

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Concentração Análises Clínicas

**Avaliação da Anexina V e Calceína AM como Marcadores de
Apoptose em Linfócitos**

Priscila Rodrigues Palma

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

Orientador
Prof. Dr. Arício Treitinger

Florianópolis
2005

Priscila Rodrigues Palma

Avaliação da Anexina V e Calceína AM como Marcadores de Apoptose em Linfócitos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Celso Spada
1º examinador

Profa. Dra. Kioko Takei
2º examinador

Prof. Dr. Edelson Flávio Morato
3º examinador

Florianópolis, 30 de março de 2005

Aos meus pais, José Américo e Maria Emília, pelo amor, carinho e incentivo sempre dispensados, que sem os quais, esta jornada não seria possível.

Aos meus irmãos Fabiano, Eduardo e José Américo pelo apoio à minha formação.

A Emmanuel Costa, pela compreensão e carinho dispensados ao longo desta jornada.

Ao Professor Arício Treitinger, pela orientação e apoio.

Ao Professor Paulo José Ogliari, pelo apoio e colaboração.

Aos Mestrandos Juliano Anderson Pacheco e Renata da Silva pela amizade, apoio e colaboração.

Aos amigos Bolivar Soares, Irma Luiza Christmann, Maria Regina Cataldo e Carolina Peruzzo Pereira pelo apoio e carinho.

Aos portadores do HIV, que colaboraram com este estudo, pelas lições de esperança.

A vocês, que dedico este trabalho, meus mais profundos e sinceros agradecimentos.

EXPRESSO MINHA SINCERA GRATIDÃO E CARINHO

À Universidade Federal de Santa Catarina, em nome do seu Reitor, professor Lucio José Botelho.

Ao Centro de Ciências da Saúde, em nome do seu diretor, professor Cléo Nunes de Sousa.

Ao departamento de Análises Clínicas, em nome do professor Arício Treitinger, chefe do departamento.

Ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da UFSC, em nome de seu chefe, professora Maria de Lourdes Rovaris.

Ao Hemocentro do Estado de Santa Catarina (HEMOSC) de Florianópolis, em nome de seu diretor, Dr. Guilherme Genovez.

Ao FUNPESQUISA, pelo fornecimento dos conjuntos reagentes.

À equipe de coleta do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da UFSC, pelo apoio e triagem dos pacientes.

À Médica Sílvia I. A. C. de Pires Ferreira e à Farmacêutica Renata da Silva pelo apoio na realização dos ensaios de viabilidade e apoptose celular.

Às professoras Maria Cláudia dos Santos, Maria Luiza Bazzo e Tânia Beatriz Creczynski Pasa pela colaboração profissional.

Aos colegas Giovana Baggio e Joel Cunha pelo apoio a este trabalho.

Ao professor Paulo José Olgliari e ao Mestrando Juliano Anderson Pacheco, pelo apoio na análise estatística dos resultados.

OBRIGADO

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações gerais	1
1.2 Principais Mediadores de Apoptose e Alterações Celulares	5
1.2.1 Indução do processo apoptótico por linfócitos “T” citotóxicos.....	9
1.2.2 Indução da apoptose por quimioterapia, radiação ultravioleta, radiação ionizante, hipóxia e falta de estímulos de sobrevivência	10
1.2.3 Apoptose mediada pela família de proteínas Bcl-2.....	10
1.2.4 Moléculas regulatórias anti-apoptóticas.....	11
1.3 Indução da apoptose de linfócitos CD4 e CD8 na infecção pelo HIV	11
1.3.1 Alterações moleculares mediadas pelo HIV	12
1.4 Métodos de Detecção da Apoptose.....	13
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Casuística.....	20
3.2 Coleta de material biológico	20
3.3 Isolamento das células mononucleares.....	21
3.4 Manutenção das células mononucleares.....	21
3.5 Ensaio para verificação da viabilidade e apoptose dos linfócitos	22
3.5.1 Marcação das células com o conjunto reativo ANNEXIN V-FITC® e iodeto de propídio.....	23
3.5.2 Marcação das células com o conjunto reativo <i>LIVE/DEAD</i> ® contendo calceína AM e homodímero de etídio (EthD-1).....	23
3.5.3 Avaliação da viabilidade e apoptose dos linfócitos por citometria de fluxo	24
3.6 Análise estatística.....	32
4. RESULTADOS	34
4.1 Análise descritiva.....	34
4.2 Análise inferencial	35
4.2.1 Avaliação das correlações entre os resultados obtidos para calceína AM/homodímero de etídio e anexina V-FITC/iodeto de propídio após 24 horas de incubação	35

4.2.2 Avaliação das correlações entre os resultados obtidos para calceína AM/homodímero de etídio e anexina V-FITC/iodeto de propídio após 48 horas de incubação	35
4.2.3 Quantificação de linfócitos viáveis após 24 horas de incubação	39
4.2.4 Quantificação de linfócitos em apoptose após 24 horas de incubação	40
4.2.5 Quantificação de linfócitos inviáveis após 24 horas de incubação	41
4.2.6 Quantificação de linfócitos viáveis após 48 horas de incubação	42
4.2.7 Quantificação de linfócitos em apoptose após 48 horas de incubação	43
4.2.8 Quantificação de linfócitos inviáveis após 48 horas de incubação	44
5. DISCUSSÃO	45
6. CONCLUSÕES	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
ANEXO 1	70
APÊNDICE 1	73
APÊNDICE 2	76

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Principais diferenças entre os processos de morte celular.	2
FIGURA 2. Morfogênese e separação dos dedos.	3
FIGURA 3. Apoptose: formação e remoção de corpos apoptóticos.	6
FIGURA 4. Representação da apoptose e seus principais mediadores.	8
FIGURA 5. Ligação da anexina V aos resíduos de fosfatidilserina.	17
FIGURA 6. Conversão da calceína AM por esterases intracelulares.	18
FIGURA 7. Citômetro de fluxo, modelo FACSCallibur.	24
FIGURA 8. Seleção de células e/ou estruturas marcadas com Anexina V-FITC/PI, através do programa CELLQuest.	25
FIGURA 9. Seleção de células e/ou estruturas marcadas com Calceína AM/EthD-1, através do programa CELLQuest.	26
FIGURA 10. Distribuição das células selecionadas, através do CELLQuest, de acordo com a intensidade da marcação pela anexina e/ou iodeto de propídio. .	27
FIGURA 11. Distribuição das células selecionadas, através do CELLQuest, de acordo com a intensidade da marcação pela calceína AM e/ou Homodímero de Etídio.	28
FIGURA 12. Células selecionadas e analisadas através do PAINT A GATE, marcadas pela anexina e/ou iodeto de propídio.	28
FIGURA 13. Células selecionadas e analisadas através do PAINT A GATE, marcadas pela calceína e/ou homodímero de etídio.	29
FIGURA 14. Distribuição dos linfócitos, de acordo com a intensidade de sua marcação pela anexina e/ou iodeto de propídio.	29
FIGURA 15. Distribuição dos linfócitos, de acordo com a intensidade de sua marcação pela calceína e/ou homodímero de etídio.	30
FIGURA 16. Resultado final da avaliação da viabilidade e apoptose de linfócitos, marcados com anexina e/ou iodeto de propídio.	32
FIGURA 17. Resultado final da avaliação da viabilidade e apoptose de linfócitos, marcados com calceína AM e/ou homodímero de etídio.	32
FIGURA 18. Correlação entre níveis de linfócitos viáveis obtidos após 24 horas. ...	36
FIGURA 19. Correlação entre níveis de linfócitos em apoptose obtidos 24 horas. ...	36
FIGURA 20. Correlação entre níveis de linfócitos inviáveis obtidos 24 horas.	37
FIGURA 21. Correlação entre níveis de linfócitos viáveis obtidos após 48 horas. ...	37

FIGURA 22. Correlação entre níveis de linfócitos em apoptose obtidos após 48 horas.....	38
FIGURA 23. Correlação entre níveis de linfócitos inviáveis obtidos após 48 horas.	38
FIGURA 24. Valor percentual médio de células viáveis obtidas após 24 horas de incubação.	39
FIGURA 25. Valor percentual médio de células apoptóticas obtidas após 24 horas de incubação.	40
FIGURA 26. Valor percentual médio de células inviáveis obtidas após 24 horas de incubação.	41
FIGURA 27. Valor percentual médio de células viáveis obtidas após 48 horas de incubação.	42
FIGURA 28. Valor percentual médio de células apoptóticas obtidas após 48 horas de incubação.	43
FIGURA 29. Valor percentual médio de células inviáveis obtidas após 48 horas de incubação.	44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Patologias associadas à apoptose anormal.....	5
TABELA 2. Categorias de alterações celulares que formam a base dos ensaios de detecção da apoptose.	15
TABELA 3. Estatísticas descritivas, com tempo de incubação de 24 horas.....	34
TABELA 4. Estatísticas descritivas, com tempo de incubação de 48 horas.. ..	34
TABELA 5. Dados e estatísticas descritivas para o tempo de incubação de 24hs..	74
TABELA 6. Dados e estatísticas descritivas para o tempo de incubação de 48hs..	75
TABELA 7. Estatísticas descritivas de células viáveis – 24hs	77
TABELA 8. Estatísticas descritivas de células em apoptose – 24hs	77
TABELA 9. Estatísticas descritivas de células inviáveis – 24hs	77
TABELA 10. Estatísticas descritivas de células viáveis – 48hs	78
TABELA 11. Estatísticas descritivas de células em apoptose –48hs	78
TABELA 12. Estatísticas descritivas de células inviáveis – 48hs	78

ABREVIATURAS

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AO: *Acridine orange*; alaranjado de acridina
Apaf-1: Fator de ativação de proteases pró-apoptóticas
APO 3L: Ligante APO3 do recetor DR
ATP: Adenosina Trifosfato
CAD: Dnase caspase ativada
Calceína AM: Acetóxi-metil éster de calceína
cFLIP: Proteína inibitória homóloga a FLICE
CPP32: caspase3
CTL: Linfócitos T citotóxicos
dATP: 2'-deoxiadenosina 5'-trifosfato
DED: Domínio efetor de morte
DISC: Complexo sinalizador de indução da morte
DNA: Ácido desoxirribonucléico
DR3: Recepto de morte tipo 3
EB: Brometo de etídio
EthD-1: Homodímeri-1 de Etídio
FAAD: Domínio de morte associado aoFas
FasL: Ligante Fas
FITC: Isotiocianato de fluoresceína
FLASH: Proteína FLICE associada
FLICE: caspase 8
FLIP: Proteína inibitória a FLICE
FSC: Dispersão dianteira
gp 120: Glicoproteína 120
HIV: Vírus da Imunodeficiência Adquirida
IAP: Proteínas indutoras da apoptose
IL-1: Interleucina 1
IL-2: Interleucina 2
IL-6: Interleucina 6
IL-12: Interleucina 12

ISNT: Transferência de marcação *in situ*

MACH: caspase 8

Mach5: caspase 8

MAP *kinase*: Proteína cinase ativada por mitógeno

Mort-1: Domínio de morte associado ao Fas

NF- κ B: Fator de necrose tumoral κ B

PI: Iodeto de propídio

PI-3: Inositol 1,4,5 trifosfato

PS: Fosfatidilserina

RIP: Proteína de interação com o receptor

RNA: Ácido ribonucléico

SSC: Dispersão lateral

tat: Proteína regulatória da transcrição viral

TCD3: Receptor CD3 de superfície de células T

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

TNFR: Receptor 1 do fator de necrose tumoral

TRAAD: Domínio de morte TNFR1

TRAF-2: Fator 2 associado ao TNFR

TRAIL/APO-2L: Ligantes indutores da apoptose relacionado ao TNF dos tipos 1 e 2.

TRAIL R/1: Receptor TRAIL do tipo 1

TRAIL R/2: Receptor TRAIL do tipo 2

TUNEL: Marcação e classificação da porção deoxinucleotidiltransferase terminal mediado por biotina-dUTP

7-AAD: 7-aminoactinomicina D

RESUMO

A avaliação dos níveis de apoptose por citometria de fluxo é geralmente realizada por métodos que utilizam anexina V-FITC como marcador vital, que se associa aos resíduos de fosfatidilserina, externalizados no início do processo apoptótico. A utilização conjunta do marcador nuclear fluorescente iodeto de propídio (PI), por sua vez, torna possível verificar as alterações nucleares características dos estágios tardios da apoptose, como resultado do aumento da permeabilidade de membrana. Por outro lado, a utilização de calceína AM e homodímero de etídio (EthD-1) permite a verificação da apoptose através da detecção da diminuição de atividade esterásica intracelular e alterações físico-químicas na membrana celular, através do EthD-1, que combina-se à cromatina à medida que esta se torna condensada. O objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar a sensibilidade na avaliação precoce da apoptose dos métodos que utilizam calceína AM e homodímero de etídio aqueles que utilizam anexina V FITC e iodeto de propídio, tomado como método de referência, a partir da marcação de células mononucleares periféricas de pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV). As análises por citometria de fluxo foram realizadas após os períodos de incubação de 24 e 48 horas em meio RPMI 1640. Os resultados demonstraram que a metodologia que utiliza calceína AM/ homodímero de etídio apresentou-se mais sensível na quantificação das células apoptóticas em ambos períodos de incubação (Média 46,95% \pm 3,56, $p < 0,0001$, para 24 horas e Média 37,67% \pm 2,47, $p < 0,0014$ para 48 horas), além de permitir definir com clareza as populações de células viáveis, em apoptose e inviáveis. Tendo em vista que a regulação anormal do processo de morte celular por apoptose está envolvida na patogênese de diversas desordens, incluindo a progressão da infecção pelo HIV, o emprego de metodologias sensíveis de avaliação desse processo, como a calceína AM-EthD-1, pode resultar em importante mecanismo de acompanhamento da progressão de doenças.

ABSTRACT

“Evaluation of Annexin-V and Calcein-AM as Markers of Lymphocytes Apoptosis”.

The evaluation of apoptosis levels by flow cytometry is generally accomplished by methods that use annexin V-FITC as vital dye, which binds to negatively charged phospholipids like phosphatidylserine, exposed on the outer leaflet at the beginning of apoptotic process. In addition, the concomitant uses of nuclear fluorescent dye propidium iodide (PI) turns possible verify the nuclear alterations characteristics of the late apoptosis stages, since the membrane permeability increases. On the other hand, the use of calcein AM and ethidium homodimer (EthD-1) allows the apoptosis evaluation through detection of esterase activity decrease and cellular membrane physical-chemical alterations, through EthD-1, which binds to chromatin as this one become condensed. The objective of this study was compare the sensibility of the methods that use calcein AM and ethidium homodimer with those that use annexin V-FITC and propidium iodide for early apoptosis evaluation, by peripheral blood mononuclear cells cultures, kept on RPMI1640 half, obtained from HIV-infected patients. Apoptosis and cellular viability were detected and quantified by flow cytometry after 24 and 48 hours incubation times. The results showed that calcein AM/ethidium homodimer methodology was more sensitive for apoptotic cells quantification in both incubation times than annexin V FITC/propidium iodide (Mean $46.95\% \pm 3.56$, $p < 0.0001$, for 24 hours and Mean $37.67\% \pm 2.47$, $p < 0.0014$ for 48 hours), besides allowing to clearly define the viable, apoptotic and dead cell populations. Since the abnormal regulation of apoptotic process is involved with several disorders pathogenesis, including HIV infection progress, the employment of sensitive apoptosis evaluation methods, as calcein AM-EthD-1, could result on important mechanism of diseases progress accompaniment.

Key words: apoptosis, HIV, flow cytometry, annexin V-FITC, propidium iodide, calcein AM, ethidium homodimer.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

Os processos de morte celular conhecidos como apoptose e necrose podem ser diferenciados a partir da observação de alterações morfológicas e bioquímicas (WILLINGHAM, 1999). Estas alterações são dependentes da duração e da intensidade dos estímulos, da velocidade do processo de morte, bem como da extensão da depleção de adenosina trifosfato (ATP), observados nas células envolvidas (BUSSOLATI et al., 1995; COTRAN et al., 1999).

A morte celular por necrose é conseqüente a estímulos intensos e de curta duração (COTRAN et al., 1999). Este processo é caracterizado pelo aumento do volume intracelular, cariólise e lise da célula. Em virtude do envolvimento de elevado número de grupos celulares e da perda precoce dos componentes citoplasmáticos para o espaço extracelular, a necrose geralmente resulta em resposta inflamatória intensa (VanENGELAND et al., 1997; WYLLIE, 1997; WILLINGHAM, 1999; KANNAN & JAIN, 2000). Frequentemente, este processo não requer o consumo dos suprimentos energéticos celulares (SAIKUMAR et al., 1999).

Algumas patologias associadas à morte celular por necrose incluem: granulomatose de Wegener (BACON, 2005), adenoma da paratireóide (VASATKO et al., 2004), infarto pulmonar associado à síndrome de Sjogren (NAKAYAMA et al., 2004), zigomicose, cirrose hepática e doenças neoplásicas (HENRY, 1999).

A morte celular por apoptose, por sua vez, decorre de estímulos de menor intensidade, mas de duração prolongada (COTRAN et al., 1999; WILLINGHAM, 1999), como por exemplo: ligante Fas, fator de necrose tumoral α (TNF- α) e ligantes TRAIL/APO 2-L e APO 3-L (McGEEHAN et al., 1994; MOHLER et al., 1994; TANAKA et al., 1996). A atuação destes estímulos resulta na ativação regulada de programas de execução preexistentes, codificados no genoma (KERR et al., 1972).

Durante a apoptose, o material celular é frequentemente preservado, o que por sua vez, resulta em resposta inflamatória e dano tecidual local menos intensos em relação aqueles observados na necrose (SCHWARTZMAN & CIDLOWSKI, 1993). O consumo de ATP, por outro lado, faz-se necessário para promover as mudanças do compartimento nuclear durante este processo de morte celular (LAZEBNIK et al., 1993; PATKI & LEDERMAN, 1996). (Figura 1).

A apoptose participa de forma complementar, ainda que oposta, ao processo de divisão celular como um mecanismo homeostático da morfogênese e reconstrução tecidual normal (VanENEGLAND et al., 1997; MEIER et al., 2000; KIMURA et al., 2003). Igualmente, esse processo é importante na remoção de células danificadas, infectadas ou potencialmente neoplásicas (NAGATA, 1996; SAIKUMAR et al., 1999).

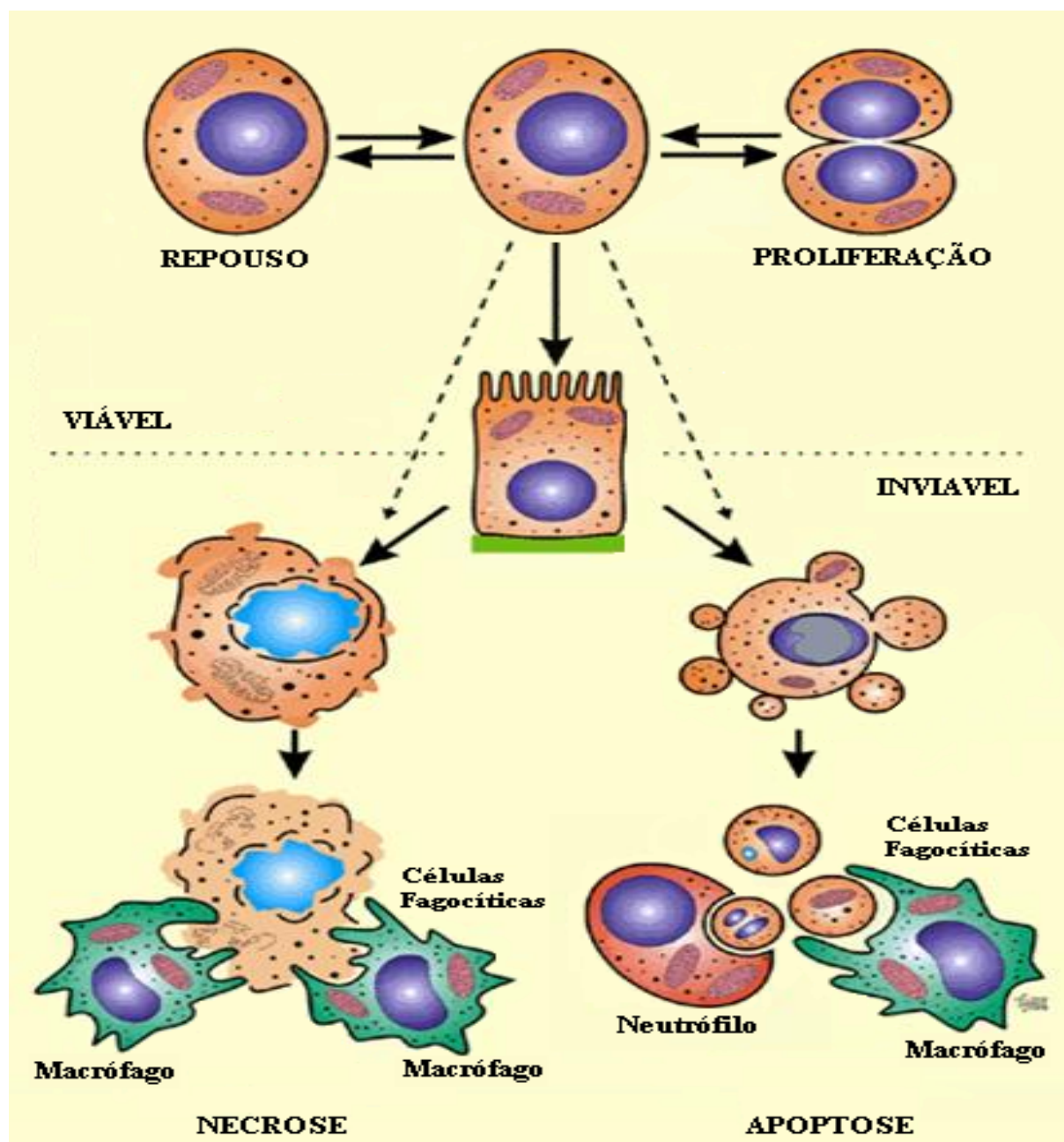


FIGURA 1. Principais diferenças entre os processos de morte celular. (Adaptado de: www.merian.fr.bw.schule.de/mueller/Schueler/sterben.htm). Acesso em: 23 julho 2004.

