granules and secretory vesicles. **Eur J Haematol** 1993; 51:187-198.
43. Mollinedo F, Borregaard N, Boxer AL. Novel trends in neutrophil structure, function and development. **Immunol Today** 1999; 20: 537-539.
44. Collota F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Antovani A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. **Blood** 1992; 80: 2012-2020.
45. Brach MA, De Vos S, Gruss HJD, Herrmann F. Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating

- factor is caused by inhibition of programmed cell death. **Blood** 1992; 80: 2920-2924.
46. Guthrie LA, Mcphail LC, Henson PM, Johnston RB. Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. **J Exp Med** 1984; 160: 1656-1671.
 47. Zhang JH, Ferrante A, Appigo AP, Dayer JM. Neutrophil stimulation and priming by direct contact with activated human T-lymphocytes. **J Immunol** 1992; 148: 177-181.
 48. Malech HL, Gallin JI. Current concepts immunology neutrophils in human diseases. **N Eng J Med** 1987; 317: 687-694.
 49. Babior BM. Protein phosphorylation and the respiratory burst. **Arch Biochem Biophys** 1988; 264: 361-367.
 50. Babior BM. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. **N Engl J Med** 1978; 298: 659-668.
 51. Babior BM. NADPH oxidase: an update. **Blood** 1999; 93: 1464-1476.
 52. Babior BM. The respiratory burst oxidase. **Adv Enzymol** 1992; 65: 49-95.
 53. Hapton M B; Kettle AJ, Winterbour CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood** 1998; 92: 3007-3017.
 54. Thelen M, Dewald B, Baggiolini M. Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst. **Physiol Rev** 1993; 73: 797-821.
 55. Dewald B, Thelen M, Baggiolini M. Two transduction sequences are necessary for neutrophils activation by receptor agonists. **J Biol Chem** 1988; 263: 16179-16184.
 56. Mcphail LC, Shirley PS, Claiton CC, Snyderman R. Activation of the respiratory burst enzyme from human neutrophils in a cell-free-system. **J Clin Invest** 1985; 75: 1735-1739.

57. Yu L, Quinn MT, Crooss AR, Dinuer MC. Gp91^{phox} is the heme binding subunit of the superoxide generating oxidase. **Proc Natl Acad Sci** 1998, 95: 7993-7998.
58. Dinuer MC, Pierce GAP, Cumutle JT, Orkin, SH. Human neutrophil cytochrome b light chain (p22phox): gene structure, chromosomal localization and mutation in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. **J Clin Invest** 1990; 88: 1729-1737.
59. Roos D, Boer M, Kurbauaski F. Mutation in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. **Blood** 1996; 87: 1663-1681.
60. Rada BK, Geiszt M, Bruggen RV, Nemet K, Roos D, Ligeti E. Calcium signaling is altered in myeloid cells with a deficiency in NADPH oxidase activity. **Clin Exp Immunol** 2003; 132: 53-60.
61. Tintinger GR, Theron AJ, Steel HC, Anderson R. Accelerated calcium influx and hyperactivation of neutrophils in chronic granulomatous disease. **Clin Exp Immunol** 2001; 123: 254-263.
62. Liu HL, Djeu JY. Role of cytokines in neutrophil functions. In: AGGARWAL, B.B., PURI, R., eds. Human cytokines: their role in disease and therapy. **Science** 1995; 71-86.
63. Henderson B, Poole S, Wilson M. Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis. **Microbiol Rev** 1996; 60: 316-341.
64. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Citocinas em **Imunologia Celular e Molecular**. Ed Revinter Ltda, 253-276, 1998.
65. Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. **N Engl J Med** 1998; 338: 436-445.
66. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. **Annu Rev Immunol** 1997; 15: 675-705.