Durante o desenvolvimento embrionário humano, a apoptose auxilia a esculpir partes do corpo, sendo essencial, por exemplo, na formação das cavidades, eliminação de vestígios de estruturas funcionais durante a embriogênese, bem como na morfogênese e separação dos dedos (SAIKUMAR et al., 1999; NEWTON et al., 2000; RATHMELL et al., 2002). (Figura 2).

Embora requisitada essencialmente durante o desenvolvimento animal, a morte celular por apoptose prossegue ao longo da vida adulta. Em animais adultos, a apoptose promove o balanço da divisão celular e favorece o equilíbrio celular dos tecidos (WYLLIE, 1997). Além disso, a remoção de células afetadas por defeitos genéticos, pelo avanço da idade, por doenças ou por exposição a agentes nocivos, ocorre possivelmente, devido à apoptose (SALMENA et al., 2003).

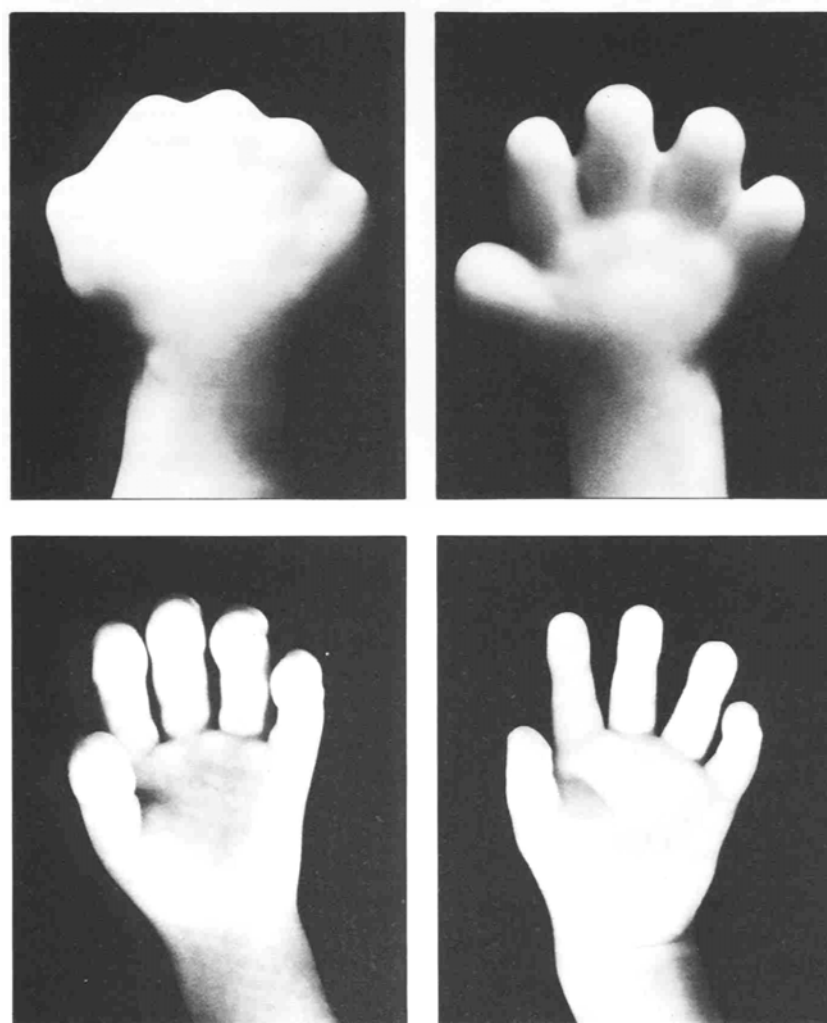


FIGURA 2. Morfogênese e separação dos dedos, durante os quais a apoptose é essencial. (Adaptado de: www.ac-strasbourg.fr/microsites/svt-01/prodelev/cerveau/images/APOPTOSE.JPG). Acesso em: 11 novembro 2004.

Outros processos fisiológicos caracteristicamente regulados por apoptose incluem: (1) involução da mama após o desaleitamento (STRANGE, et al., 1995), (2) desprendimento do endométrio durante a menstruação (KOKAWA et al., 1996), (3) impotência induzida por atrofia prostática (SAIKUMAR et al., 1999), (4) morte das células epidérmicas que migram da camada germinal basal à superfície do epitélio escamoso (WEIL et al., 1999), (5) morte de neutrófilos durante a resposta inflamatória aguda (SENDO et al., 1996) e (6) exclusão de timócitos autoreativos (KING & ASHWELL, 1994; BUDD, 2001; GERMAIN, 2002; RATHMELL & THOMPSON, 2002), destinados a marcação por receptores de superfície CD3 de células T (TCD3), responsáveis pela ligação a auto-antígenos, durante o desenvolvimento de linfócitos T (BOUILLET et al., 2002).

Em alguns casos, a apoptose pode também formar a base para o tratamento de patologias. O tratamento de tumores por radiação e quimioterapia, por exemplo, envolve a ativação seletiva da apoptose nas células neoplásicas (SAIKUMAR et al., 1999).

Por outro lado, a execução fisiologicamente anormal da apoptose pode estar associada a processos patológicos (SALMENA et al., 2003). Assim, tanto a exacerbação quanto a diminuição deste processo de morte celular podem promover conseqüências biológicas adversas (NAGATA, 1996), como as verificadas nas doenças neurodegenerativas de Alzheimer e Parkinson, AIDS e isquemia cardíaca, bem como na artrite reumatóide e nos diferentes tipos de câncer, respectivamente (THOMPSON, 1995; DUKE et al., 1996). (Tabela 1).

Doenças autoimunes, como a tireoidite de Hashimoto (ARSCOT & BAKER, 1998; STASSI et al., 1999) e lúpus eritematoso sistêmico (TSOKOS & LIOSSIS, 1999) são causados pelo aumento da morte celular por apoptose na glândula tireóide e outros órgãos alvo (SAIKUMAR et al., 1999). Contudo, a diminuição da apoptose em células imunes autoreativas, associada a indução e proliferação dessas células, representam importantes fatores no desenvolvimento da autoimunidade (FRENCH et al., 1996).

Além disso, malformações congênitas relacionadas a defeitos de desenvolvimento podem estar relacionadas a apoptose reduzida ou excessiva em determinadas populações celulares, normalmente alvos de destruição durante a embriogênese (SAIKUMAR et al., 1999).

TABELA 1. Patologias associadas à apoptose anormal (SAIKUMAR et al., 1999).

Apoptose Deficiente	Apoptose Excessiva
Síndrome linfoproliferativa autoimune (Síndrome de Canale-Smith).	Doenças neurodegenerativas (Alzheimer, Huntington, Parkinson).
Doença de Graves	Anemia aplásica
Síndrome da hipereosinofilia	Síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV)
Lúpus Eritematoso	Tireoidite de Hashimoto
Linfoma	Lúpus eritematoso
Leucemia	Esclerose múltipla
Tumores sólidos	Síndrome mielodisplásica
Diabetes mellitus Tipo I	Diabetes mellitus Tipo I
Osteoporose	Colite ulcerativa
	Doença de Wilson
	Neutropenia crônica

1.2 Principais Mediadores de Apoptose e Alterações Celulares

A apoptose consiste, basicamente, de três estágios sucessivos: (1) o comprometimento à morte provocado por sinais extras e intracelulares; (2) execução da morte celular por ativação de proteases intracelulares; (3) formação e remoção dos corpos apoptóticos por fagocitose, seguido da degradação lisossomal pelas células fagocíticas (VAUX & STRASSER, 1996). (Figura 3).

A indução da apoptose pode ocorrer em decorrência da ligação de moléculas sinalizadoras a seus receptores cognatos localizados na superfície das células, entre os quais: (1) ligante Fas (FasL) ao receptor Fas (CD95) (LILES, 1997; NAGATA, 1996; SCAFFIDI et al., 1998), (2) ligante TNF- α ao receptor 1 do fator de necrose tumoral (TNFR1) (DARNAY & AGGARWAL, 1997; MAGNUSSON & VAUX, 1999), (3) ligantes TRAIL/APO 2-L (ligantes indutores de apoptose relacionado ao TNF) aos receptores TRAIL/R dos tipos 1 e 2 (WILEY et al., 1995; BADLEY et al., 2000), (4) ligante APO 3-L ao receptor DR 3 (SAIKUMAR et al., 1999).

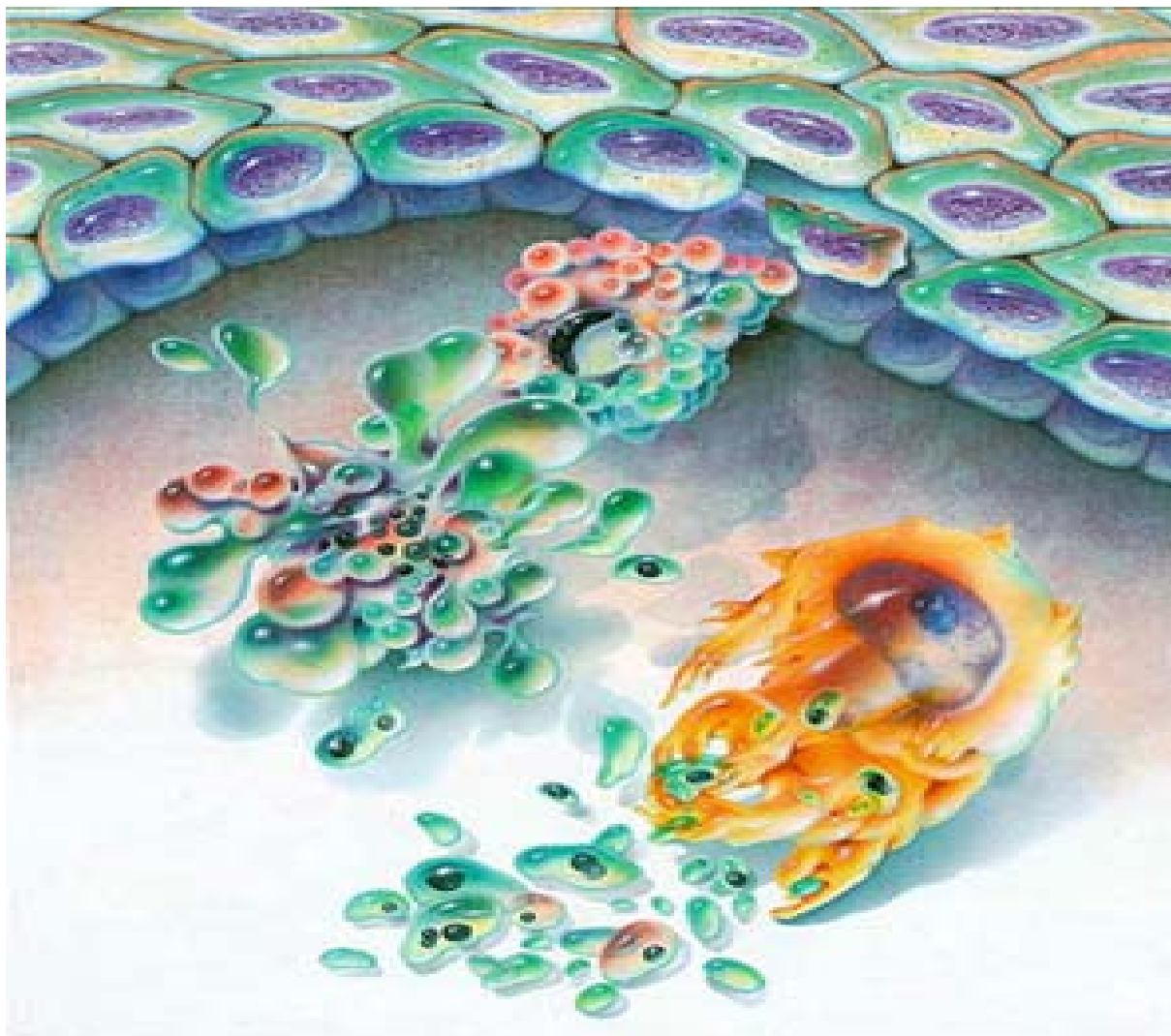


FIGURA 3. Apoptose: formação e remoção de corpos apoptóticos por células fagocíticas. (Adaptado de: http://spacebio.net/modules/gs_teare.html). Acesso em: 24 de maio de 2004.

Após a ligação das moléculas protéicas sinalizadoras FasL e TNF- α a seus respectivos receptores Fas e TNFR1, proteínas associadas à membrana, conhecidas como “domínios de morte”, são clivadas pela ação de metaloproteases (McGEEHAN et al., 1994; MOHLER et al., 1994; HSU et al., 1995; TANAKA et al., 1996). A ativação destes domínios de morte promove o recrutamento das proteínas adaptadoras FADD /Mort-1(domínio de morte associado ao Fas) (MEMON et al., 1998; ZHANG et al., 1998; SALMENA et al., 2003) e TRADD (domínio de morte associado ao receptor TNF) respectivamente, (HSU, et al., 1995, HSU et al., 1996) para formar complexos sinalizadores de indução da morte (DISC) (LI et al., 1998; LUO et al., 1998; KRAMMER, 2000).

Em consequência ao recrutamento dos domínios de morte FADD e TRADD, têm início a ativação seqüencial da família das cisteíno proteases, também conhecidas como caspases. As caspases são sintetizadas como zimógenos inativos que se tornam ativos após a remoção de um pró-domínio terminal (COHEN, 1997; MILLER, 1997; STROH & SCHULZE-OSTHOFF, 1998). Caspases ativadas catalisam a clivagem de outras caspases, que por sua vez, ativam diversas proteases e endonucleases celulares (ROSEN & CASCIOLA-ROSEN, 1997) promotoras da apoptose (BADLEY et al., 2000). Como exemplos, a caspase 8, também conhecida como FLICE, MACH e Mach5 (BODMER et al., 2000; PATEL et al., 2000; ASHKENAZI et al., 2002) e a caspase 3 (CPP32) (FERNANDES-ALNEMRI et al., 1996; KUMAN, 1997; FUGITA et al., 1998;) estão envolvidas na apoptose mediada pela ligação ao Fas, TNFR1 e receptores TRAIL/R1, TRAIL/2-R e DR 3 (BADLEY et al., 2000; PATEL et al., 2000).

A formação dos complexos sinalizadores de indução da morte (DISC) promove a ativação da enzima iniciadora caspase 8 (SALVESEN, 1999; PATEL et al., 2000), que por sua vez, ativa a enzima efetora, caspase 3 (BUDIHARDJO et al., 1999). A atividade da caspase 3 tem como consequência a degradação de proteínas nucleares e celulares, assim como a decomposição do DNA cromossômico (LI et al., 1998; LUO et al., 1998).

A caspase 8 pode, também, ativar a caspase 3 através da clivagem da proteína Bid, que por sua vez, é translocada à superfície da mitocôndria e interage seqüencialmente com as proteínas externas da membrana mitocondrial. Como resultado, tem-se a formação de poros que permitem a liberação do citocromo C e a ativação da enzima iniciadora caspase 9, devido a ativação do fator de ativação de proteases pro-apoptóticas (Apaf-1) (LI et al., 1998; LUO et al., 1998; KUWANA et al., 2002). A caspase 9, por sua vez, ativa a caspase 3, responsável pela degradação das proteínas celulares e nucleares e pela ativação da proteína CAD (*Caspase-activated DNase*) (SAIKUMAR et al., 1999).

Outras proteínas adaptadoras como FLASH (*FLICE-associated huge protein*), que associam-se aos domínios efetores de morte (DED) da caspase 8 (IMAI et al., 1999), proteínas inibidoras como FLIP (*FLICE-inhibitory protein*) e proteínas envolvidas em mecanismos de sobrevivência como RIP (*Receptor-interaction protein*) podem atuar sobre o processo apoptótico, determinando assim, a sobrevivência ou a morte celular (SAIKUMAR et al., 1999). Conseqüentemente ao

desencadeamento deste processo, a célula passa a apresentar alterações bioquímicas e morfológicas, que são característicos da apoptose (BADLEY et al., 2000). (Figura 4).

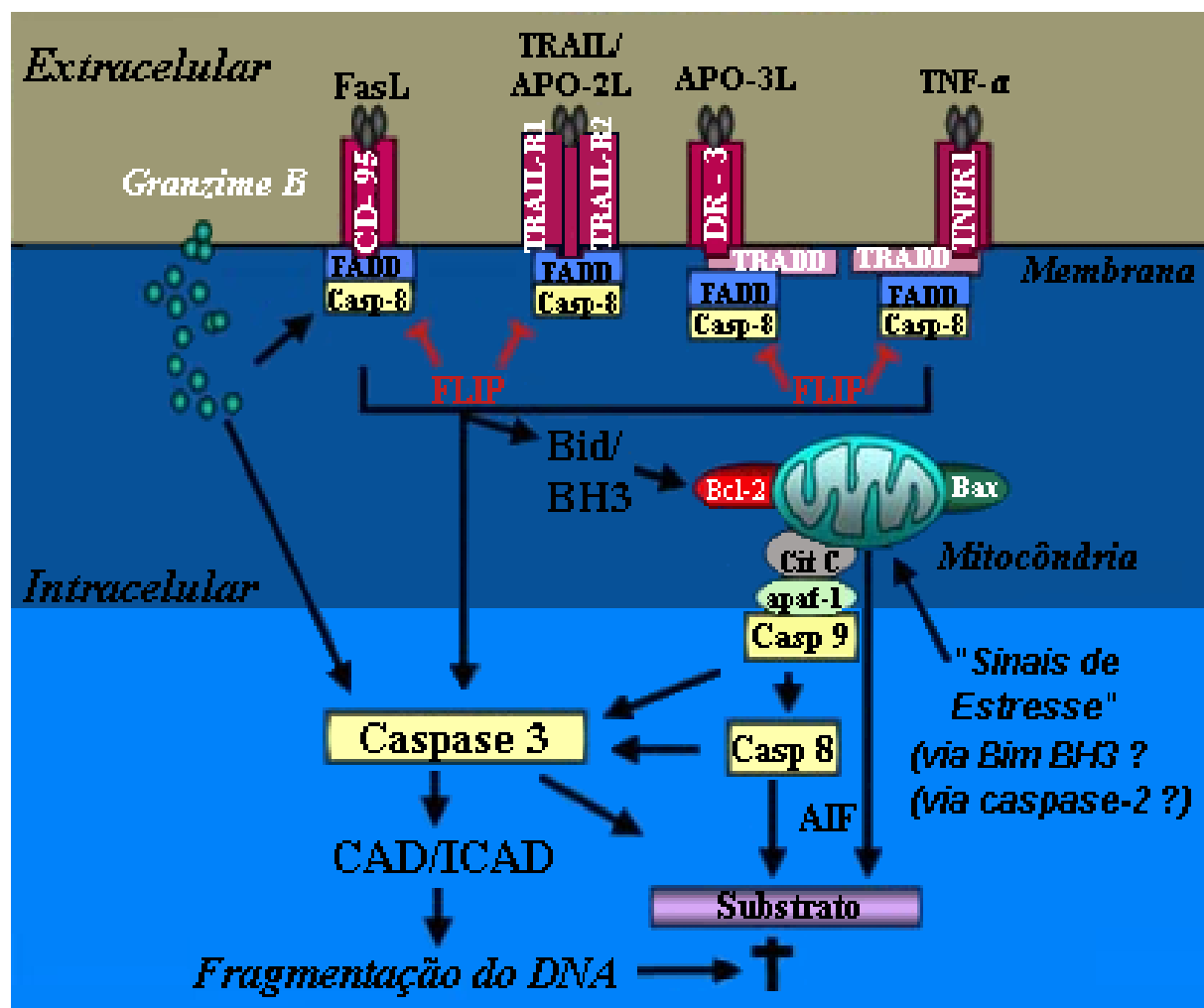


FIGURA 4. Representação da apoptose e seus principais mediadores (Adaptado de: www.uni-ulm.de/aktuelles/aktuelles_thema/aktuell0308/). Acesso em: 15 de janeiro de 2005.

Nos estágios iniciais da apoptose, os níveis citoplasmáticos de cálcio bivalente são reduzidos e o volume celular diminui, enquanto o contato com as células vizinhas e a matriz extracelular é perdido (VanENGELAND et al., 1997). O efluxo do cálcio intracelular resulta num acentuado declínio do potencial transmembranar da mitocôndria e conseqüentemente, no estresse oxidativo da célula (KANNAN & JAIN, 2000).

A membrana plasmática passa, então, a exibir modificações, como a perda de resíduos de ácido siálico da membrana glicoprotéica e a perda de microvilosidades e

junções intercelulares (VanENGELAND et al., 1997). Verifica-se ainda, a translocação de resíduos de fosfatidilserina à face externa da membrana plasmática, que fisiologicamente se encontram confinados na face interna da bicamada lipídica das células (KOOPMAN et al., 1994; MARTIN et al., 1995; MOURDJEVA et al., 2005). O conseqüente aumento da permeabilidade da membrana plasmática, por sua vez, promove a diminuição da atividade esterásica intracelular em decorrência à presença de toxinas no citoplasma (KANNAN & JAIN, 2000; FLANAGAN PRODUKTE, 2003). Dessa forma, a cromatina é clivada em fragmentos oligonucleossomais pela ativação de endonucleases cálcio-magnésio dependentes e condensada em cápsulas granulares periféricas (VanENGELAND et al., 1997; WILLINGHAM, 1999).

Finalmente, a superfície celular forma vesículas, que resultam na formação dos corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos, por sua vez, são reconhecidos e fagocitados pelos macrófagos e células vizinhas (VAUX & STRASSER, 1996; VanENGELAND et al., 1997).

1.2.1 Indução do processo apoptótico por linfócitos “T” citotóxicos

As células T citotóxicas (CTLs) constituem a principal defesa dos vertebrados em resposta a processos infecciosos (OFFIT et al., 1991). Uma vez ativadas, essas células induzem a apoptose das células infectadas e assim, previnem a multiplicação dos agentes infecciosos e a propagação da infecção (ZAJAC et al., 1996).

A apoptose promovida pelas células T citotóxicas pode ocorrer tanto através da via FasL/Fas, como descrito anteriormente, quanto pelo fornecimento de perforinas e *granzime B* via exocitose cálcio-dependente às células alvo (BARRY et al., 2000). A ação das perforinas resulta na formação de poros na membrana plasmática e permitem a entrada de *granzime B* na célula alvo (BARRY et al., 2000; WATERHOUSE, 2004).

Uma vez dentro da célula, a *granzime B* ativa uma ou mais proteases apoptóticas (caspases -1,-2,-3,-6,-7 e -8) que desencadeiam a cascata de morte celular (ATKINSON et al., 1998). Assim, as interações Fas/FasL e o sistema perforina/*granzime B* são elos da maquinaria apoptótica que mantém a homeostase das células do sistema imonológico (SAIKUMAR et al., 1999).

1.2.2 Indução da apoptose por quimioterapia, radiação ultravioleta, radiação ionizante, hipóxia e falta de estímulos de sobrevivência

A ação de quimioterápicos, radiação ultravioleta e radiação ionizante, podem também induzir mudanças mitocondriais que promovem o aumento da permeabilidade e a perda do potencial transmembranar (BOSSY-WETZEL & GREEN, 1999; SALEH et al., 1999; SOENGAS et al., 1999) mediados geralmente pela formação de radicais livres, com envolvimento do gene supressor de tumores *p53*, que inicia o processo apoptótico pelo aumento da transcrição de proteínas como *Bax* (SAIKUMAR et al., 1999).

Enquanto a falta de estímulos de sobrevivência atua sobre *Bax* por mecanismos que envolvem MAP *kinase* e PI-3 *kinase*, a hipóxia e a depleção de ATP atuam diretamente sobre esta proteína que, ao se translocar para a superfície da mitocôndria, forma poros que permitem a liberação de citocromo C (SAIKUMAR et al., 1999). Conseqüentemente, proteínas reguladoras da apoptose, incluindo Apaf-1 e caspase 9, são liberadas e iniciam a ativação das caspases, levando ultimamente, à apoptose (BOSSY-WETZEL & GREEN, 1999; SALEH et al., 1999; SOENGAS et al., 1999).

1.2.3 Apoptose mediada pela família de proteínas Bcl-2

A família de genes Bcl-2 inclui tanto membros promotores, como *Bax*, *Bak*, *Bok*, *Diva*, *Bcl-x_S*, *Bik*, *Bim*, *Hrk*, *Nip3*, *Nix*, *Bad* e *Bid*, quanto membros inibidores da apoptose, como *Bcl-2*, *Bcl-x_L*, *Bcl-w*, *Mcl-1*, *Nr13* e *A1/Bfl-1* (ADAMS & CORY, 1998; REED, 1998).

Todos os membros da família Bcl-2, incluindo *Bcl-x_S*, *Bcl-x_L*, *Bad* e *Bax* (BADLEY et al., 2000), possuem, pelo menos, um dos quatro domínios conhecidos: BH1, BH2, BH3 e BH4 (SAIKUMAR et al., 1999). Para que se verifique a atividade inibitória sobre a morte celular, os membros anti-apoptóticos devem possuir no mínimo três domínios (BH1, BH2, e BH3), os que são essenciais para a interação proteína-proteína e supressão da apoptose (KANNAN & JAIN, 2000). Por outro lado, BH3 atua como domínio de morte mínimo para os membros pró-apoptóticos (KELEKAR & THOMPSON, 1998).

Os grupos pró- e anti-apoptóticos podem formar homodímeros ou heterodímeros e aparentemente, podem neutralizar as funções uns dos outros, sugerindo que suas concentrações relativas em uma determinada célula atuam como reostato do programa apoptótico (KANNAN & JAIN, 2000).

A Bcl-2 está localizada na face citoplasmática da membrana externa da mitocôndria, retículo endoplasmático e envelope nuclear. Esta localização estratégica permite o registro e o contrabalanço do dano oxidativo sobre tais compartimentos (HOCKENBERRY, 1995; YANG & KORSMEYER, 1996; ANTONSSON et al., 1997). A proteína Bcl-2 permite, ainda, a manutenção da integridade de membrana da mitocôndria através da prevenção direta ou indireta da liberação de citocromo C que, juntamente com dATP e Apaf-1, facilitam a ativação da caspase 9 (YANG & KORSMEYER, 1996; ANTONSSON et al., 1997).

1.2.4 Moléculas regulatórias anti-apoptóticas

Em oposição ao efeito pró-apoptótico mediado pela ligação de TNF- α ao receptor 1 do fator de necrose tumoral, o complexo TNF- α /TNFR1 pode iniciar uma resposta anti-apoptótica. Este efeito controverso é conseqüente ao recrutamento de TRAF-2 (*TNFR-associated factor 2*) a partir do aumento da expressão de genes de sobrevivência mediado pela ativação de NF- κ B (SAIKUMAR et al., 1999).

Por outro lado, proteínas inibitórias à FLICE (FLIP) inibem o processo de morte celular por apoptose por se associarem a FADD e com isso, prevenirem a ativação da caspase 8 (IRMLER et al., 1997; TSCHOPP et al., 1998).

Além disso, a família de proteínas inibidoras da apoptose (IAP), incluindo HIAP e XIAP, atuam como moléculas anti-apoptóticas a partir da inibição da caspase 3 e possivelmente outras caspases (DUCKETT et al., 1996; LISTON et al., 1996; DEVERAUX et al., 1997).

1.3 Indução da apoptose de linfócitos CD4 e CD8 na infecção pelo HIV

Desde que foi proposta como um importante mecanismo da depleção das células T CD4 durante a infecção pelo vírus HIV (AMEISEN & CAPRON, 1991), a apoptose passou a ser estudada com maior ênfase (BADLEY et al., 2000).

A infecção pelo vírus HIV está associada a disfunções precoces nas células T CD4 (LEWIS et al., 1994), seguido pela depleção gradual das células T CD4 (CHAVES & KALLAS, 2004) e pelo declínio das células T citotóxicas (CD8) específicas ao HIV quando da instalação de AIDS (CARMICHEL et al., 1993; LELIEVRE et al., 2005).

A contínua perda de linfócitos CD4, por sua vez, resulta em imunodeficiência e aumento da susceptibilidade a infecções oportunistas, comumente observados durante esta infecção (BADLEY et al, 2000, LUM et al., 2003).

Embora a produção de células T CD4 esteja prejudicada (HELLERSTEIN et al, 1999), existem atualmente fortes evidências de que a base primária da depleção das células T CD4 e CD8 durante a infecção pelo vírus HIV ocorre principalmente, pelo aumento da apoptose dessas células (BADLEY et al, 2000; ROSHAL et al, 2001; CHAVES & KALLAS, 2004).

Os mecanismos que têm sido propostos para explicar o aumento da susceptibilidade à apoptose das células mononucleares na infecção pelo vírus HIV, incluem a associação da glicoproteína do envelope viral gp120 aos linfócitos CD4 e subsequente ativação e depleção das células T (BANDA et al., 1992; LUM et al., 2003), disfunção das células apresentadoras de antígeno (MEYAARD et al., 1993) ou aumento dos níveis de expressão de citocinas, como TNF- α , IL-1 e IL-6 (PANTALEO et al.,1995; FAUCI et al., 1996).

1.3.1 Alterações moleculares mediadas pelo HIV

O par de receptor-ligante mais amplamente estudado como potencial mediador da apoptose na infecção pelo HIV é o Fas/Fas-ligante (BADLEY et al, 1997; PATEL et al., 2000).

A infecção aguda da linhagem celular pró-monocítica U937 pelo vírus HIV está associada com a apoptose dependente da replicação viral (BADLEY et al., 1996). Esta infecção é caracterizada pelo aumento da expressão de Fas e FasL (BADLEY et al., 1996; LELIEVRE et al., 2005), por regulação retroativa de proteínas anti-apoptóticas Bcl2 e BclXL e pelo aumento das proteínas pró-apoptóticas BclXS e Bax (BADLEY et al., 2000).

Durante a infecção pelo HIV, os linfócitos T demonstram tanto um aumento da expressão de receptores Fas quanto susceptibilidade elevada à morte celular

mediada por Fas (GEHRI et al., 1996; SLOAND et al., 1997; McCLOSKEY et al., 1998). Além disso, a expressão do ligante Fas se encontra elevada nas células mononucleares periféricas e está correlacionada com a carga de RNA viral (HOSAKA et al., 1998).

A regulação do fator de necrose tumoral (TNF), de receptores de TNF ou de ambos, encontra-se fundamentalmente alterada durante a infecção pelo HIV. A infecção de linfócitos e monócitos resulta em produção de TNF (BADLEY et al., 2000), ativação de NF- κ B e conseqüentemente, ativação da transcrição do vírus HIV (HAN et al., 1996; BADLEY et al., 2000).

1.4 Métodos de Detecção da Apoptose

A apoptose representa um processo ativo de remoção celular que freqüentemente requer ativação gênica, síntese protéica e ativação de endonucleases (COTTON et al., 1997). Morfologicamente, este processo é caracterizado pela condensação da cromatina, diminuição do citoplasma, formação de vesículas a partir da membrana e finalmente, formação dos corpos apoptóticos (BADLEY et al., 2000).

Baseadas na detecção de tais alterações morfológicas, diferentes metodologias como eletroforese, microscopia eletrônica e citometria de fluxo, são amplamente empregadas na avaliação da apoptose (SCHMID et al., 1992; KOOPMAN et al., 1994). (Tabela 2).

A fragmentação do DNA por endonucleases, por exemplo, é classicamente demonstrada por eletroforese como uma graduação típica de DNA (KOOPMAN et al., 1994), enquanto o percentual de fragmentação pode ser determinado por métodos colorimétricos após a separação dos fragmentos por ultracentrifugação (NICOLETTI et al., 1991).

A principal falha desses métodos, posto que são desenvolvidos com todo o extrato nuclear, é a inabilidade em determinar diretamente o percentual de fragmentos nucleares e de reconhecer as células apoptóticas em populações celulares heterogêneas (NICOLETTI et al., 1991). Além disso, a clivagem internucleossomal detectada por eletroforese e por coloração histoquímica do núcleo pelo método de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) (LASSUS & HIBNER, 1998; LOO & RILLEMA, 1998; TONETTI et

al., 1998), por exemplo, não permitem distinguir entre a célula necrótica e a apoptótica (CHARRIAUT-MARLANGUE & BEM-ARI, 1995; McCARTHY & EVAN, 1998). Tal constatação deve-se ao fato de que os meios proteolíticos que operam na necrose podem também promover a ativação de enzimas que clivam o DNA em fragmentos internucleossomais indistinguíveis daqueles observados durante a apoptose (DONG et al., 1997).

Alternativamente, a fragmentação do DNA pode ser visualizada a partir da quantificação percentual de bases celulares por ensaios de transferência de marcação *in situ* (ISNT, *in situ nick translation*) (FEHSEL et al., 1991; GOLD et al., 1993; GORCZYCA et al., 1993). Contudo, as evidências morfológicas da apoptose nem sempre são acompanhadas pela clivagem do DNA, podendo acarretar em interpretações subestimadas a respeito deste mecanismo de morte celular (COHEN et al., 1992; FALCIERI et al., 1993).

A utilização de microscopia eletrônica associada a corantes fluorescentes (SCHMID et al., 1992; TELFORD et al., 1992), embora permita detectar o processo apoptótico por criteriosa avaliação morfológica (GOUGEON et al., 1991), torna-se inapropriado na quantificação da apoptose, posto que a marcação das células, geralmente realizada através de marcadores não vitais, ocorre somente após o dano da membrana (KOOPMAN et al., 1994).

As metodologias que incluem a avaliação e quantificação das populações celulares por citometria de fluxo fornecem análises mais precisas e reprodutíveis do processo de morte celular por apoptose (NICOLETTI et al., 1991, OLIVIER, 1995; PETIT et al., 1995). Na citometria de fluxo, a redução do volume celular e o aumento da granulosidade das células apoptóticas podem ser avaliados a partir de modificações nos padrões FSC (*forward scatter*) e SSC (*side scatter*) de dispersão da luz, respectivamente (BROWN et al., 1993).

Entre os marcadores nucleares e corantes fluorescentes comumente utilizados nos ensaios de verificação e quantificação da apoptose por citometria de fluxo, destacam-se: iodeto de propídio, brometo de etídio, homodímero de etídio, 7 - aminoactinomicina D (7-AAD), *acridine orange* (LECOEUR & GOUGEON, 1996; COTTON et al, 1997), anexina-V-FITC e calceína AM (GATTI et al, 1998). (Tabela 2).

TABELA 2. Categorias de alterações celulares que formam a base dos ensaios de detecção da apoptose. (WILLINGHAM, M. C., 1999, BADLEY et al., 2000).

Evento	Ensaio	Deteção
Alterações da morfologia nuclear: <ul style="list-style-type: none"> • Condensação da cromatina, segmentação e formação de corpos apoptóticos; 	<ul style="list-style-type: none"> • Marcadores de DNA (DAPI) 	<ul style="list-style-type: none"> • Microscopia
Alterações na permeabilidade da membrana:	<ul style="list-style-type: none"> • Corantes Vitais (PI); • Marcadores de permeabilidade do DNA (DAPI Hoechst 33258, Calceína AM). 	<ul style="list-style-type: none"> • Microscopia; • Citometria de fluxo com determinação simultânea de tamanho.
Alterações na composição da membrana: <ul style="list-style-type: none"> • Externalização da fosfatidilserina 	<ul style="list-style-type: none"> • Associação à Anexina V 	<ul style="list-style-type: none"> • Citometria de fluxo
Clivagem de proteínas nucleares	Polimerase poly ADP ribose	Western blot
Atividade e integridade mitocondriais <ul style="list-style-type: none"> • Alterações na transição da permeabilidade ($\Delta\Psi_m$); • Acessibilidade a antígenos mitocondriais; • Liberação de citocromo-c; • Produção de radicais livres. 	<ul style="list-style-type: none"> • Corantes Vitais (DiOC₆, JC-1); • Anticorpos Apo2,7; • Anticorpos Anti-citocromo-c; • DPPP/dihidroetídio. 	<ul style="list-style-type: none"> • Citometria de fluxo; • Citometria de fluxo; • Citometria de fluxo, Western blot; • Citometria de fluxo.
Ativação de caspases: <ul style="list-style-type: none"> • Deteção de produtos da clivagem de caspases; • Deteção de caspases ativas; • Deteção da atividade de caspases. 	<ul style="list-style-type: none"> • Substratos conhecidos de caspases: PARP, caspase 3, caspase 8, DNA-PK, PK-C; • Anticorpos anti-caspase 3 ativada; • Clivagem de substratos fluorescentes ou coloridos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Western blot; • Western blot; • Fluorímetro, colorímetro.
Degradação do DNA: <ul style="list-style-type: none"> • Fragmentos grandes; • Fragmentos pequenos; • Deteção do pico Sub-G1 	<ul style="list-style-type: none"> • Marcadores de DNA Homodímero de Etídio, SYBR green); • Marcador de DNA (Homodímero de Etídio); • Radioatividade (C¹⁴); • Marcador de DNA (Homodímero de Etídio); • Radioatividade (C¹⁴); • Marcador de DNA (PI). 	<ul style="list-style-type: none"> • Eletroforese em gel de campo oscilante; • Comet • Deteção de DNA radiomarcado por filtrado marcado; • Eletroforese em gel de agarose (escala de DNA); • Deteção de DNA radiomarcado por filtrado marcado; • Citometria de fluxo.
Deteção de finos fragmentos de DNA	<ul style="list-style-type: none"> • Corte da porção terminal dUTP e marcação (TUNEL); • PCR mediada por ligação. 	<ul style="list-style-type: none"> • Hibridização <i>in situ</i>, Citometria de fluxo; • Eletroforese

Os métodos citoquímicos, como aqueles que utilizam 7-aminoactinomicina D (7-AAD) e iodeto de propídio ou *acridine orange* e brometo de etídio (LECOEUR & GOUGEON, 1996), são amplamente empregados e podem ser mais ou menos específicos na análise da apoptose (WILLINGHAM, 1999).

A perda progressiva da integridade da membrana, por exemplo, pode ser avaliada pela incorporação de 7-aminoactinomicina D (7-AAD) ao DNA, que permite distinguir as células apoptóticas precoces das inviáveis (SCHMID et al., 1994). Assim, células em estágios iniciais de apoptose são fracamente marcadas com 7-AAD, enquanto as células inviáveis permitem a penetração efetiva deste marcador. Entretanto, os percentuais médios de apoptose em células mononucleares de pacientes infectados pelo HIV obtidos pelo método 7-AAD/PI podem ser subestimados devido à interferência de eritrócitos com o corante 7-aminoactinomicina D (7-AAD) (LECOEUR & GOUGEON, 1996).

Por outro lado, a metodologia que utiliza *acridine orange* (AO) (OLIVIER, 1995; PETIT et al., 1995) e brometo de etídio (EB) como marcadores da apoptose permite detectar três populações celulares por citometria de fluxo: (1) células viáveis, marcadas fracamente com AO, mas não marcadas por EB; (2) células inviáveis, marcadas fracamente por EB, mas não marcadas por AO; e (3) células apoptóticas com DNA fragmentado, marcadas fracamente com AO, não marcadas por EB, mas com volume reduzido, indicado pelo padrão de dispersão *forward scatter* (FSC) (PETIT et al., 1995; OLIVIER, 1995; LECOEUR & GOUGEON, 1996). Entretanto, esta distinção dos grupos celulares viáveis, apoptóticos e inviáveis pode se tornar pouco reprodutível devido ao largo espectro de emissão promovido por *acridine orange* e pelo brometo de etídio (NICOLETTI et al., 1991; LECOEUR & GOUGEON, 1996).

A anexina V se mostrou útil na detecção de células apoptóticas em decorrência de sua ligação preferencial a fosfolipídeos negativamente carregados, como a fosfatidilserina exposta no início do processo apoptótico (KOOPMAN et al., 1994; HOMBURG et al., 1995; VERMES et al., 1995; CLARKE et al., 2000; LEE et al., 2004). A conjugação do corante Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) à anexina-V (KOOPMAN et al., 1994), permite identificar e quantificar as células apoptóticas através da citometria de fluxo (vanENGLAND et al., 1998). (Figura 5). A utilização concomitante do marcador nuclear fluorescente iodeto de propídio (PI), por sua vez,

torna possível verificar as alterações nucleares características dos estágios tardios da apoptose (WILLINGHAM, 1999).

Tal propriedade deve-se ao fato de que marcadores de DNA de elevado peso molecular, como iodeto de propídio, não são passíveis de penetrar na célula intacta em decorrência do seu tamanho, bem como não marcam células apoptóticas sem que estas apresentem alterações na permeabilidade da membrana plasmática, como ocorre nos estágios finais da apoptose. Desse modo, utilizando citometria de fluxo, o marcador anexina V-FITC permite detectar os estágios iniciais da apoptose, enquanto o iodeto de propídio permite avaliar os momentos finais deste processo de morte celular (vanENGLAND et al., 1998; WILLINGHAM, 1999).