67. Cassatella MA, Bazzoni F, Ceska M, Ferro I, Baggiolini M, Berton G. IL-8 production by human polymorphonuclear leukocytes. The chemoattractant formyl-methionil-leucil-phenylalanine induces the gene expression and release of IL-8 through a Pertussis toxin-sensitive pathway. **J Immunol** 1992; 148: 3216-3229.
68. Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. **FESBS** 1992; 307: 97-101.
69. Bischoff SC, Krieger M, Brunner T, Rot A, Von Tscharner V, Baggiolini M, Dahinden CA. RANTES and related chemokines activate human basophil Granulocyte through different G protein-coupled receptors. **Eur J Immunol** 1993; 23: 761-767.
70. Matthews N, Neate ML, Jackson SK, Stark JM. Tumour cell killing by tumor necrosis factor. Inhibition by anaerobic conditions, freeradical scavengers and inhibitors of arachidonate metabolism. **Immunol** 1987; 62: 153-155.
71. Wong GH, Elwell JH, Oberley LW, Goerddel DV. Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance by cytotoxicity of tumor necrosis factor. **Cell** 1989; 58: 923-931.
72. Cassatella MA. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. **Adv Immunol** 1999; 73: 369-509.
73. Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. **Annu Rev Immunol** 1998; 16: 27-55.
74. Oberholzer A, Olberholzer C, Lye L, Moldawer L. Cytokine signaling- regulation of the immune response in normal and critically ill states. **Crit Care Med** 2000, 28: 3-12.
75. Foxwell BM, Hunt AE, Lali FV, Smith C. Cytokine signaling in **Cytokine Molecular Biology** (Balkwill, F.) Ed Oxford University Press, 2000.
76. Waterman HW, Sha'afi RI. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor- α on tyrosine phosphorylation and activation of

- mitogen-activated protein kinase in human neutrophils. **Bioch J** 1995; 307: 39-45.
77. Marie C, Roman-Roman S, Rawadi GM. Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in interleukin-8 production by human monocytes and polymorphonuclear cells stimulated with lipopolysaccharide or mycoplasma fermentans membrane lipoproteins. **Infection and Immunity** 1999; 67:688-693.
78. Su B, Karin M. Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. **Curr Opin Immunol** 1996; 8: 402-411.
79. McDonald PP, Bald A, Cassatela MA. Activation of the NF-kB pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils. **Blood** 1997; 89: 3421-3433.
80. Scheck R, Albermann K, Baewerle PA. Nuclear factor kB: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells: a review. **Free Radical Res Commun** 1992; 17: 221-237.
81. Pahl HL, Baeuerle PA. The ERO overload response: activation of NF-kB. **TIBS** 1997; 22: 63-67.
82. Baeuerle PA, Baltimore D. I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. **Science** 1988; 242:540-546.
83. Scheck R, Meier B, Mannel DN, Droge W, Baeuerle PA. Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells. **J Exp Med** 1992; 175: 1181-1194.
84. Schreck R, Grassmann R, Fleckenstein B, Baeuerle PA. Antioxidants selectively suppress activation of NF-kappa B by human T-cell leukemia virus type I Tax protein. **J Virol** 1992; 66: 6288-6293.
85. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff K R, Watson DJ. Cell signaling in **Molecular Biology of the cell**, Ed Garland Publishing 721-782, 2003.
86. Marinissen M J, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. **Trends Pharmacol Sci** 2001; 22: 368-376.

87. Kaplan LA, Pesce AJ. **Clinical Chemistry, Theory, Analysis and Correlation**. Second Edition 436-454. Ed Mosby, 1989.
88. Sudhir V, Wallin JD, Eilen SD. Chemiluminescence and superoxide anion production by leukocytes from diabetic patients. **J Clin endocrinol Metab** 1983; 57: 402-409.
89. Marhoffer W, Stein M, Schleinkofer L, Federlin K. Monitoring of polymorphonuclear leukocyte functions in diabetes mellitus--a comparative study of conventional radiometric function tests and low-light imaging systems. **J Biolumin Chemilumin** 1994; 9:165-170.
90. Marhoffer W, Stein M, Schleinkofer L, Federlin K. Evidence of ex vivo and in vitro impaired neutrophil oxidative burst and phagocytic capacity in type 1 diabetes mellitus. **Diabetes Res Clin Pract** 1993; 19:183-188.
91. Sannomiya P, Pereira MA, Garcia-Leme J. Inhibition of leukocyte chemotaxis by serum factor in diabetes mellitus: selective depression of cell responses mediated by complement-derived chemoattractants. **Agents Actions** 1990; 30: 369-376.
92. Sawant JM, Biochemical changes in polymorphonuclear leucocytes in diabetic patients. **J Postgrad Med** 1993; 39:183-186.
93. Glowacka E, Banasik M, Lewkowicz P, Tchorzewski H. The effect of LPS on neutrophils from patients with high risk of type 1 diabetes mellitus in relation to IL-8, IL-10 and IL-12 production and apoptosis in vitro. **Scand J Immunol** 2002; 55: 210-217.
94. Tennenberg SD, Finkenauer R, Dwivedi A. Absence of lipopolysaccharide-induced inhibition of neutrophil apoptosis in patients with diabetes. **Arch Surg** 1999; 134:1229-1234.
95. Vlassara H, Cucala R, Stricker L. Biology of disease; Pathogenic effects of advanced glycosylation: Biochemical, biologic and clinical implications for diabetes and aging. **Lab Invest** 1994; 70: 138-151.

96. Makita Z, Radoff S, Rayfield EJ. Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. **New Engl J Med** 1991; 325: 836-842.
97. Yagihashi S, Kamijo H, Yamamoto Y. Advanced glycation end products driven angiogenesis in vivo. Induction of the growth and tube formation of human microvascular endothelial cells through autocrine vascular endothelial growth factors. **J Biol Chem** 1997; 272: 8723-8730.
98. Yagihashi S, Kamijo M, Baba M. Effect of aminoguanidine on functional and structural abnormalities in peripheral nerve of STZ-induced diabetic rats. **Diabetes** 1992; 41: 47-52.
99. Lin Y, Rajala MN, Berger JP, Moller DE, Barzilai N, Scherer PE. Hyperglycemia-induced production of acute phase reactants in adipose tissue. **Biol Chem** 2001; 9: 42077-42083.
100. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. **Scand J Clin Lab Invest** 1968; 21: 77-89.
101. Koenderman L, Yazdanbakhsh M, Roos D, Verhoeven AJ. Dual mechanism in priming of the chemoattractant-induced respiratory burst in human granulocytes: A Ca^{+2} dependent and a Ca^{+2} independent routes. **J Immunol** 1989; 142: 623-628.
102. Boydem S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen in polymorphonuclear leukocytes. **J Exp Med Biol** 1962; 115: 453-466.
103. Badolato R, Johnston JA, Wang JM, Mcvillar D, Xu LL, Oppenheim JJ, Kelvin DJ. Serum amyloid A induces calcium mobilization and chemotaxis of human monocytes by activating a pertussis toxin-sensitive signaling pathway. **J Immunol** 1995; 155: 4004-4010.
104. Arcaro A, Wymann MP. Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. **Biochem J** 1993; 296: 297-301.

105. Okada T, Sukama L, Fukui Y, Hazeki O, Ui M. Blockage of chemotactic peptide-induced stimulation of neutrophils by wortmannin as a result of selective inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase. **J Biol Chem** 1994; 269: 3563-3567.
106. Vlahos CJ, Matter WF, Brown RF, Traynor-Kaplan AE, Heyworth PG, Prossnitz ER, Ye RD, Marder P, Schelm JÁ, Rothluss. K.J. Investigation of neutrophil signal transduction using a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase. **J Immunol** 1995; 154: 2413-2422.
107. Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltieri, AR. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. **J Biol Chem** 1995; 270: 27489-27494.
108. Debczynski W, Pietruska Z. Chemotaxis and spontaneous migration of neutrophil leukocytes from patients with diabetes. **Pol Tyg Lek** 1994; 17: 11-13.
109. Ribeiro FP. Efeito das apolipoproteínas APO A-I, APO A-II e APO SAA sobre as funções de neutrófilos. Dissertação (mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Orientador Campa A. São Paulo, 2001; 71p.
110. Huizinga TW, Ross D, Borne KAEG. Neutrophils Fc γ receptors: a two-way bridge in the immune system. **Blood** 1990; 75: 1211-1214.
111. Leino L, Lilius EM. The up- and dow-modulation of immunoglobulin G Fc receptors and complement receptors on activated neutrophils depends on the nature of the activator. **J Leukoc Biol** 1992; 51: 157-163.
112. Badolato R, Wang JM, Stornello SL, Ponzi AN, Duse M, Musso T. Serum amyloid A is an activator of PMN antimicrobial functions: induction of degranulation, phagocytosis, and enhancement of anti-Candida activity. **J Leukoc Biol** 2000; 67: 381-386.