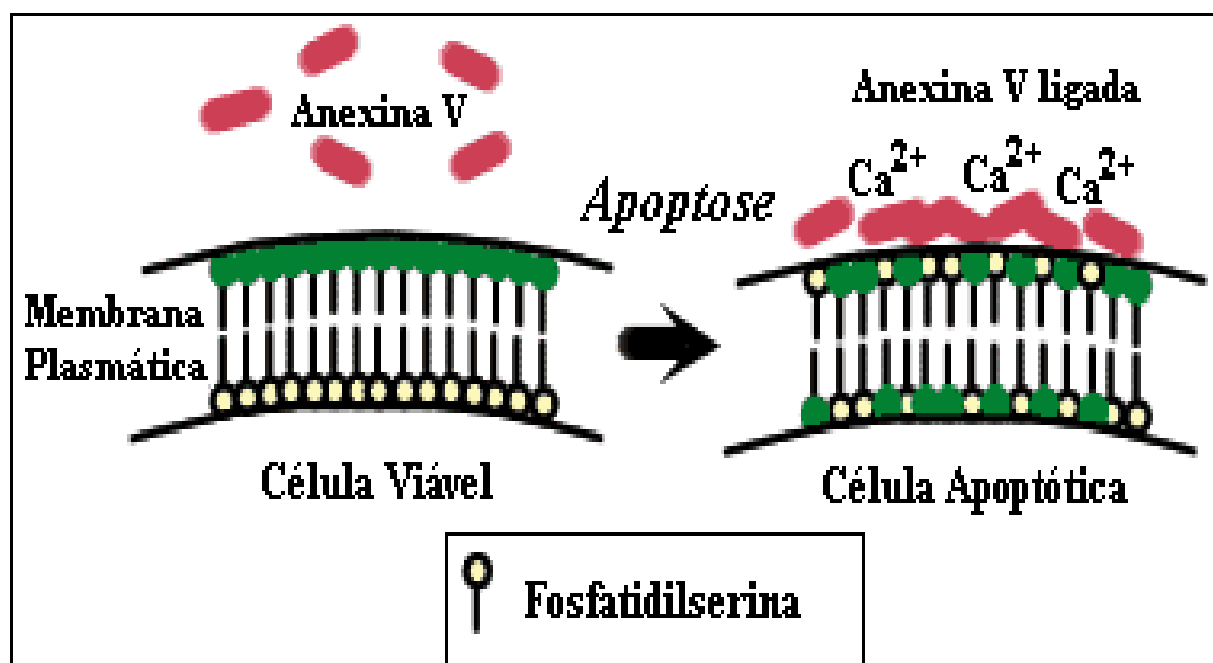


FIGURA 5. Ligação da anexina V aos resíduos de fosfatidilserina. (Adaptado de: www.funakoshi.co.jp/h_news/Apoptosis/imgs/AnnexinV01.gif). Acesso em: 10 dezembro 2004.

O acetóxi-metil-éster de calceína é um diéster fluorogênico que atravessa passivamente a membrana celular na forma elétrica neutra, quando então é convertido por esterases intracelulares, ativas somente em célula íntegra, a seu análogo negativo, impermeável e de fluorescência verde, também conhecido como calceína (NERI et al., 2001; FLANAGAN PRODUKTE, 2003). Com a perda da integridade ou aumento da permeabilidade da membrana, a atividade esterásica

cessa e o homodímero de etídio (EthD-1) reage com os ácidos nucleicos, produzindo fluorescência vermelha (GATTI et al., 1998; FLANAGAN PRODUKTE, 2003).

Assim, a calceína permite a verificação da viabilidade celular através da diminuição da atividade esterásica, enquanto EthD-1 permite constatar as alterações físicas e químicas na membrana celular verificadas na membrana danificada, com elevação de 40 vezes em sua fluorescência à medida que associa-se a ácidos nucleicos (MOLECULAR PROBES INCORPORATION, 1999; TREITINGER, 2002). (Figura 6).

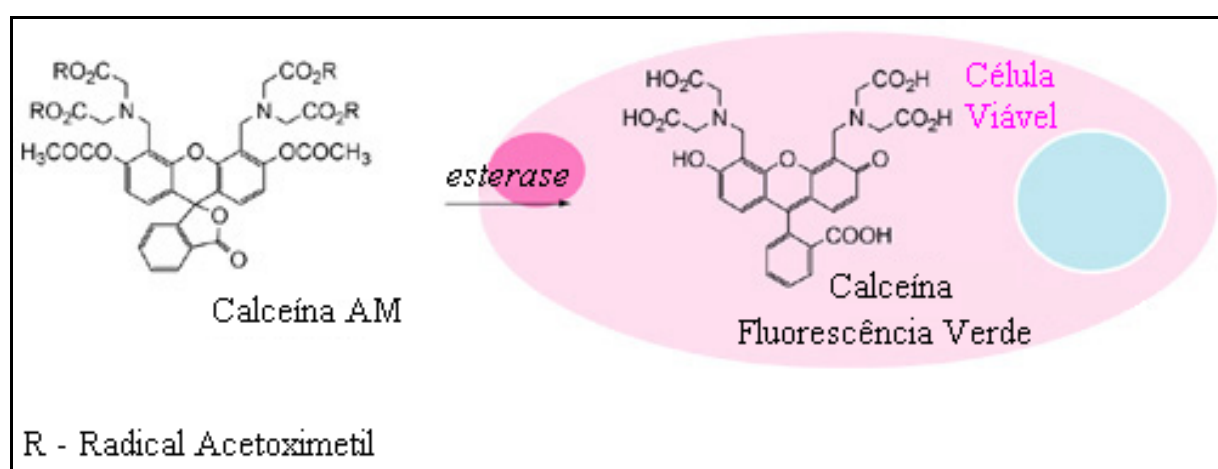


FIGURA 6. Conversão da calceína AM por esterases intracelulares na célula viável. (Adaptado de: www.dojindo.com/newimages/-Cellstain-Calcein-AM-Mech.jpg). Acesso em: 10 dezembro 2004.

O método de avaliação e quantificação do processo de morte celular por apoptose mais utilizado atualmente leva em conta a associação da anexina V-FITC e iodeto de propídio. Por outro lado, a metodologia que utiliza calceína AM e homodímero de etídio mostrou-se sensível na quantificação deste processo em estudo anterior através da marcação de células como PC 12 e NIH3T3 (GATTI et al., 1998). Considerando que este estudo foi realizado com células aderentes não incluindo, portanto, células mononucleares do sangue periférico como linfócitos, o presente estudo baseou-se na avaliação da performance do método que utiliza calceína AM e homodímero de etídio (EthD-1) na detecção e quantificação da viabilidade, apoptose e inviabilidade celular em células mononucleares do sangue periférico, através da comparação com o método que utiliza anexina V-FITC e iodeto de propídio.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Comparar o método que utiliza calceína AM e homodímero de etídio (EthD-1), cuja sensibilidade na detecção e quantificação de linfócitos viáveis e em apoptose não se encontra descrita na bibliografia especializada, com o método que utiliza anexina V e iodeto de propídio, a partir do sangue periférico de pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) submetidos à terapia anti-retroviral.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar a possibilidade de utilização do método que propõe a calceína AM/homodímero de etídio como marcador para detecção e quantificação de células mononucleares viáveis e apoptóticas do sangue periférico, como os linfócitos, a partir da comparação com o método que utiliza anexina V-FITC/iodeto de propídio como referência.

Verificar a sensibilidade do método que utiliza calceína AM/homodímero de etídio como marcador precoce para detecção e quantificação dos níveis de apoptose em células mononucleares não aderentes, em relação ao método dos marcadores anexina V-FITC/iodeto de propídio, utilizado como referência.

Contribuir para a eleição da metodologia mais sensível na realização de estudos posteriores de avaliação dos níveis de apoptose e viabilidade de células mononucleares, como os linfócitos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

A viabilidade, apoptose e inviabilidade de células mononucleares foram avaliados em amostras de sangue de 50 pacientes, comprovadamente soropositivos para o HIV, diagnosticados por dois métodos com princípios metodológicos distintos e confirmados por imunofluorescência indireta, conforme recomendado pelo Ministério da Saúde e aceito pela Organização Mundial da Saúde (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

Os pacientes, atendidos rotineiramente no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina e que aceitaram participar deste estudo, foram devidamente esclarecidos sobre a natureza e objetivos do presente trabalho. Após assinarem o termo de consentimento, estes pacientes foram submetidos à coleta adicional de 10 mL de sangue periférico. Para evitar possíveis interferências causadas por elevados níveis de carga viral ou contagens excessivamente alteradas de células T CD4 e CD8, a seleção dos pacientes levou em conta a utilização de terapia anti-retroviral e a ausência de infecções oportunistas no momento da coleta.

Das 50 amostras de sangue obtidas, 25 foram destinadas ao ensaio de verificação da viabilidade e apoptose de células mononucleares após 24 horas de incubação em meio RPMI 1640, simultaneamente com os métodos que utilizam calceína AM/homodímero de etídio e anexina V-FITC/iodeto de propídio, respectivamente. As outras 25 amostras foram destinadas à realização dos mesmos ensaios, sendo o período de incubação modificado para 48 horas.

A realização deste estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina, conforme consta do processo n° 163/2003, cujo parecer encontra-se em anexo (Anexo1).

3.2 Coleta de material biológico

As amostras de sangue venoso dos pacientes foram obtidas por punção antero-cubital, pela manhã, utilizando-se sistema a vácuo. Foram colhidos 10 mL de sangue em tubo contendo heparina.

3.3 Isolamento das células mononucleares

Após centrifugação do sangue a 1500 rpm (378 g) por 15 minutos, a camada de glóbulos brancos formada entre o plasma e as hemácias foi removida com pipeta de Pasteur e ressuspensa com 8 mL de solução salina tamponada com fosfato 0,01M (PBS), pH 7,4.

A suspensão de células, contendo leucócitos e hemácias, foi lentamente transferida para outro tubo contendo 2,5 mL de Ficoll-Paque, densidade 1,077 g/mL (*Sigma Chemical Company, Sant Louis, U.S.A.*) e centrifugada a 1500 rpm (378 g) durante 20 minutos para separação das células mononucleares, em centrífuga clínica Celm, modelo LS-II. A camada de células localizada entre o tampão e o Ficoll-Paque foi retirada com pipeta Pasteur, lavada duas vezes em PBS pH 7,4 e sedimentada por centrifugação a 1000 rpm (168 g) por 10 minutos.

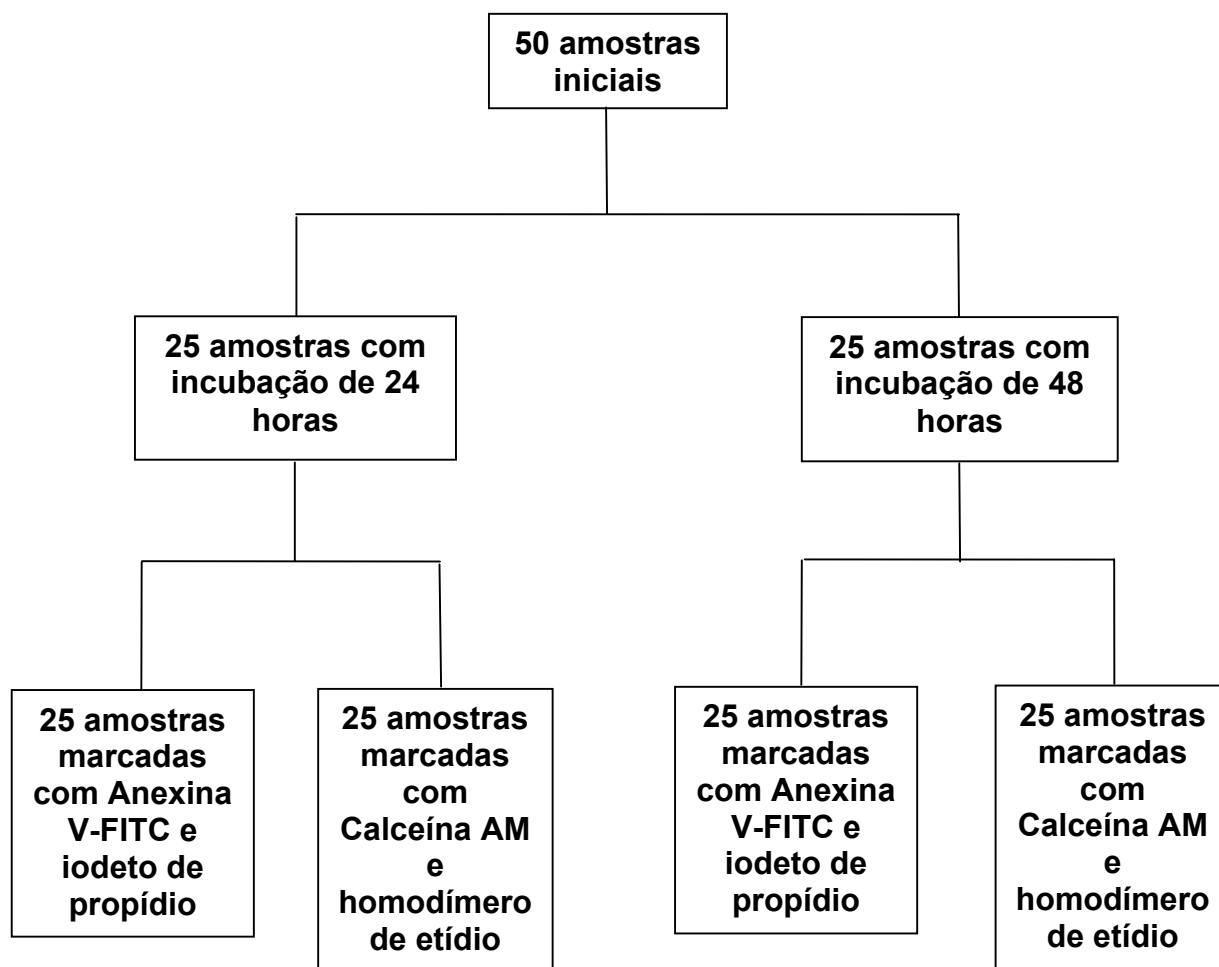
Em seguida, as células mononucleares foram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI 1640 com 25 mM de HEPES e 2 mM de L-glutamina (*Sigma Chemical Company, Sant Louis, U.S.A.*), suplementado com 1000 µL de soro bovino fetal inativado pelo calor (*Sigma Chemical Company, Sant Louis, U.S.A.*), 10 UI/mL de penicilina, 10 µg/mL de estreptomicina e 5 µL de anfotericina B.

Finalmente, as células mononucleares foram contadas em câmara de Neubauer e a suspensão celular foi ajustada para 5×10^5 células por mililitro de meio RPMI 1640, suplementado com 1000 µL de soro bovino fetal inativado pelo calor (*Sigma Chemical Company, Sant Louis, U.S.A.*), 10 UI/mL de penicilina, 10 µg/mL de estreptomicina e 5 µL de anfotericina B.

3.4 Manutenção das células mononucleares

Para cada amostra, foram mantidos 2 meios de cultura com volume final de 2 mL cada, contendo 5×10^5 células mononucleares por mililitro de meio RPMI 1640 (contendo 25 mM de HEPES e 2 mM de L-glutamina (*Sigma Chemical Company, Sant Louis, U.S.A.*), suplementado com 1000 µL de soro bovino fetal inativado pelo calor (*Sigma Chemical Company, Sant Louis, U.S.A.*), 10 UI/mL de penicilina, 10 µg/mL de estreptomicina e 5 µL de anfotericina B.

Das 50 amostras, 25 foram mantidas por 24 horas, enquanto as 25 restantes foram mantidas por 48 horas, ambas a 37° Celsius, em estufa com 5% de CO₂. (Fluxograma 1).



FLUXOGRAMA 1. Separação das amostras de acordo com o tempo de incubação e tipo de ensaio de verificação da viabilidade e apoptose de células mononucleares.

3.5 Ensaios para verificação da viabilidade e apoptose dos linfócitos

Após o período de incubação de 24 ou 48 horas, as suspensões de células foram centrifugadas a 1000 rpm (168 g) por 10 minutos e ressuspendidas com solução de PBS pH 7,4. Em seguida, as células foram novamente centrifugadas a 1000 rpm (168 g) por 10 minutos.

Posteriormente, os linfócitos viáveis, em apoptose e inviáveis foram determinados utilizando-se o conjunto reativo para detecção de apoptose *ANNEXIN*

V-FITC[®] contendo anexina V-FITC, iodeto de propídio e tampão (*SIGMA Chemical Co. Saint Louis, MO, EUA*) e o conjunto reativo para detecção de viabilidade e citotoxicidade *LIVE/DEAD*[®] (L-3224), contendo calceína AM e homodímero-1 de etídio (EthD-1) (*Molecular Probes Incorporation, Eugene, Oregon, EUA*) (Fluxograma 1).

3.5.1 Marcação das células com o conjunto reativo ANNEXIN V-FITC[®] e iodeto de propídio

Após a segunda centrifugação, as células foram ressuspensas no tampão de ligação, previamente diluído em água deionizada na proporção 1:10. Em seguida, 500 µL da suspensão de células foram marcados com 5 µL de anexina V-FITC e 10 µL de iodeto de propídio.

Após 10 minutos de repouso ao abrigo da luz, a fluorescência das células foi imediatamente determinada em citômetro de fluxo. As células que se encontravam nos estágios iniciais da apoptose foram marcadas intensamente por anexina V-FITC, que emite fluorescência verde como resultado de sua ligação preferencial aos resíduos de fosfatidilserina, externalizados no início do processo. Já as células necróticas ou inviáveis foram marcadas intensamente por iodeto de propídio, que emite fluorescência vermelha, e menos intensamente por anexina V-FITC. As células viáveis, por sua vez, não foram marcadas nem por anexina V-FITC, nem por iodeto de propídio.

3.5.2 Marcação das células com o conjunto reativo *LIVE/DEAD*[®] contendo calceína AM e homodímero de etídio (EthD-1)

Após a segunda centrifugação, as células foram marcadas com 200 µL da solução de uso de calceína AM 1 µM e homodímero de etídio 8 µM em solução de PBS pH 7,4.

Após 10 minutos de repouso em temperatura ambiente, a fluorescência das células foi imediatamente determinada em citômetro de fluxo. As células viáveis foram marcadas por calceína AM, como resultado da ação das esterases intracelulares, ativas somente na célula íntegra. Conseqüentemente à diminuição da

atividade esterásica e ao aumento das alterações físicas e/ou bioquímicas da membrana celular, as células em apoptose apresentaram fraca marcação por calceína AM e progressiva marcação por EthD-1, que apresenta fluorescência vermelha. As células inviáveis, por sua vez, não foram marcadas por calceína AM, mas foram intensamente marcadas por EthD-1.

3.5.3 Avaliação da viabilidade e apoptose dos linfócitos por citometria de fluxo

Os ensaios de viabilidade das células mononucleares foram realizados no Hemocentro do Estado de Santa Catarina (HEMOSC) em citômetro de fluxo modelo FACSCallibur (*Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, U.S.A.*), através de dois programas, o CELLQuest e o PAINT-A-GATE (Figura 7).



FIGURA 7. Citômetro de fluxo, modelo FACSCallibur (*Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, U.S.A.*).

Posteriormente à aquisição das células em citômetro de fluxo FACSCallibur (*Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, U.S.A.*) através do programa CELLQuest, células e/ou estruturas foram selecionadas de acordo com seu volume e granulosidade (Figuras 8 e 9). Assim, as células e/ou estruturas

maiores, como os monócitos, foram excluídas, posto que a análise de sua viabilidade não foi objetivo deste estudo.

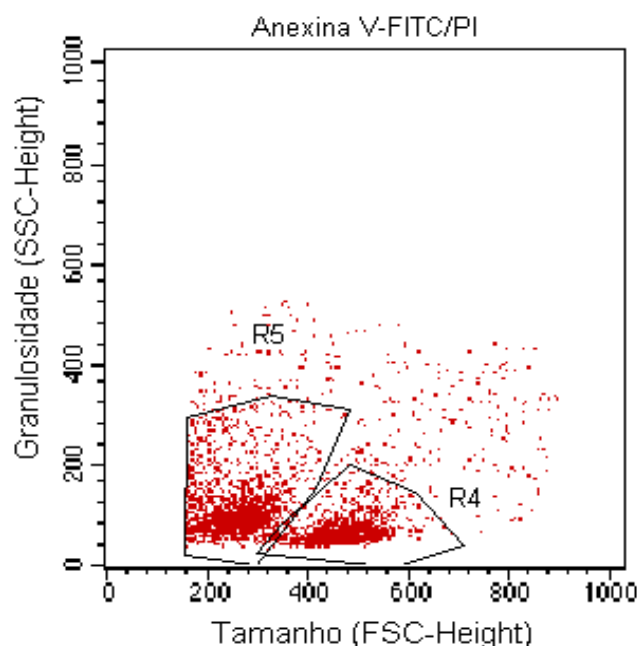


FIGURA 8. Seleção de células e/ou estruturas marcadas com Anexina V-FITC/PI, de acordo com seu volume e sua granulosidade, através do programa CELLQuest.

A seleção das células marcadas com Anexina V-FITC/PI permitiu a distinção de três grupos celulares, que podem ser classificados como: a) células viáveis, que constituem o grupo de células localizado no quadrante inferior esquerdo e que não foram marcadas por anexina ou iodeto de propídio; b) células em apoptose, que constituem o grupo de células localizado no quadrante inferior direito, marcadas intensamente por anexina V-FITC e c) células inviáveis, que se encontram no quadrante superior direito, marcadas por iodeto de propídio e por anexina V-FITC (Figura 10).

Por outro lado, a seleção das células marcadas com Calceína AM/EthD-1 permitiu a distinção de três grupos celulares, que podem ser classificados como: a) células viáveis, que constituem o grupo de células localizado no quadrante inferior direito e que foram marcadas intensamente pela calceína; b) células em apoptose, que constituem o grupo de células localizado no quadrante inferior esquerdo e que foram marcadas pela calceína e pelo EthD-1, de acordo com o estágio de apoptose em que se encontram e c) células inviáveis, que se encontram no quadrante superior

esquerdo, as quais foram intensamente marcadas pelo homodímero de etídio (Figura 11).

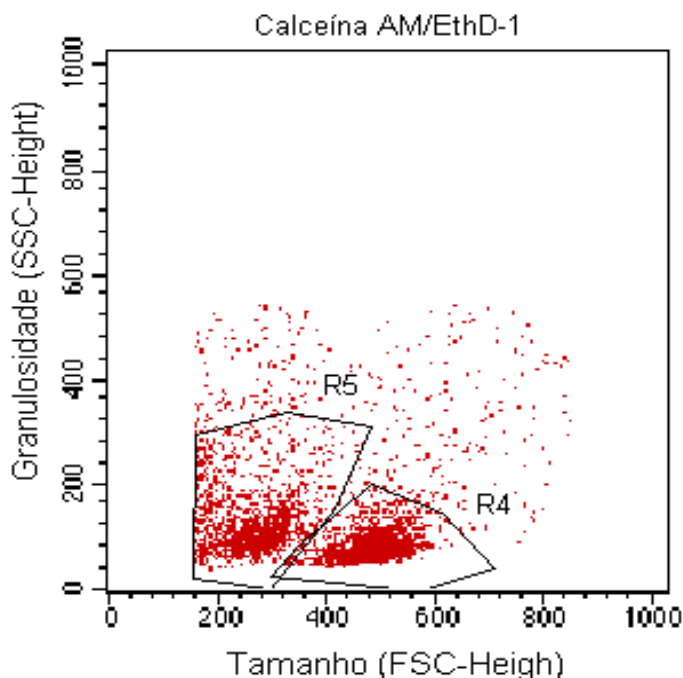


FIGURA 9. Seleção de células e/ou estruturas marcadas com Calceína AM/EthD-1, de acordo com seu volume e sua granulosidade, através do programa CELLQuest.

Assim, as imagens das células e/ou estruturas selecionadas foram salvas em arquivo específico, para que fosse possível sua análise através do programa PAINT-A-GATE.

No PAINT-A-GATE, realizou-se novamente a seleção das células e/ou estruturas de acordo com seu volume e granulosidade. Desse modo, células maiores, como os monócitos e as células que apresentam granulações, como os segmentados, que não foram separados durante o isolamento das células mononucleares pelo Ficoll-Paque, foram excluídas. (Figuras 12 e 13).

As distribuições das células obtidas pelo PAINT-A-GATE são semelhantes às aquelas verificadas no CELLQuest. Entretanto, o programa PAINT-A-GATE permite que os linfócitos pertencentes aos três grupos distintos sejam selecionados e coloridos.

É importante ressaltar que as células que se encontravam muito próximas do eixo y foram excluídas, posto que correspondiam, provavelmente, a fragmentos celulares restantes.

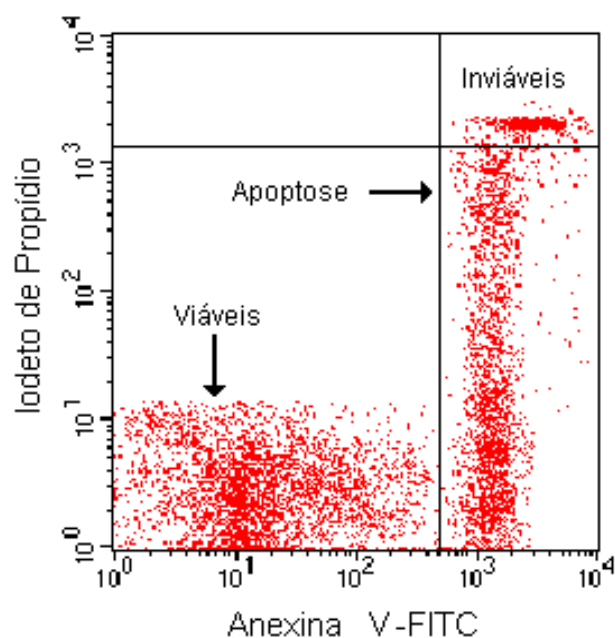


FIGURA 10. Distribuição das células selecionadas, através do CELLQuest, de acordo com a intensidade da marcação pela anexina e/ou iodeto de propídio.

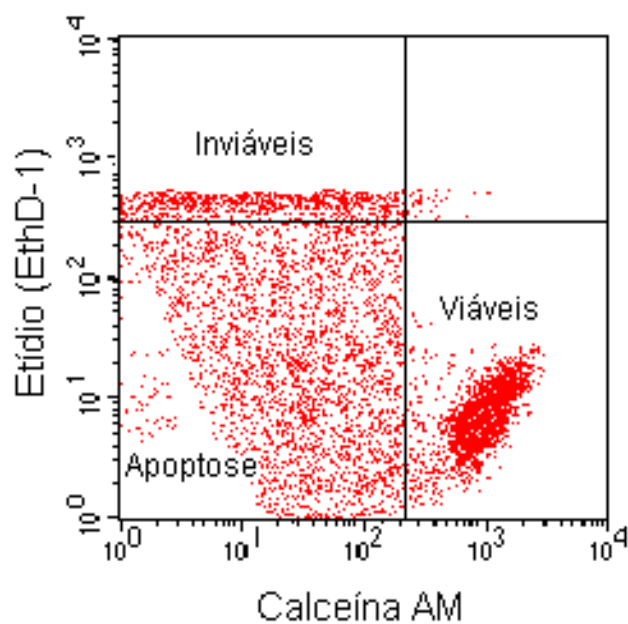


FIGURA 11. Distribuição das células selecionadas, através do CELLQuest, de acordo com a intensidade da marcação pela calceína AM e/ou Homodímero de Etídio.

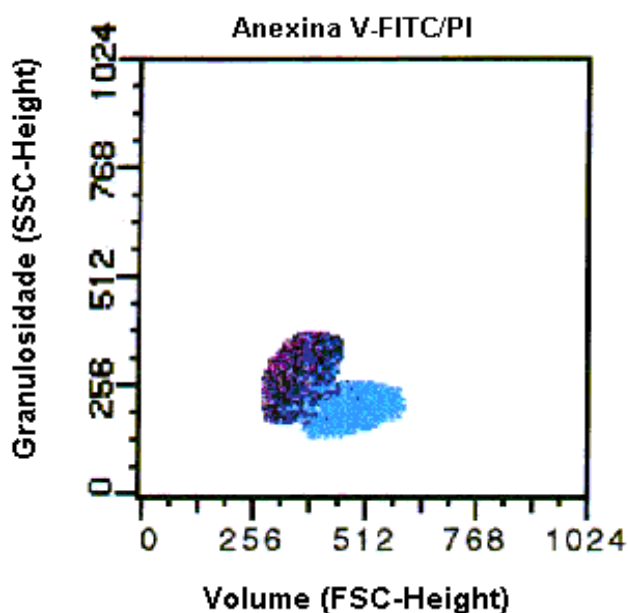


FIGURA 12. Células selecionadas e analisadas através do PAINT A GATE, de acordo com o seu volume e sua granulosidade, marcadas pela anexina e/ou iodeto de propídio.

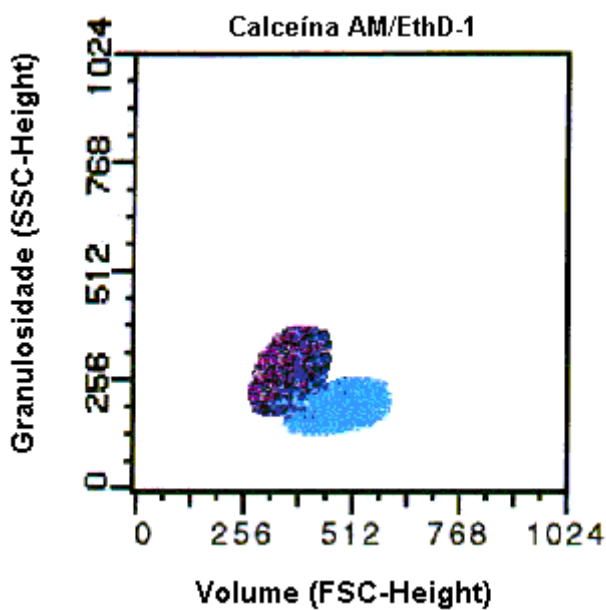


FIGURA 13. Células selecionadas e analisadas através do PAINT A GATE, de acordo com o seu volume e sua granulosidade, marcadas pela calceína e/ou homodímero de etídio.

Durante a avaliação da viabilidade celular com o conjunto reativo *ANNEXIN V-FITC*[®], os linfócitos marcados mais intensamente com anexina, que constituem o grupo localizado na porção intermediária e à direita, foram coloridos de azul claro. Os linfócitos marcados mais intensamente com iodeto de propídio e localizados na parte superior à direita, por sua vez, foram coloridos de vermelho. Finalmente, os linfócitos localizados na porção inferior à esquerda, que não apresentam marcação por anexina ou iodeto de propídio, foram coloridos de azul escuro. A escolha das cores utilizadas levou em conta a proximidade destas com a fluorescência emitida pelos corantes quando da marcação das células. (Figura 14).

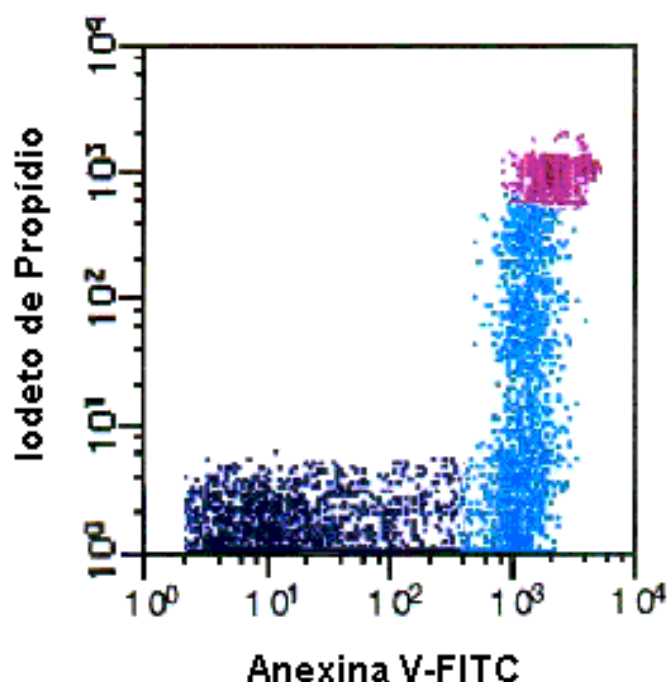


FIGURA 14. Distribuição dos linfócitos, obtida através do PAINT A GATE, de acordo com a intensidade de sua marcação pela anexina e/ou iodeto de propídio.

Durante a avaliação da viabilidade celular com o conjunto reativo *LIVE/DEAD*[®], os linfócitos marcados mais intensamente com calceína, que constituem o grupo localizado na porção inferior e à direita, foram coloridos de azul

claro. Os linfócitos marcados com mais intensidade pelo homodímero de etídio e localizados na parte superior, por sua vez, foram coloridos de vermelho. Finalmente, os linfócitos localizados na porção intermediária à esquerda, marcados gradativamente com menos intensidade pela calceína e com mais intensidade pelo homodímero de etídio, foram coloridos de azul escuro. A escolha das cores utilizadas levou em conta a proximidade destas com a fluorescência emitida pelos corantes quando da marcação das células. (Figura 15).

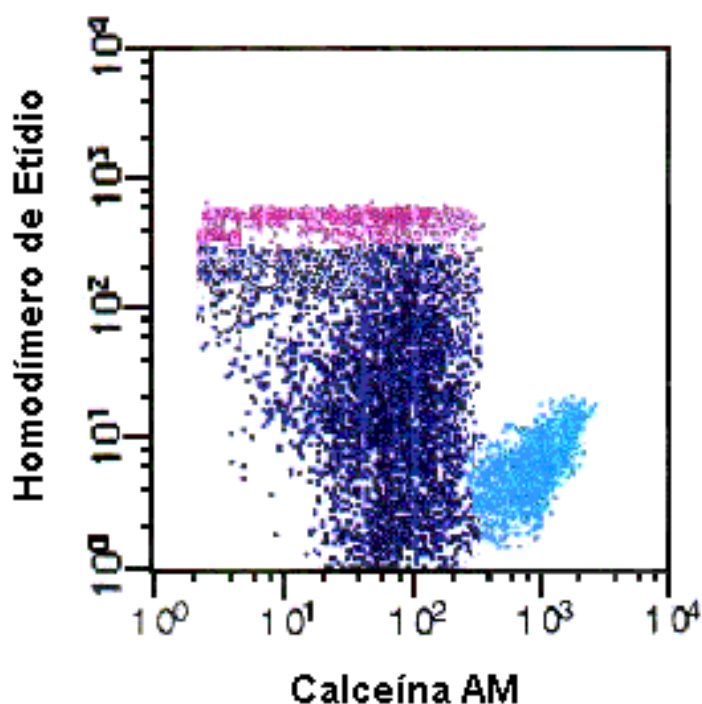


FIGURA 15. Distribuição dos linfócitos, obtida através do PAINT A GATE, de acordo com a intensidade de sua marcação pela calceína e/ou homodímero de etídio.

Após a seleção das células e/ou estruturas através do CELLQuest e do PAINT-A-GATE, de acordo com seu volume e granulosidade, realizou-se a exclusão das estruturas que se encontravam muito próximas do eixo y, ou seja, que foram marcadas praticamente apenas por homodímero de etídio ou iodeto de etídio, posto que correspondiam, possivelmente, a fragmentos celulares restantes.

Posteriormente à avaliação da viabilidade e apoptose dos linfócitos, realizada como descrito, determinou-se a proporção (%) dos grupos celulares, em apoptose e inviáveis (Figuras 16 e 17).

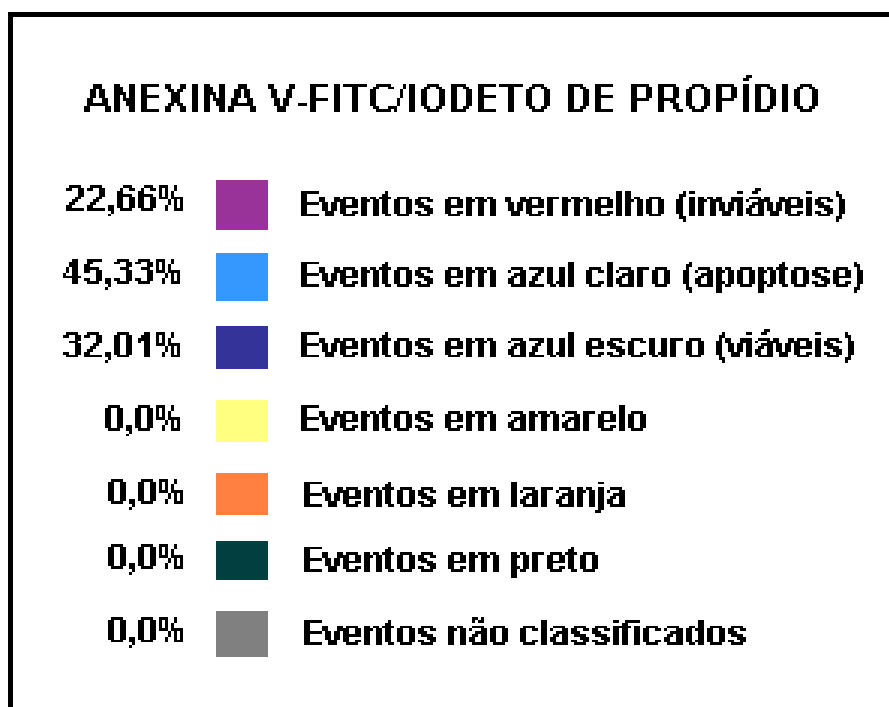


FIGURA 16. Resultado final da avaliação da viabilidade e apoptose de linfócitos, marcados com anexina e/ou iodeto de propídio.

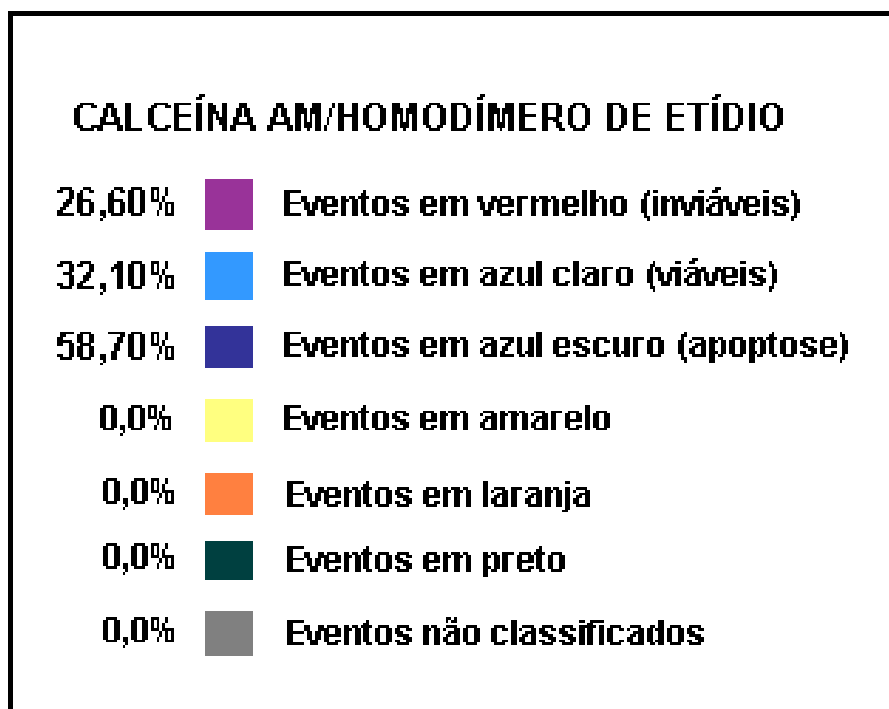


FIGURA 17. Resultado final da avaliação da viabilidade e apoptose de linfócitos, marcados com calceína AM e/ou homodímero de etídio.

3.6 Análise estatística

A análise estatística consistiu de uma parte descritiva (BUSSAB & MORETIN, 2002), com a determinação das estatísticas descritivas básicas, e de uma parte inferencial, baseada em testes de comparação de médias para dados pareados (BUSSAB & MORETIN, 2002), que estudou o efeito do tipo de marcador na classificação dos linfócitos viáveis, em apoptose e inviáveis para os tempos de 24 e 48 horas. Esta comparação foi realizada através do teste t para dados pareados ao nível de significância (α) de 5% (MONTGOMERY, 2001).

A avaliação das correlações entre os níveis de linfócitos viáveis, em apoptose e inviáveis, obtidos através da marcação pela calceína AM/homodímero de etídio, e os níveis dos mesmos grupos celulares obtidos pela anexina V-FITC/PI, foi realizada através da determinação dos coeficientes correlação de Pearson, ao nível de significância (α) de 5%

Para a realização das análises dos dados obtidos, foram utilizados os softwares SAS[®] System e *Statistica*[®] 6.0.

4. RESULTADOS

4.1 Análise descritiva

A partir da análise estatística descritiva, foram determinados os valores de mínimo, máximo, mediana, média e erro padrão dos valores obtidos para os grupos de células viáveis, apoptóticas e inviáveis, a partir dos marcadores anexina V-FITC/iodeto de propídio e calceína AM/homodímero de etídio, em função dos tempos de incubação de 24 e 48 horas (Tabelas 3 e 4, Apêndice 1).

TABELA 3. Estatísticas descritivas para as 50 amostras analisadas, com tempo de incubação de 24 horas, com resultados expressos em valores percentuais.

Tipo de Célula (%)	Marcador	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	Erro Padrão
Inviáveis	Anexina	5,89	34,78	17,16	16,71	1,34
	Calceína	2,49	33,19	11,85	13,02	1,44
Apoptose	Anexina	15,88	73,22	39,22	42,31	3,24
	Calceína	14,92	83,61	46,19	46,95	3,56
Viáveis	Anexina	9,56	78,18	41,47	40,51	3,95
	Calceína	6,55	82,59	38,76	39,87	4,22

TABELA 4. Estatísticas descritivas para as 50 amostras analisadas, com tempo de incubação de 48 horas, com resultados expressos em valores percentuais

Tipo de Célula (%)	Marcador	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	Erro Padrão
Inviáveis	Anexina	8,26	41,54	25,50	25,60	2,01
	Calceína	5,17	44,83	21,33	20,99	2,00
Apoptose	Anexina	8,06	67,73	32,21	33,83	2,65
	Calceína	16,29	64,79	38,19	37,67	2,47
Viáveis	Anexina	3,70	76,77	32,85	40,24	4,06
	Calceína	6,77	76,68	38,33	41,22	4,10

A análise estatística descritiva prévia demonstrou que os níveis de viabilidade, apoptose e inviabilidade celular apresentaram distribuição aproximadamente normal de valores. Esta distribuição permite validar a análise estatística inferencial utilizada, baseada em testes de comparação de médias para dados pareados.

4.2 Análise inferencial

A partir da análise estatística inferencial, foram determinados os resultados da comparação dos valores percentuais médios, obtidos para os grupos de células viáveis, apoptóticas e inviáveis, para cada tempo de incubação, tomando o tipo de marcador como fator para análise. A comparação foi realizada através do teste t para dados pareados, com nível de significância (α) de 5%. (Apêndice 2).

4.2.1 Avaliação das correlações entre os resultados obtidos para calceína AM/homodímero de etídio e anexina V-FITC/iodeto de propídio após 24 horas de incubação

A determinação dos coeficientes de correlação de Pearson demonstrou que os níveis de viabilidade, apoptose e inviabilidade celular, obtidos pela marcação com calceína AM/homodímero de etídio após 24 horas de incubação, apresentaram significativas correlações entre os níveis de linfócitos viáveis ($r=0,9517$, $p<0,001$), em apoptose ($r=0,9681$, $p<0,001$) e inviáveis ($r=0,8170$, $p<0,001$) obtidos pela marcação com anexina V-FITC/iodeto de propídio após 24 horas de incubação. (Figuras 18 a 20).