113. Biran H, Friedman N, Neumann L, Pras M, Shainkin-Kestenbaum R. Serum amyloid A (SAA) variations in patients with cancer: correlation with disease activity, stage, primary site, and prognosis. **J Clin Pathol** 1986; 39: 794-797.
114. Kuhns DB, Young HA, Gallin EK, Gallin JI. Ca²⁺-dependent production and release of IL-8 in human neutrophils. **J Immunol** 1998; 161: 4332-4339.
115. Duby JJ, Campbell RK, Setter SM, White JR, Rasmussen KA. Diabetic neuropathy: an intensive review. **Am J Health Syst Pharm** 2004; 15:160-173.
116. Dandona P, Kumar V, Aljada A, Ghanim H, Syed T, Hofmayer D, Mohanty P, Tripathy D, Garg R. Angiotensin II receptor blocker valsartan suppresses reactive oxygen species generation in leukocytes, nuclear factor-kappa B, in mononuclear cells of normal subjects: evidence of an antiinflammatory action. **J Clin Endocrinol Metab** 2003; 88: 4496-4501.
117. Walder K, Kantham L, Mcmillan J S, Trevaskis J, Kerr L, Silva A, Sunderland T, Godde N, Gao Y, Bishara N, Windmill K, Tenne-Brown J, Auger G, Zimmet PZ, Collier G R. Tanis: A link between type 2 diabetes and inflammation? **Diabetes** 2002; 51:1859-1866.
118. Leinonen E, Hurt-Camejo E, Wiklund O, Hulten LM, Hiukka A, Taskinen MR. Insulin resistance and adiposity correlate with acute-phase reaction and soluble cell adhesion molecules in type 2 diabetes. **Atherosclerosis** 2003; 166:387-394.
119. Pickup JC, Mattock MB. Activation of the innate immune system as a predictor of cardiovascular mortality in Type 2 diabetes mellitus. **Diabet Med** 2003; 20: 723-726.
120. Lopes-Virella MF, Virella G. The role of immune and inflammatory processes in the development of macrovascular disease in diabetes. **Front Biosci** 2003; 8: 750-768.
121. Khan ZA, Chakrabarti S. Growth factors in proliferative diabetic retinopathy. **Exp Diabetes Res** 2003; 4:287-301.

122. Yuuki T, Kanda T, Kimura Y, Kotajima N, Tamura J, Kobayashi I, Kishi S.J. Inflammatory cytokines in vitreous fluid and serum of patients with diabetic vitreoretinopathy. **J Diabetes Complications** 2001; 15:257-259.
123. Skundric DS, Lisak RP. Role of neuropoietic cytokines in development and progression of diabeticpolyneuropathy: from glucose metabolism to neurodegeneration. **Exp Diabetes Res** 2003; 4:303-312.
124. Barouch FC, Miyamoto K, Allport JR, Fujita K, Bursell SE, Aiello LP, Luscinskas FW, Adamis AP. Integrin-mediated neutrophil adhesion and retinal leukostasis in diabetes. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 2000; 41:1153-1158.
125. Karadayi K, Top C, Gulecek O. The relationship between soluble L-selectin and the development of diabetic retinopathy. **Ocul Immunol Inflamm** 2003; 11:123-129.
126. Lowell C, Berton G, Noonan DM, Cassatella MA. CXCL1/Macrophage Inflammatory Protein-2-Induced Angiogenesis In Vivo Is Mediated by Neutrophil-Derived Vascular Endothelial Growth Factor-A. **J Immunol** 2004; 15: 5034-5040.
127. Krol E, Agueel R, Banue S, Smogorzewski M, Kumar D, Massry SG. Amlodipine reverses the elevation in $[Ca^{2+}]_i$ and the impairment of phagocytosis in PMNLs of NIDDM patients. **Kidney Int** 2003; 64:2188-2195.
128. Alexiewicz JM, Kumar D, Smogorzewski M, Massry SG. Elevated cytosolic calcium and impaired proliferation of B lymphocytes in type II diabetes mellitus. **Am J Kidney Dis** 1997; 30:98-104.
129. Seyrek N, Marcinkowski W, Smogorzewski M, Demerdash TM, Massry SG. Amlodipine prevents and reverses the elevation in $[Ca^{2+}]_i$ and the impaired phagocytosis of PMNL of diabetic rats. **Nephrol Dial Transplant** 1997; 12:265-272.
130. Demerdash TM, Seyrek N, Smogorzewski M, Marcinkowski W, Nasser-Moadelli S, Massry SG. Pathways through which glucose induces a rise in