4.2.2 Avaliação das correlações entre os resultados obtidos para calceína AM/homodímero de etídio e anexina V-FITC/iodeto de propídio após 48 horas de incubação

A determinação dos coeficientes de correlação de Pearson demonstrou que os níveis de linfócitos viáveis, em apoptose e inviáveis, obtidos pela marcação com calceína AM/homodímero de etídio após 48 horas de incubação, apresentaram significativas correlações entre os níveis viabilidade ($r=0,9557$ $p<0,001$), apoptose ($r=0,9160$, $p<0,001$) e inviabilidade ($r=0,8968$, $p<0,001$) celulares obtidos pela marcação com anexina V-FITC/iodeto de propídio após 48 horas. (Figuras 21 a 23).

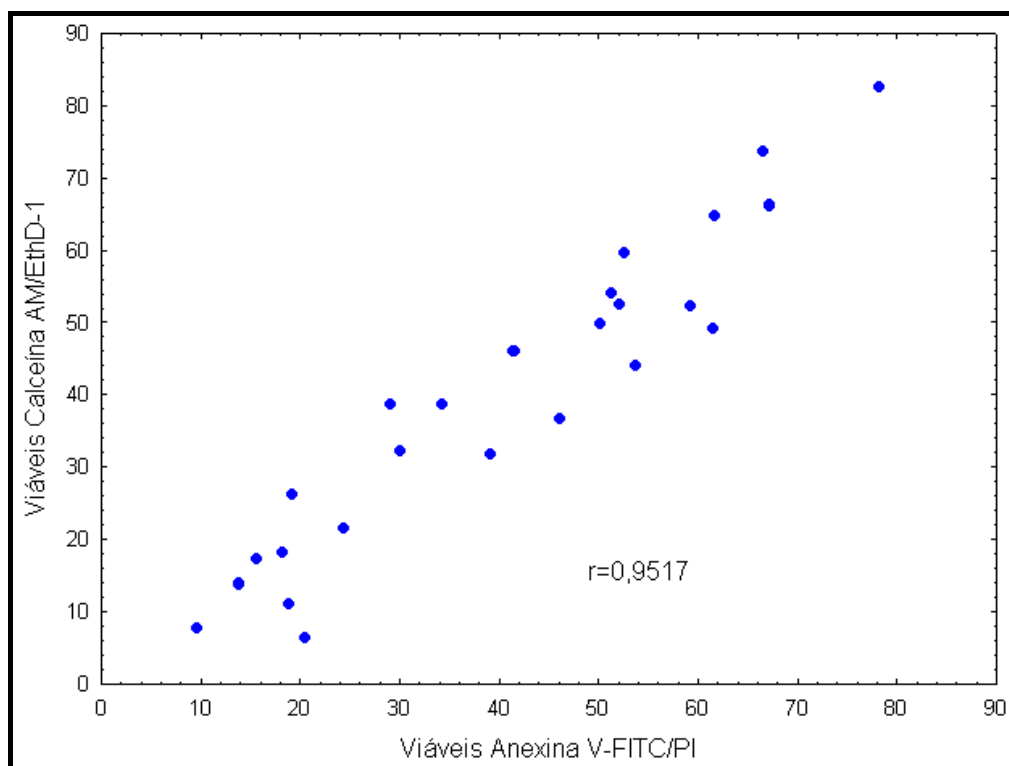


FIGURA 18. Correlação entre níveis de linfócitos viáveis obtidos pela calceína AM/homodímero de etídio e os níveis de linfócitos viáveis obtidos pela anexina V-FITC/iodeto de propídio após 24 horas.

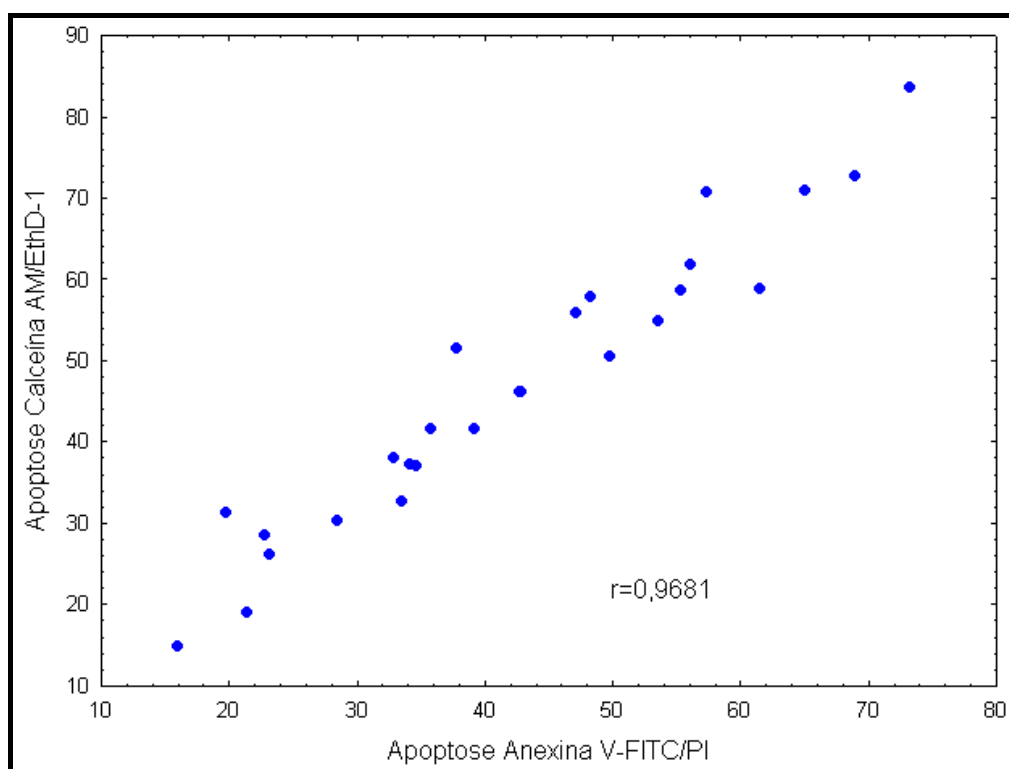


FIGURA 19. Correlação entre níveis de linfócitos em apoptose obtidos pela calceína AM/homodímero de etídio e os níveis de linfócitos em apoptose obtidos pela anexina V-FITC/iodeto de propídio após 24 horas.

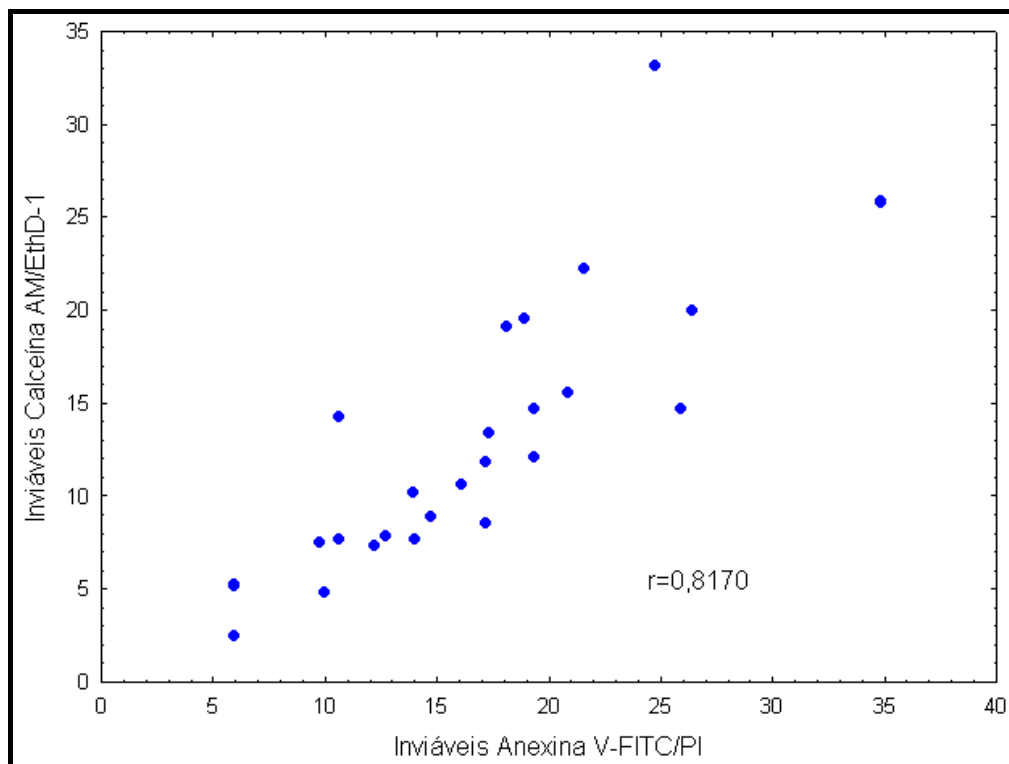


FIGURA 20. Correlação entre níveis de linfócitos inviáveis obtidos pela calceína AM/homodímero de etídio e os níveis de linfócitos inviáveis obtidos pela anexina V-FITC/iodeto de propídio após 24 horas.

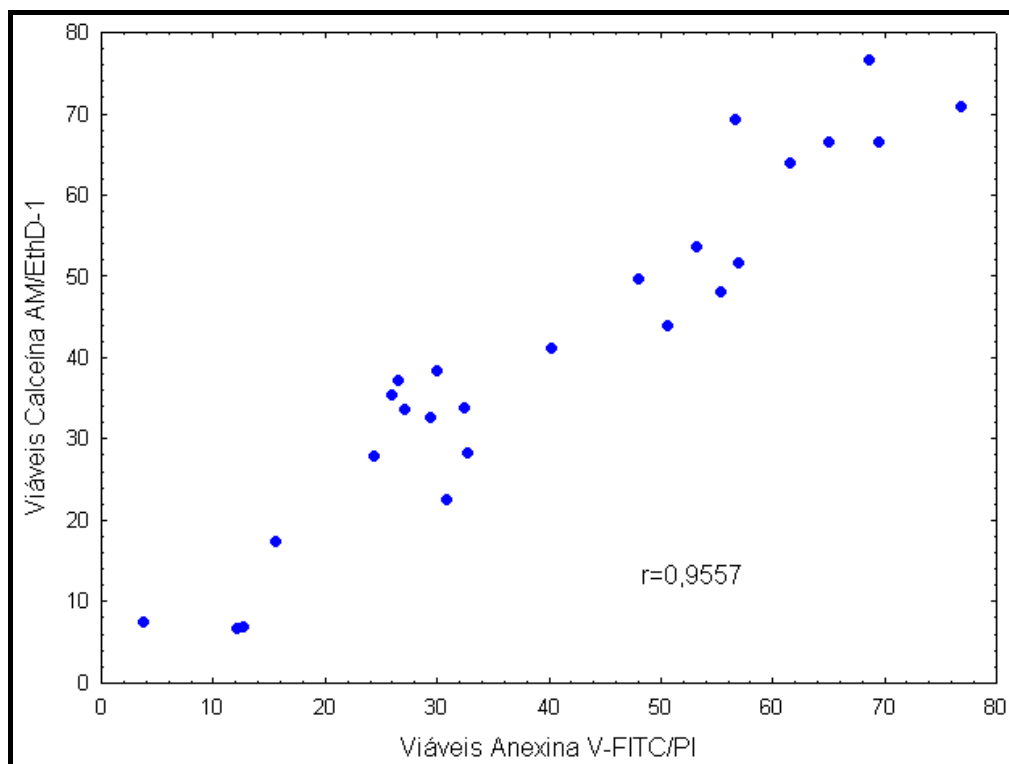


FIGURA 21. Correlação entre níveis de linfócitos viáveis obtidos pela calceína AM/homodímero de etídio e os níveis de linfócitos viáveis obtidos pela anexina V-FITC/iodeto de propídio após 48 horas.

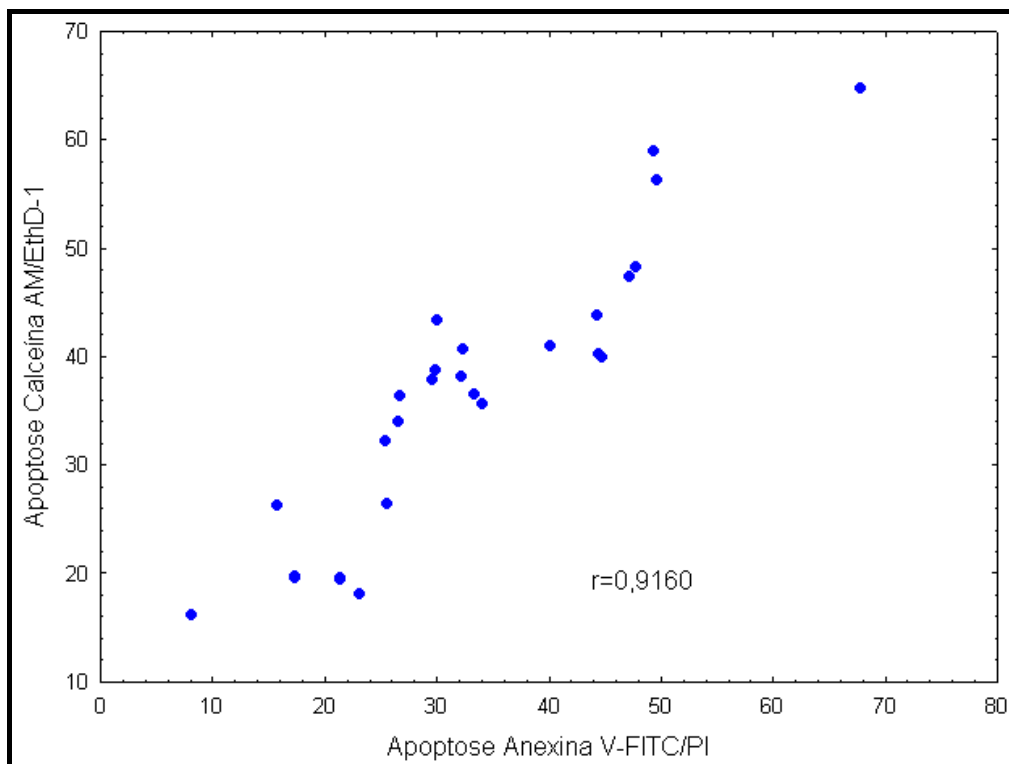


FIGURA 22. Correlação entre níveis de linfócitos em apoptose obtidos pela calceína AM/homodímero de etídio e os níveis de linfócitos em apoptose obtidos pela anexina V-FITC/iodeto de propídio após 48 horas.

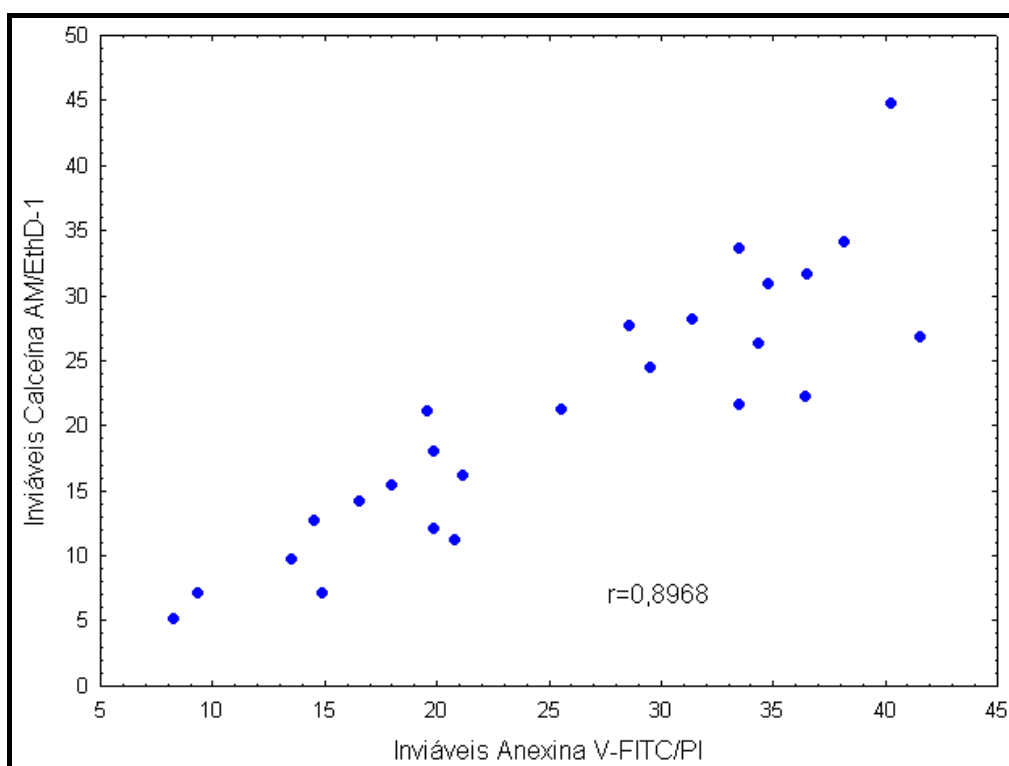


FIGURA 23. Correlação entre níveis de linfócitos inviáveis obtidos pela calceína AM/homodímero de etídio e os níveis de linfócitos inviáveis obtidos pela anexina V-FITC/iodeto de propídio após 48 horas.

4.2.3 Quantificação de linfócitos viáveis após 24 horas de incubação

A determinação dos níveis de viabilidade celular após 24 horas de incubação não demonstrou diferença estatisticamente significativa ($p=0,6284$) entre os valores percentuais médios de linfócitos viáveis, obtidos pelos marcadores anexina V-FITC/PI ($40,51\% \pm 3,95$) e calceína AM/EthD-1 ($39,87\% \pm 4,22$). (Figura 24).

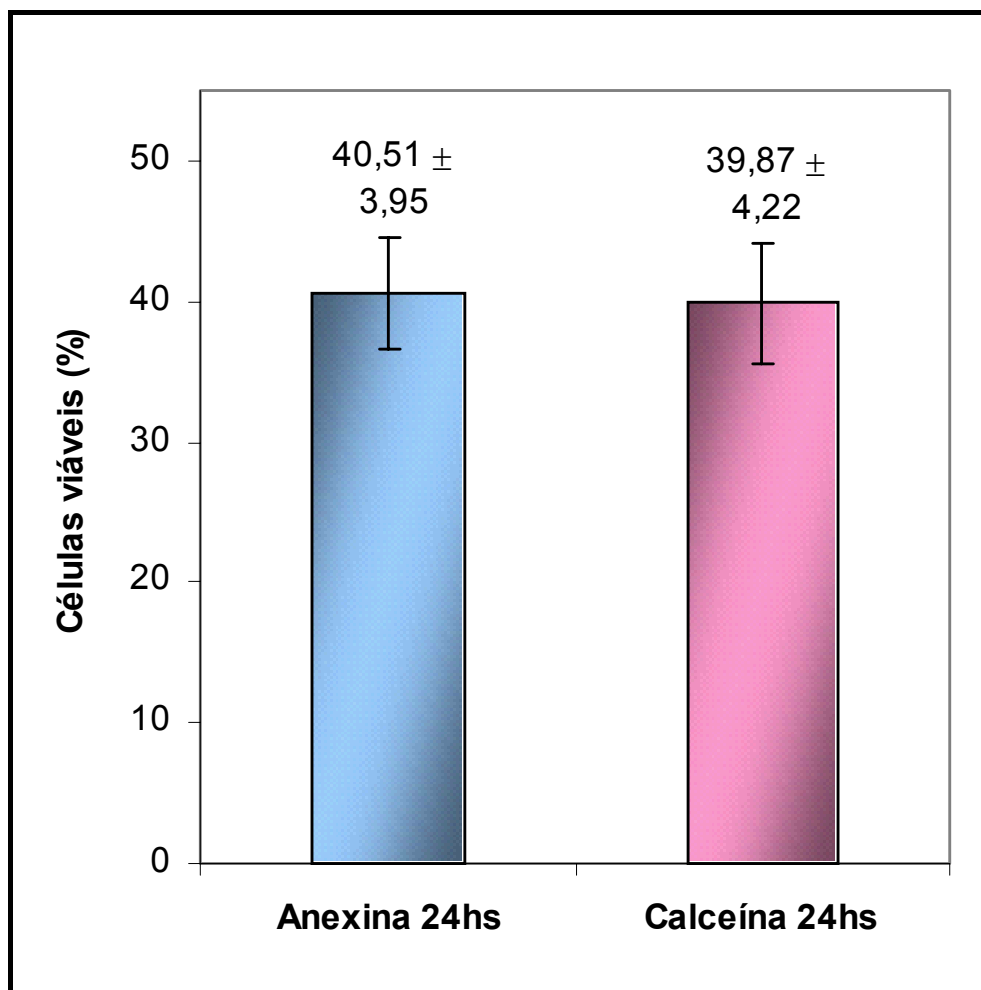


FIGURA 24. Valor percentual médio de células viáveis obtidas com anexina V-FITC/iodeto de propídio e calceína AM/ homodímero de etídio ($n=25$) após 24 horas de incubação.

Resultados estão expressos como média \pm erro padrão.

Não houve diferença significativa entre os marcadores ($p= 0,6284$).