- [Ca²⁺]_i of polymorphonuclear leukocytes of rats. **Kidney Int** 1996; 50:2032-2040.
131. Malle E, Bollmann A, Steinmetz A, Gemsa D, Leis HJ, Sattler W. Serum amyloid A (SAA) protein enhances formation of cyclooxygenase metabolites of activated human monocytes. **FEBS Lett** 1997; 419:215-219.
 132. Fyfe AI, Rothenberg LS, DeBeer FC, Cantor RM, Rotter JI, Lusis AJ. Association between serum amyloid A proteins and coronary artery disease: evidence from two distinct arteriosclerotic processes. **Circulation** 1997; 96:2914-2919.
 133. Meek RL, Urieli-Shoval S, Benditt EP. Expression of apolipoprotein serum amyloid A mRNA in human atherosclerotic lesions and cultured vascular cells: implications for serum amyloid A function. **Proc Natl Acad Sci** 1994; 91:3186-3190.
 134. Fiotti N, Giansante C, Ponte E, Delbello C, Calabrese S, Zacchi T, Dobrina A, Guarnieri G. Patterns of cytokine regulation in patients with peripheral arterial disease. **Atherosclerosis**. 1999; 145:51-60.
 135. Clark A, Wells CA, Buley ID, Cruickshank JK, Vanhegan RI, Malthews DR, Cooper GJS, Holman RR, Turner RC. Islet amyloid increased A-cells, reduced B-cells and exocrine fibrosis quantitative changes in the pancreas in type-2 diabetes. **Diabetes Res** 1988; 9:151-159.
 136. Kahn SE, Andrikopoulos S, Verchere CB. Islet amyloid: a long-recognized but underappreciated pathological feature of type 2 diabetes, **Diabetes** 1999; 48: 241-253.
 137. Hull RL, Westermarck GT, Westermarck P, Kahn S. Islet Amyloid: A critical entity in the pathogenesis of type 2 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab** 2004; 89: 3629-3643.
 138. Buxbaum JN. The systemic amyloidoses. **Curr Opin Rheumatol** 2004; 16:67-75.

139. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. **Biochem Biophys Res Commun** 1984; 120:885-890.
140. Glenner GG, Wong CW, Quaranta V, Eanes ED. The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. **Appl Pathol** 1984; 2:357-369.
141. Sletten K, Westermark P, Natvig JB. Characterization of amyloid fibril proteins from medullary carcinoma of the thyroid. **J Exp Med** 1976; 143:993-998.
142. Grinstein S, Woodside M, Sardet C, Pouyssegur J, Rotin D. Activation of the Na⁺/H⁺ antiporter during cell volume regulation. Evidence for a phosphorylation-independent mechanism. **J Biol Chem** 1992; 267:23823-23828.
143. Parker JC. **Am J Physiol** In defense of cell volume? 1993; 265:C1191-C1200.
144. Sarkadi B, Parker JC. Activation of ion transport pathways by changes in cell volume. **Biochim Biophys Acta** 1991; 1071:407-427.
145. Rosette C, Karin M. Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. **Science** 1996; 274):1194-1197.
146. Krump E, Nikitas K, Grinstein S J. Induction of tyrosine phosphorylation and Na⁺/H⁺ exchanger activation during shrinkage of human neutrophils. **Biol Chem** 1997; 272:17303-17311.
147. Aharonovitz O, Zaun HC, Balla T, York JD, Orlowski J, Grinstein S. Intracellular pH regulation by Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchange requires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. **J Cell Biol** 2000; 150:213-224.
148. Bianchini L, Woodside M, Sardet C, Pouyssegur J, Takai A, Grinstein S. Okadaic acid, a phosphatase inhibitor, induces activation and phosphorylation of the Na⁺/H⁺ antiport. **J Biol Chem** 1991; 266:15406-15413.

149. Velasco IT, Pontieri V, Rocha E, Silva M Jr, Lopes OU. Hyperosmotic NaCl and severe hemorrhagic shock. **Am J Physiol** 1980; 239: 664-673.
150. Mattox kl, Maningas PA, Moore EE, Mateer JR, Marx JA, Aprahamian C. Prehospital hypertonic saline/dextran infusion for post-traumatic hypotension. **Ann Surg** 1991, 213:482-491.
151. Kreimeier U, Theil M, Peter K, Messmer K. Small-volume hyperosmolar resuscitation. **Acta Anaesthesiol Scand** 1997, 111:302-306.
152. Shires, GT, AE Barber, HP Illner. Current status of resuscitation: solutions including hypertonic saline. **Adv Surg** 1995; 28:133-170.
153. Moore FA, Moore EE. Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. **Surg Clin North Am** 1995, 75: 257-277.
154. Beal AL, Cerra FB. Multiple organ failure syndrome in the 1990s. Systemic inflammatory response and organ dysfunction. **JAMA** 1994; 271:226-233.
155. Faist, E, Baue AE, Dittmer H, Heberer G. Multiple organ failure in polytrauma patients. **J Trauma** 1983; 23:775..
156. Coimbra RDB. Hoyt WG, Junger N, Angle P. Wolf, Loomis WH, Evers MF. Hypertonic saline resuscitation decreases susceptibility to sepsis after hemorrhagic shock. **J Trauma** 1997; 42:602-606.
157. Botha, AJ, Moore FA, Moore EE, Fontes B, Banerjee A, Peterson VM. Postinjury neutrophil priming and activation states: therapeutic challenges. **Shock** 1995, 3:157-166..
158. Fan J, Marshall JC, Jimenez MF, Shek PN, Zagorski J, Rotstein OD. Hemorrhagic shock primes for increased expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant in the lung: role in pulmonary inflammation following lipopolysaccharide. **J Immunol** 1998; 161:440-447.
159. Powers KA, Woo J, Khadaroo RG, Papia G, Kapus A, Rotstein Ori D. Hypertonic resuscitation of hemorrhagic shock upregulates the anti-inflammatory response by alveolar macrophages. **Surgery** 2003; 134:312-318.

160. Kishimoto, TK, Rothlein R. Integrins, ICAMs, and selectins: role and regulation of adhesion molecules in neutrophil recruitment to inflammatory sites. **Adv Pharmacol** 1994; 25:117-169..
161. Walcheck BJ, Kahn JM, Fisher BB, Wang RS. Fisk DG, Payan C, Feehan R, Betageri K, Darlak AF. Neutrophil rolling altered by inhibition of L-selectin shedding in vitro. **Nature** 1996; 380:720-723.
162. Philips MR, Buoy JP, Winchester R, Weissmann G, Abramson SB. Up-regulation of the iC3b receptor (CR3) is neither necessary nor sufficient to promote neutrophil aggregation. **J Clin Invest** 1988; 82: 495-501..
163. Junger WG, Coimbra R, Liu FC, Herdon-Remelius C, Junger W, Junger H, Loomis WH, Hoyt DB, Altman A. Hypertonic saline resuscitation: a tool to modulate immune function in trauma patients? **Shock** 1997; 8:235-241..
164. Angle NDB, Hoyt R, Coimbra FC, Liu C, Herdon-Remelius WH, Loomis W. Junger. Hypertonic saline resuscitation diminishes lung injury by suppressing neutrophil activation after hemorrhagic shock. **Shock** 1998; 9:164-170..

ANEXOS

2 Anexo I: Medicação

aciente	Complicação	Medicação		
		Inibidores da ECA/Angiotensina	Inibidores de Cox	Outros
1	sim	captopril	AAS	atenolol, hidroclorotiazida, insulina
2	sim	enalapril	AAS	metformina
3	sim	enalapril	AAS	hidroclorotiazida, cinvastatina
4	não	-	AAS	metformina, propranolol
5	sim	candesartano	AAS	insulina
6	sim	-		glibenclamida, nifedipino, furosemida
7	sim	-		insulina
8	não	-		glibenclamida, metformina, propranolol
9	não			metformina
10	sim	enalapril	AAS	insulina
11	sim	captopril	AAS	atenolol, insulina
12	não	captopril	AAS	atenolol, insulina, hidroclorotiazida
13	não	enalapril		glibenclamida
14	não	-		glibenclamida, hidroclorotiazida
15	sim	captopril		insulina, atenolol
16	sim	enalapril		metformina
17	sim	-		metformina, nifedipina, pravastatina
18	não	-		insulina
19	sim	captopril	AAS	nifedipina, insulina, propranolol
20	sim	-	AAS	insulina, hidroclorotiazida
21	sim	enalapril	AAS	insulina, metformina
22	não	enalapril		insulina, simvastatina
23	não	enalapril		
24	não			insulina
25	não			metformina
26	não			
27	não		AAS	
28	não			insulin
29	não			
30	não		AAS	glibenclamida
31	não			propranolol, glibenclamida
32	sim	captopril	AAS	propranolol, glibenclamida
33	não			metformina