4.2.4 Quantificação de linfócitos em apoptose após 24 horas de incubação

A determinação dos níveis de apoptose após 24 horas de incubação demonstrou que os valores percentuais médios de linfócitos em apoptose obtidos pelo marcador calceína AM/EthD-1 ($46,95\% \pm 3,65$) foram estatisticamente superiores ($p < 0,0001$) quando comparados aos valores obtidos pelo marcador anexina V-FITC/PI ($42,31\% \pm 3,24$). (Figura 25).

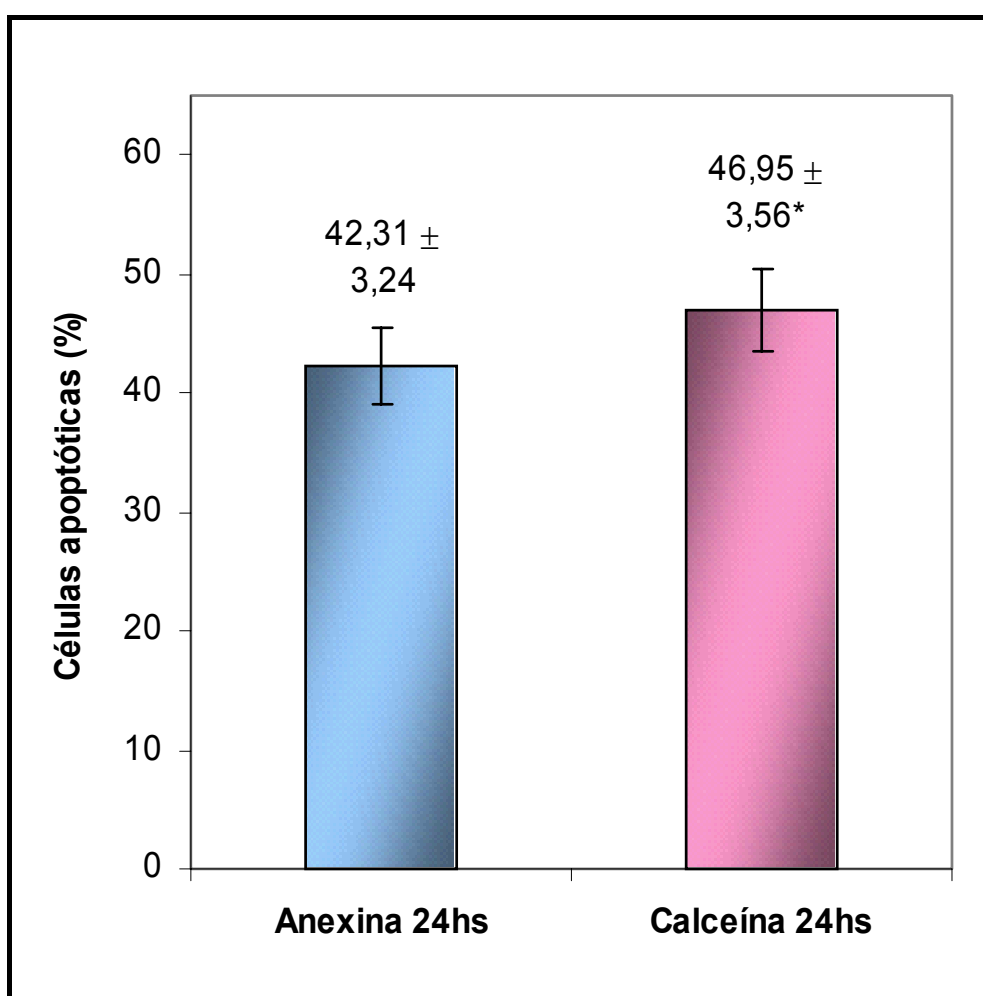


FIGURA 25. Valor percentual médio de células apoptóticas obtidas com anexina V-FITC/ iodeto de propídio e calceína AM/ homodímero de etídio ($n=25$) após 24 horas de incubação.

Resultados estão expressos como média \pm erro padrão.

Valores assinalados com (*) indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores percentuais médios.

Houve diferença significativa entre os marcadores ($p < 0,0001$).

4.2.5 Quantificação de linfócitos inviáveis após 24 horas de incubação

A determinação dos níveis de inviabilidade após 24 horas de incubação demonstrou que os valores percentuais médios de linfócitos inviáveis obtidos pelo marcador anexina V-FITC/PI ($16,71\% \pm 1,34$) foram estatisticamente superiores ($p=0,0002$) quando comparados aos valores obtidos pelo marcador calceína AM/EthD-1 ($13,02\% \pm 1,44$). (Figura 26).

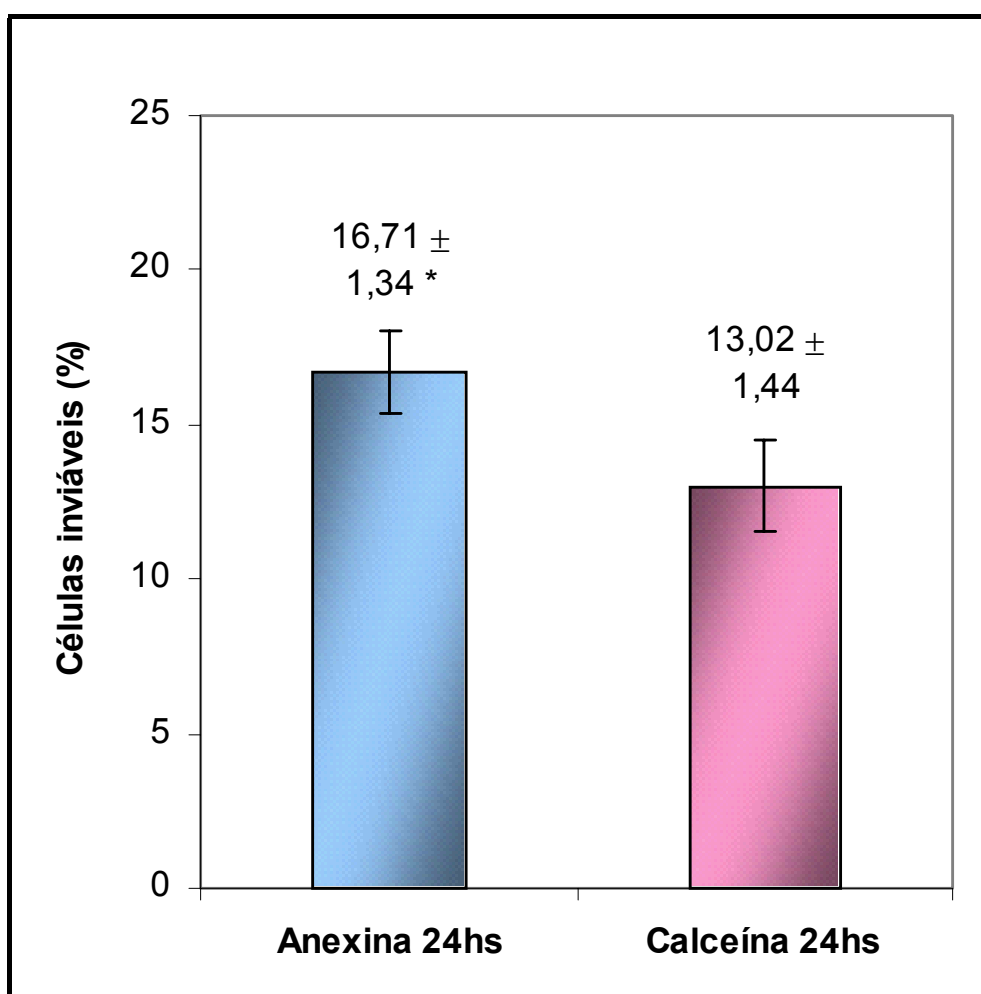


FIGURA 26. Valor percentual médio de células inviáveis obtidas com anexina V-FITC/ iodeto de propídio e calceína AM/ homodímero de etídio ($n=25$) após 24 horas de incubação.

Resultados estão expressos como média \pm erro padrão.

Valores assinalados com (*) indicam diferença significativa ($p<0,05$) entre os valores percentuais médios.

Houve diferença significativa entre os marcadores ($p=0,0002$).

4.2.6 Quantificação de linfócitos viáveis após 48 horas de incubação

A determinação dos níveis de viabilidade celular após 48 horas de incubação não demonstrou diferença estatisticamente significativa ($p=0,4290$) entre os valores percentuais médios de linfócitos viáveis, obtidos pelos marcadores anexina V-FITC/PI ($40,24\% \pm 4,06$) e calceína AM/EthD-1 ($41,22\% \pm 4,10$). (Figura 27).

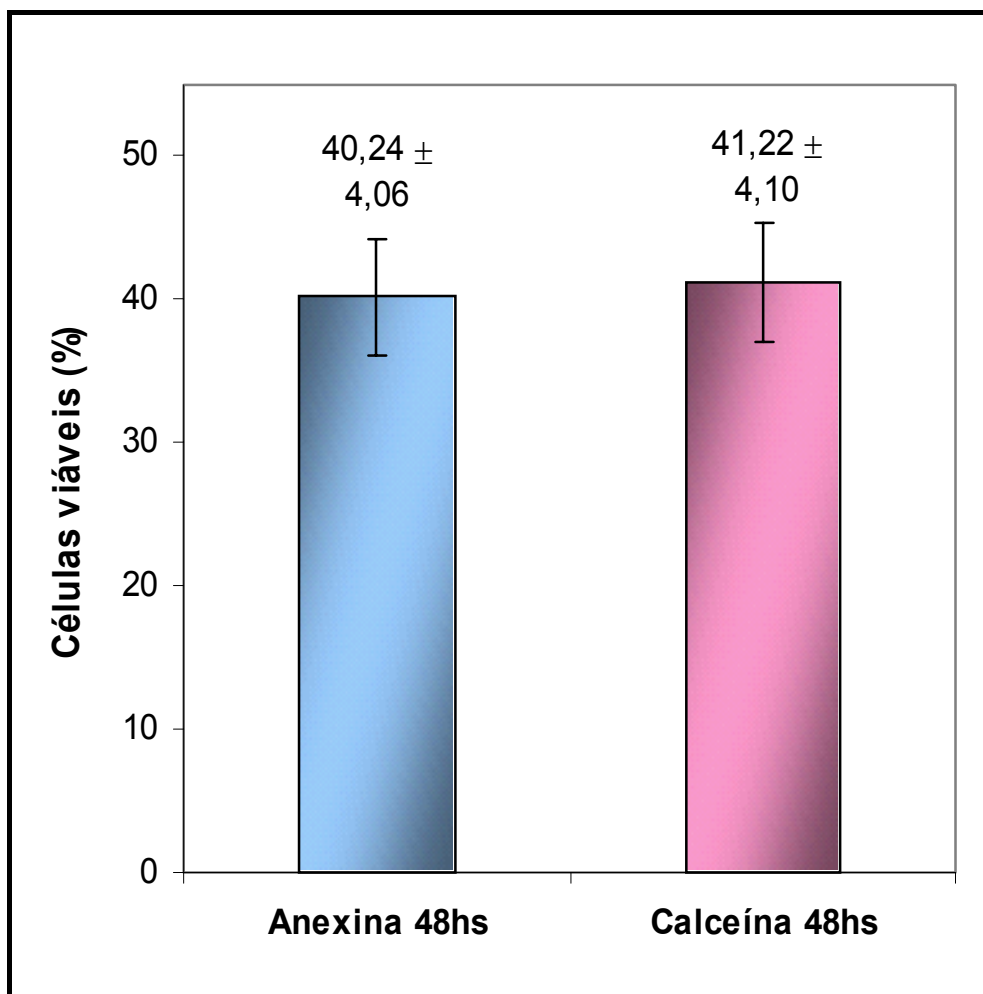


FIGURA 27. Valor percentual médio de células viáveis obtidas com anexina V-FITC/iodeto de propídio e calceína AM/ homodímero de etídio ($n=25$) após 48 horas de incubação.

Resultados estão expressos como média \pm erro padrão.

Não houve diferença significativa entre os marcadores ($p=0,4290$).

4.2.7 Quantificação de linfócitos em apoptose após 48 horas de incubação

A determinação dos níveis de apoptose após 48 horas de incubação demonstrou que os valores percentuais médios de linfócitos em apoptose obtidos pelo marcador calceína AM/EthD-1 ($37,67\% \pm 2,47$) foram estatisticamente superiores ($p=0,0014$) quando comparados aos valores obtidos pelo marcador anexina V-FITC/PI ($33,83\% \pm 2,65$). (Figura 28).

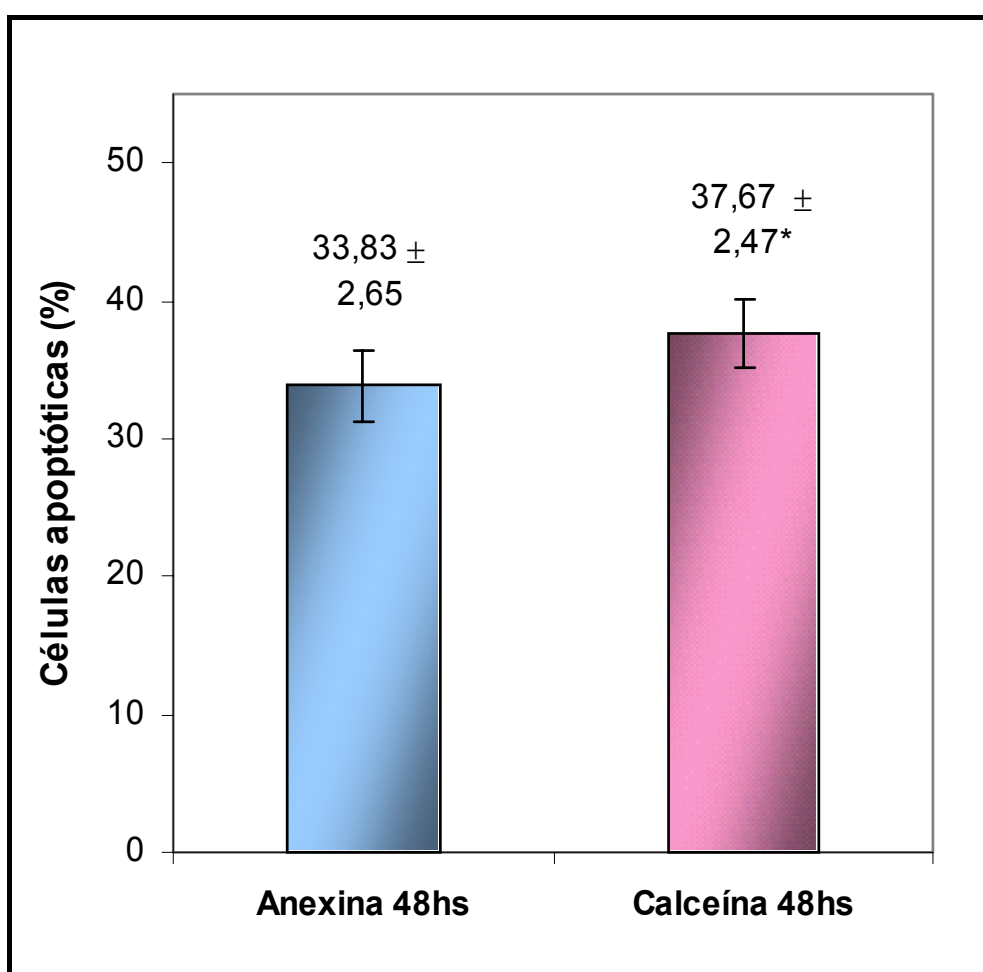


FIGURA 28. Valor percentual médio de células apoptóticas obtidas com anexina V-FITC/ iodeto de propídio e calceína AM/ homodímero de etídio ($n=25$) após 48 horas de incubação.

Resultados estão expressos como média \pm erro padrão.

Valores assinalados com (*) indicam diferença significativa ($p<0,05$) entre os valores percentuais médios.

Houve diferença significativa entre os marcadores ($p=0,0014$).

4.2.8 Quantificação de linfócitos inviáveis após 48 horas de incubação

A determinação dos níveis de inviabilidade celular após 48 horas de incubação demonstrou que os valores percentuais médios de linfócitos inviáveis obtidos pelo marcador anexina V-FITC/PI ($25,60\% \pm 2,01$) foram estatisticamente superiores ($p < 0,0001$) quando comparados aos valores obtidos pelo marcador calceína AM/EthD-1 ($20,99\% \pm 2,00$). (Figura 29).

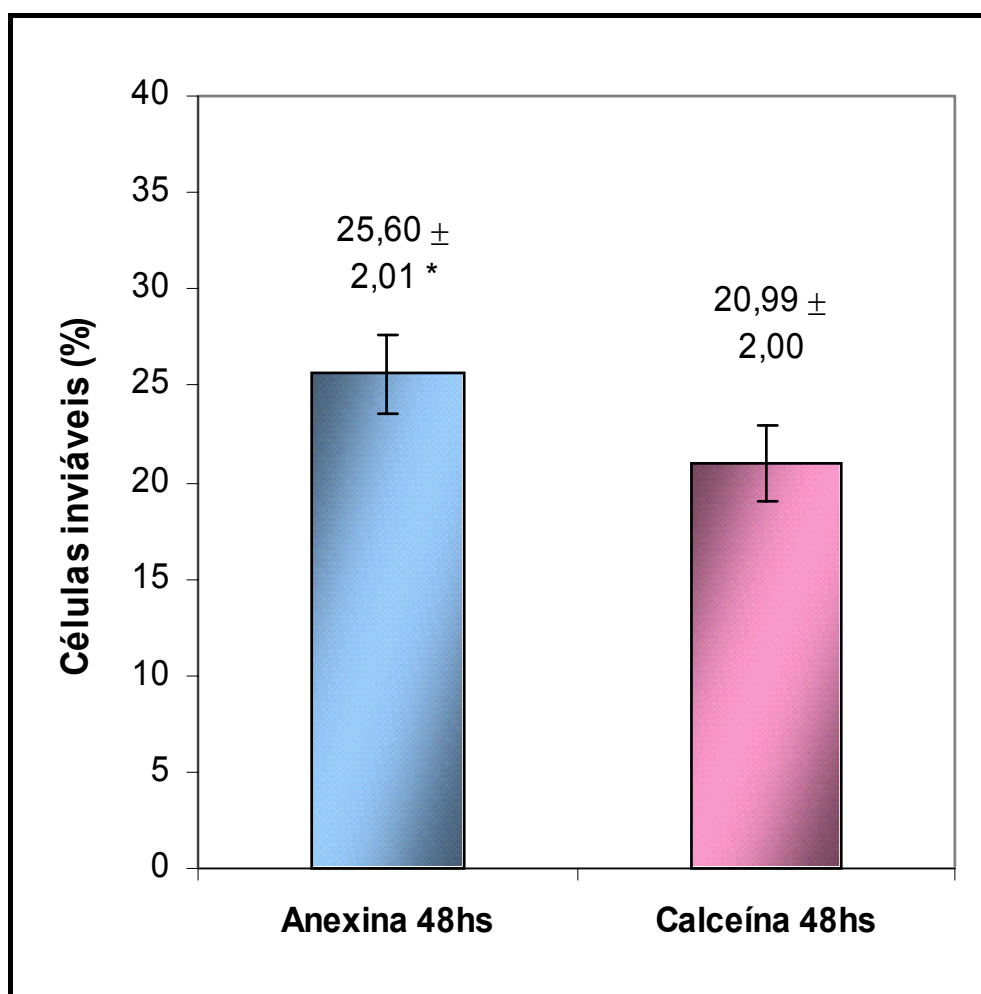


FIGURA 29. Valor percentual médio de células inviáveis obtidas com anexina V-FITC/ iodeto de propídio e calceína AM/ homodímero de etídio (n=25) após 48 horas de incubação.

Resultados estão expressos como média \pm erro padrão.

Valores assinalados com (*) indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores percentuais médios.

Houve diferença significativa entre os marcadores ($p < 0,0001$).

5. DISCUSSÃO

A morte programada da célula ou apoptose, uma via suicida resultante da ativação de endonucleases e subsequente redução do DNA a fragmentos nucleossomais (ROSEN & CASCIOLA-ROSEN, 1997; SALGAME et al., 1997), representa processos fisiológicos importantes, como os observados na metamorfose, embriogênese e atrofia tecidual, onde a restrição do número de células envolvidas é essencial (MEIER et al., 2000; EVANS & VOUSDEN, 2001; HUANG, 2002; RATHMELL et al., 2002).

No sistema imune, a apoptose congrega um processo crítico do desenvolvimento de linfócitos (LEONARDO et al., 1999; NAGATA et al., 1999; RATHMELL & THOMPSON, 2002). A eliminação de células T autoreativas e células B por apoptose, por exemplo, é essencialmente requisitada para o estabelecimento e manutenção da tolerância própria (GERMAIN, 2002; RATHMELL & THOMPSON, 2002). Além disso, a apoptose representa papel importante na regulação retroativa das respostas imunes por eliminação de células T ativadas após sua expansão inicial (BUDD, 2001).

A regulação anormal e desordenada da morte celular por apoptose pode estar envolvida na patogênese de diversas desordens, como isquemias cerebral e cardíaca, doenças autoimunes e neurodegenerativas, rejeições aos transplantes de órgãos e de medula óssea, ou ainda infecções virais, incluindo a infecção pelo HIV (BLANKBERG et al., 1998; SALMENA et al., 2003; AHR et al., 2004).