13 Anexo II: Aprovação do Comitê de Ética HU-USP

São Paulo, 7 de outubro de 2002.

Il^{mo(a)}. Sr^{ta}.

Elaine Hatanaka

Praça Santo Epifânio, 349

Vila Indiana

05586-070 São Paulo - SP

Referente: Projeto de Pesquisa “Efeito da amilóide sérica A sobre a função de neutrófilos de pacientes diabéticos” – **Cadastro:** 298/02

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião de 4 de outubro de 2002, analisou o projeto de pesquisa acima citado, considerando-o como APROVADO, assim como o Termo de Consentimento Pós-Informado.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios parciais (a cada 90 dias) e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde 196 de 10-10-1996, inciso IX, letra “c”).

O primeiro relatório do referido projeto está previsto para **4 de janeiro de 2003**.

Atenciosamente,

Dr. Sérgio Gomes de Souza
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

c/cópia para a Divisão de Clínica Médica

4 Anexo III: Aprovação do Comitê de Ética FCF-USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 62

São Paulo, 24 de junho de 2003.

Ilmo(a) Sr(a).
Elaine Hatanaka

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 23 de junho p.passado, **APROVOU** o projeto "Efeito da Amiloide sérica A sobre a função de neutrófilos de pacientes diabéticos" (Protocolo nº 178) apresentado por Vossa Senhoria.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 - item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Prof. Tit. Dulcinéia Saes Parra Abdalla
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP

Orientador: Prof. Ana Campa
FBC

15 Anexo IV: Termo de Consentimento Pós Informação

São Paulo, _____ de _____ de 20 ____.

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Eu, _____
RG nº _____, declaro que após convenientemente esclarecido e tendo entendido o que me foi explicado, consinto em participar do protocolo de pesquisa **“Efeito da Amilóide Sérica A sobre a função de neutrófilos de pacientes diabéticos”**, que utilizará amostras de sangue e de plasma. Essas amostras serão coletadas se houver indicação médica. O objetivo desse estudo é avaliar a função da apolipoproteína amilóide sérica A na função de neutrófilos e a identificação de produtos de glicação da SAA. Tendo sido devidamente esclarecido que tal participação não apresenta dano à saúde e podendo retirar o consentimento a qualquer momento, sem que isto traga prejuízo a continuidade de assistência.

Assinatura da Paciente ou Responsável Legal

Elaine Hatanaka
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
Telefone: 3091-3637

Dra. Patrícia Teófilo Monteagudo
Departamento de Clínica Médica
Hospital Universitário- USP

Dr. Mauro Sérgio Martins Marrocos
Departamento de Clínica Médica
Hospital Universitário- USP

16 Anexo V: Identificação dos Pacientes do Projeto de Pesquisa**IDENTIFICAÇÃO DOS PACIENTES DO PROJETO DE PESQUISA:*****Efeito da Amilóide Sérica A sobre a função de neutrófilos de pacientes diabéticos***

NOME: _____

Endereço: _____ Telefone: _____

Atendimento HU nº: _____ Cor: _____ Data de Nasc: _____

Sexo: ☐ feminino ☐ masculinoEstado civil: ☐ casado(a) ☐ solteiro(a) ☐ viúvo(a) ☐ amasiado(a)

Exame físico: Peso: _____ Altura: _____ Pressão arterial: _____ Freq. cardíaca: _____

Alterações: _____

Antecedentes pessoais: _____

Hipertensão Arterial Sistêmica: sim não - tempo/medicação: _____

Diabetes Mellitus: sim não - tempo/medicação: _____

Tabagismo: nunca fumou parou fuma - tempo: _____

Outras patologias: _____

Dados laboratoriais: _____

Medicação: _____

Intercorrências Clínicas: _____