A apoptose pode ser diferenciada da necrose através da observação de determinadas alterações morfológicas, que são distintas e peculiares a cada processo de morte celular (WILLINGHAM, 1999). Enquanto a diminuição do volume celular, a condensação da cromatina e a formação de corpos apoptóticos caracterizam a apoptose, o aumento do volume celular e cariólise são característicos da necrose (KANNAN & JAIN, 2000). Além disso, os transtornos metabólicos que ocorrem durante a necrose promovem lesões osmóticas na membrana plasmática, o que, por outro lado, é substancialmente preservado durante a apoptose (BUSSOLATI et al., 1995).

Nos estágios iniciais de apoptose, os resíduos de fosfatidilserina são redistribuídos da face interna da bicamada lipídica à face externa da membrana plasmática (MOURDJEVA et al., 2005). Tal redistribuição reserva importantes

implicações fisiológicas, uma vez que promove o reconhecimento celular específico, bem como sua remoção pelos macrófagos (FADOK et al., 1992). A imediata fagocitose das células apoptóticas, por sua vez, previne o dano tissular potencial resultante da lise dessas células *in situ* (KOOPMAN et al., 1994).

A exposição de fosfatidilserina na superfície das células apoptóticas antecede a fragmentação do DNA e a formação de vesículas na membrana plasmática (MARTIN et al., 1995; BLANKENBERG et al., 1998) e tem sido amplamente empregada na avaliação e determinação da apoptose por microscopia e citometria de fluxo (KOOPMAN et al., 1994; GATTI et al., 1998).

O aumento progressivo da permeabilidade da membrana plasmática, por outro lado, apresenta-se como alteração morfológica típica das células apoptóticas tardias ou inviáveis (LECOEUR & GOUGEON, 1996). Este aumento de permeabilidade permite a entrada e permanência de toxinas no citoplasma o que, por sua vez, promovem a diminuição da atividade esterásica intracelular. Desse modo, o nível de atividade das esterases intracelulares pode ser utilizado tanto como sinalizador da viabilidade e manutenção da integridade da membrana, quanto da inviabilidade celular (BUSSOLATI et al., 1995; FLANAGAN PRODUKTE, 2003).

Embora o papel exato da apoptose durante a infecção pelo HIV não esteja completamente definido, crescentes evidências sugerem que este mecanismo de morte celular apresenta-se como o principal contribuidor da depleção dos linfócitos CD4 *in vivo* (BADLEY et al., 1997; PATEL et al., 2000; ROSHAL et al., 2001; LUM et al., 2003; CHAVES & CALLAS, 2004.).

Inicialmente, diversos estudos demonstram que linfócitos CD4 de pacientes contaminados com o vírus HIV apresentavam aumento da sensibilidade à apoptose espontânea *in vitro* (GOUGEON et al., 1993; LEWIS et al., 1994; MEYAARD et al., 1994). Mais tarde, outros autores demonstraram que este aumento da susceptibilidade à morte por apoptose é controlado, em parte, pela expressão de Bcl-2 e Fas (BOUDET et al., 1996, BADLEY et al., 1997). Recentemente, esta propensão dos linfócitos à apoptose passou a ser relacionada à ativação crônica do sistema imune, bem como à progressão da doença (BADLEY et al., 2000; PATEL et al., 2000; LUM et al., 2003; LELIEVRE et al., 2005).

Gougeon et. al. (1996) demonstraram que linfócitos T de pacientes infectados pelo vírus HIV apresentavam expressão *ex vivo* de Bcl-2 reduzida, o que promoveu aumento da susceptibilidade à morte espontânea destas células por apoptose. O

estudo demonstrou ainda que houve relação direta entre Bcl-2 e Fas, sendo o aumento da propensão à apoptose das células possivelmente acompanhado pela ligação ao receptor Fas (PATEL et al., 2000; LELIEVRE et al., 2005).

Katsikis et. al. (1995), por sua vez, demonstraram que linfócitos CD4 e CD8 apresentam expressão elevada de moléculas Fas durante a infecção pelo HIV, os quais são sensíveis à apoptose induzida por anticorpos monoclonais anti-Fas.

A morte celular por apoptose durante a infecção pelo HIV, resultante da ligação de Fas-L aos receptores Fas (PATEL et al., 2000; LELIEVRE et al., 2005), pode ocorrer tanto através da associação células T Fas sensíveis às células vizinhas que expressam Fas-L, quanto através da associação deste ligante à superfície da própria célula (BRUNNER et al., 1995; DHEIN et al., 1995). Conseqüentemente, moléculas Fas-L são co-expressadas e a apoptose em células T CD4 pode ser induzida de forma autócrina e/ou parácrina (VIGNAUX et al., 1995; BADLEY et al., 1997).

A interação de células T CD4 Fas sensíveis às células acessórias infectadas ou não pelo HIV, como os macrófagos, e que expressam Fas-L associado à membrana ou solúvel, ocorre tanto pelo contexto da apresentação de antígenos como ao acaso, promovendo a elevação da expressão de Fas-L e a conseqüente indução da apoptose das células T CD4 (BADLEY et al., 1997).

Entre os diversos mecanismos podem estar envolvidos na apoptose como conseqüência da infecção pelo HIV, destacam-se: (1) proteínas virais, como gp 120 e Tat, aceleram o processo de morte celular por apoptose mediada por Fas tanto em linfócitos infectados (BADLEY et al., 2000; LUM et al., 2003), quanto nos não infectados (WESTENDORP et al., 1995; BADLEY et al., 2000; AHR et al., 2004), (2) a rápida reposição de células T CD4 em pacientes infectados pelo HIV (GOUGEON et al., 1996) como conseqüência processo ativo de regeneração de linfócitos, pode contribuir substancialmente nos níveis de apoptose desses pacientes, (3) a produção prejudicada de interleucinas, como IL-2 e IL-12, pode contribuir para o excesso deste processo de morte celular, posto que estas citocinas podem bloquear a apoptose em linfócitos CD4 e CD8 (GOUGEON et al., 1993; CLERICI et al., 1994; LEWIS et al., 1994).

O recente reconhecimento da contribuição da apoptose na depleção das células T CD4 durante a infecção pelo HIV, estimula a verificação da viabilidade dos

ensaios amplamente empregados na quantificação deste processo de morte nas células mononucleares (SAIKUMAR et al., 1999).

Empregando a análise por citometria de fluxo, o presente trabalho comparou as performances dos conjuntos de marcadores anexina V-FITC/iodeto de propídio e calceína AM/homodímero de etídio na avaliação da viabilidade, apoptose e inviabilidade de células mononucleares, mantidas em meio RPMI 1640 por 24 e 48 horas, a partir de amostras de sangue periférico de voluntários infectados pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV).

A análise dos processos de morte celular por citometria de fluxo tornou possível a determinação reprodutível das populações celulares viáveis, em apoptose e inviáveis. Desse modo, as células mononucleares correspondentes aos linfócitos foram diferenciadas e adquiridas de acordo com seu tamanho (forward scatter – FSC) e granulosidade (side scatter – SSC), através dos programas CELLQuest e PAINT-A-GATE.

Como esperado, os percentuais médios de apoptose para os tempos de 24 e 48 horas foram significativamente superiores quando as células foram marcadas por calceína-AM e homodímero de etídio. Por outro lado, os percentuais médios de células consideradas inviáveis foram significativamente superiores durante a marcação pela anexina V-FITC/iodeto de propídio, para ambos os períodos de incubação. Durante a avaliação da viabilidade celular, no entanto, os marcadores calceína-AM/homodímero de etídio e anexina V-FITC/iodeto de propídio apresentaram percentuais celulares médios estatisticamente semelhantes após 24 e 48 horas de incubação.

O marcador vital anexina V-FITC tem sido amplamente empregado na avaliação e quantificação das células em apoptose por citometria de fluxo devido a sua ligação específica aos resíduos de fosfatidilserina (BLANKENBERG et al., 1998; LASSUS & HIBNER, 1998; CLARKE et al., 2000; LEE et al., 2004). Assim, células viáveis são classificadas como anexina negativas, enquanto as apoptóticas, como anexina positivas (KOOPMAN et al., 1994).

Para avaliar as populações de células inviáveis, o corante fluorescente iodeto de propídio foi empregado concomitantemente ao marcador anexina V-FITC. Como a membrana plasmática das células inviáveis apresenta-se comprometida, marcadores de elevado peso molecular, como iodeto de propídio, tornam-se

passíveis de penetrar nestas células e de se incorporar aos fragmentos de DNA celular (WILLINGHAM, 1999).

Como pode ser observado pelos níveis de apoptose demonstrados pela anexina V-FITC ($42,31\% \pm 3,24$ após 24 horas de incubação; $33,83\% \pm 2,65$ após 48 horas de incubação), as células mononucleares, assim como outras linhagens de células previamente determinadas por este marcador (KOOPMAN et al., 1994; VanENGELAND et al., 1997), igualmente exibem os resíduos de fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática.

Os resultados, no entanto, demonstraram que a metodologia que emprega calceína-AM e homodímero de etídio mostrou-se mais sensível na avaliação e quantificação de linfócitos em apoptose, durante a infecção pelo HIV, em relação aos marcadores anexina V-FITC e iodeto de propídio.

Estudos anteriores determinaram que células de uma mesma linhagem celular podem sofrer o processo de morte celular por apoptose sem demonstrarem concomitantemente, a translocação da fosfatidilserina (FREY, 1997; GATTI et al., 1998). Não parece provável que a perda da assimetria fosfolipídica, que ocorre nos estágios iniciais da apoptose, possa ser restaurada ao longo do processo devido à depleção dos recursos energéticos nos estágios finais (BEVERS et al., 1996). Assim, é possível que entre as células mononucleares apoptóticas estudadas, algumas delas não tenham apresentado a translocação de fosfatidilserina e conseqüentemente, não tenham sido marcadas pela anexina V-FITC.

A reduzida sensibilidade deste marcador frente à calceína AM pode ainda, estar relacionada ao fato de que a translocação da fosfatidilserina, que forma a base da detecção da apoptose nas células mononucleares pela anexina V-FITC, pode ocorrer também durante a necrose (VERMES et al., 1995; BLANKENBERG et al., 1998; LASSUS & HIBNER, 1998). Por outro lado, a perda de integridade da membrana plasmática, que caracteriza a inviabilidade celular, permite o acesso do marcador à face interna da membrana, resultando em marcação falsamente positiva pela anexina V-FITC (SAIKUMAR et al., 1999).

Além disso, Lecoeur & Gouegon (1996) demonstraram que os percentuais médios de apoptose em linfócitos de pacientes infectados pelo vírus HIV quantificados por iodeto de propídio através da citometria de fluxo, foram subestimados devido à interferência de granulócitos com este marcador. Esta interferência deve-se ao enriquecimento de granulócitos associado à infecção pelo

HIV, observado na composição das células obtidas após o isolamento com Ficoll-Paque.

De fato, a interferência positiva ou negativa de granulócitos sobre a quantificação da apoptose em linfócitos a partir do iodeto de propídio depende da propensão destas células à apoptose espontânea após curto período de incubação (STERN et al, 1992, LECOEUR & GOUGEON, 1996). Durante a infecção pelo HIV, tanto eosinófilos quanto neutrófilos podem estar envolvidos no processo apoptótico, promovendo assim, a redução dos percentuais médios dos linfócitos que se encontram em apoptose (LECOEUR & GOUGEON, 1996).

Portanto, a utilização dos marcadores anexina V-FITC e iodeto de propídio apresentam limitações e podem fornecer informações parciais quanto à determinação e quantificação das células em apoptose, que devem ser consideradas quando da escolha de metodologias sensíveis na avaliação deste processo de morte celular.

O acetóxi-metil-éster de calceína é um composto não fluorescente e permeável à membrana plasmática, o qual é convertido à sua forma aniônica, impermeável e fluorescente através de esterases intracelulares, ativas somente em células íntegras (GATTI et al., 2004). Desse modo, a calceína permite determinar as células viáveis e em apoptose à medida que avalia o metabolismo celular, posto que as esterases citosólicas responsáveis por sua conversão à calceína, congregam os principais componentes do metabolismo energético mitocondrial (KATO et al. 2002).

Em estudo prévio realizado em diferentes células aderentes, como PC 12 e NIH3T3, demonstrou-se que as metodologias que utilizam como marcadores de integridade celular o acetóxi-metil-éster calceína (calceína-AM) e homodímero de etídio (EthD-1), apresentaram-se mais sensíveis na detecção precoce da apoptose em relação aos marcadores anexina V-FITC/iodeto de propídio (GATTI et al, 1998).

De fato, o presente estudo demonstrou que o marcador calceína AM/homodímero de etídio foi igualmente útil e mais sensível na quantificação da apoptose em células mononucleares, como os linfócitos, quando comparado ao marcador anexina V-FITC/iodeto de propídio, além de permitir definir com clareza as populações de linfócitos viáveis, em apoptose e inviáveis.

Tais constatações devem-se ao fato de que as características inerentes à calceína AM, como a retenção de sua fluorescência associada à manutenção da atividade esterásica, fornecem evidências morfológicas da condensação da

cromatina e da segregação das células em vesículas (FLANAGAN PRODUKTE, 2003). Contudo, este marcador é liberado rapidamente do citoplasma celular à medida que a membrana plasmática torna-se comprometida, mesmo na presença de atividade esterásica residual (BUSSOLATI et al., 1995).

Assim, a calceína permite quantificar não apenas as células que se encontram nos estágios iniciais da apoptose, mas também os corpos apoptóticos, que igualmente mantêm a integridade da membrana plasmática e portanto, retêm a fluorescência citoplasmática da calceína, mesmo nos estágios tardios deste processo (BUSSOLATI et al., 1995), embora os mesmos sejam excluídos durante a seleção por citometria de fluxo, como consequência do seu tamanho reduzido.

Por outro lado, informações funcionais a respeito da competência da membrana plasmática e inviabilidade celular podem ser obtidas através do marcador homodímero de etídio, que se acumula nos fragmentos de DNA das células cuja membrana plasmática encontra-se comprometida, mas que não é passível de penetrar na membrana íntegra (CHEN et al., 2002; FLANAGAN PRODUKTE, 2003).

No presente estudo, os níveis de viabilidade, apoptose e inviabilidade de linfócitos obtidos pelos marcadores calceína AM/homodímero de etídio demonstraram correlações significativas entre os níveis dos mesmos grupos celulares obtidos pelos marcadores anexina V-FITC/iodeto de propídio, após 24 e 48 horas de incubação (Figuras 18-23). Esta constatação permite validar a hipótese de que ambos marcadores determinam a viabilidade, a apoptose e a inviabilidade de linfócitos T de modo semelhante, ainda que suas sensibilidades sejam estatisticamente distintas em relação à quantificação das células que se encontram em apoptose.

O crescente reconhecimento da morte celular por apoptose como importante característica da patogênese de doenças, incluindo a progressão da infecção pelo HIV, tem suscitado o interesse elucidativo nas pesquisas sobre apoptose.

Embora seja claro que tanto a exacerbação como a diminuição deste processo podem estar envolvidos na expressão dos sintomas de diversas patologias, muitos temas relacionados à morte celular por apoptose permanecem por ser esclarecidos. Assim, técnicas que permitam a detecção quantitativa acurada da apoptose necessitam de constantes avaliações e aperfeiçoamento.

Tendo em vista que a depleção acentuada das células T CD4 durante a infecção pelo HIV resulta do aumento da apoptose, o que por sua vez, contribui para

o aumento da susceptibilidade a infecções oportunistas, o emprego de metodologias sensíveis de avaliação desse processo, como a calceína AM-EthD-1, pode resultar em importante mecanismo de acompanhamento da doença.

6. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo permitem concluir que:

1. A utilização dos marcadores calceína AM e homodímero de etídio mostrou-se eficaz na detecção e quantificação da viabilidade e morte celular por apoptose em células mononucleares, como os linfócitos, quando comparada à anexina V-FITC/iodeto de propídio.
2. A metodologia que utiliza calceína AM/homodímero de etídio apresentou-se mais sensível na determinação e quantificação dos linfócitos em apoptose associados ao vírus HIV, quando comparada à metodologia que utiliza anexina V-FITC/iodeto de propídio.
3. As vantagens metodológicas inerentes aos marcadores calceína AM/homodímero de etídio, como a significativa sensibilidade na quantificação de linfócitos em apoptose e a clara definição das populações celulares viáveis, em apoptose e inviáveis, permite elegê-los como metodologia preferencial em relação aos marcadores anexina V-FITC/iodeto de propídio.
4. Estudos sobre a morte celular por apoptose através dos marcadores calceína AM/homodímero de etídio devem ser realizados futuramente para que seja possível avaliar sua reprodutibilidade em populações saudáveis, bem como determinar sua utilidade como mecanismo de acompanhamento da infecção pelo HIV, a partir de correlações com os níveis de linfócitos CD4, CD8 e carga viral, antes e após o tratamento com terapia anti-retroviral.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, J.M., CORY, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, Washington, v.281, p.1322-1326, 1998.

AHR, B., et al. Apoptosis of uninfected cells induced by HIV envelope glycoproteins. *Retrovirology*, London, v.1, n.1, p.1-12, 2004.

AMEISEN, J.C., CAPRON, A. Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis. *Immunol. Today*, Cambridge, v.12, n.4 p.102-105, 1991.

ANTONSSON, B., et al. Inhibition of Bax channel forming activity by Bcl-2. *Science*, Washington, v.277, p.370-372, 1997.

ARSCOTT, P.L., BAKER, J.R.Jr. Apoptosis and thyroiditis. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, New York, v.87, n.3, p.207-217, 1998.

ASHKENAZI, A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat. Rev. Cancer*, London, v.2, p.420-430, 2002.

ATKINSON, E.A., et al. Cytotoxic T lymphocyte-assisted suicide. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v.273, p.21261-21266, 1998.

BACON, M.D. The spectrum of Wegener's Granulomatosis and disease relapse. *N.Engl.J. Med.*, Boston, v.352, n.27, p.330-332, 2005.

BADLEY, A.D., DOCKRELL, D., PAYA, C.V. Apoptosis in AIDS. *Adv. Pharmacol.*, New York, v. 41, p. 271-294, 1997.

— et al. Up regulation of Fas ligand expression by human immunodeficiency virus in human macrophages mediates apoptosis of uninfected T lymphocytes. *J. Virol.*, Baltimore, v.70, p.199-206, 1996.

— et al. Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis. *Blood*, New York, v.96, n.9, p.2951-2964, 2000.

BARRY, M., et al. Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Mol. Cell. Biol.*, Washington, v.20, n.11, p.3781-3794, 2000.

BEVERS, E.M., COMFURIUS, P., ZWAAL, R.F.A. Regulatory mechanisms in maintenance and modulation of transmembrane lipid asymmetry: pathophysiological implications. *Lupus*, Basingstoke, v.5, p.480-487, 1996.

BLANKENBERG, F.G., et al. *In vivo* detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, Washington, v.95, p.6349-6354, 1998.

BODMER, J.L., et al. TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat. Cell Biol.*, London, v.2, p.241-243, 2000.

BOUDET, F., LECOEUR, H., GOUGEON, M.L. Apoptosis associated with ex vivo down-regulation of Bcl-2 and up-regulation in potential cytotoxic CD8+T lymphocytes during HIV infection. *J. Immunol.*, Baltimore, v.156, n.6, p.2282-2293, 1996.

BOUILLET, P., et al. BH-3 only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of auto reactive thymocytes. *Nature*, London, v.415, p.922-925, 2002.

BOSSY-WETZEL, E., GREEN, D., R. Caspases induce cytochrome c release from mitochondria by activating cytosolic factors. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 274, p. 17484-17490, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de DST/AIDS. Portaria 59. Rio de Janeiro: Ministério da saúde, 2003. 22.ed.

BROWN, D.G., SUN, X.M., COHEN, G.M. Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation. *J. Biochem. Chem.*, Baltimore, v.268, p.3037-3039, 1993.

BRUNNER, T., et al. Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature*, London, v.373, p.441-444, 1995.

BUSSAB, W.O., MORETIN, P.A. **Medidas Resumo**. In: BUSSAB, W.O. MORETIN, P.A. **Estatística Básica**. 5.ed. São Paulo: Saraiva, 2002. p.35-68.

BUDD, R.C. Activation-induced cell death. *Curr. Opin. Immunol.*, London, v.13, p.356-362, 2001.

BUDIARDJO, I., et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, Palo Alto, v.15, p.269-290, 1999.

BUSSOLATI, O., et al. Characterization of apoptotic phenomena induced by treatment with L-Asparaginase in NIH3T3 cells. *Exp. Cell. Res.*, New York, v. 220, p. 283-291, 1995.

CARMICHAEL, A., et al. Quantitative analysis of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) response at different stages of HIV-1 infection: differential CTL responses to HIV-1 and Epstein-Barr virus in late disease. *J. Exp. Med.*, New York, v.177, p.249-256, 1993.

CHARRIAUT-MARLANGUE, C., BEN-ARI, Y. A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport*. London, v.7, p.61-64, 1995.

CHAVES, M.M., KALLAS, E.G. Cell cycle distribution of CD4+ lymphocytes in HIV-1-infected subjects. *Cytometry*, New York, v.62B, n1, p.46-51, 2004.

CHEN, C.C., et al. Human corneal epithelial cell viability and morphology after dilute alcohol exposure. *Invest. Ophth. Vis. Sci.*, St Louis, v.43, p.2593-2602, 2002.

CLARKE, R.G., et al. Apoptosis can be detected in attached colonic adenocarcinoma HT29 cells using annexin V binding, but not by TUNEL assay or sub-G0 DNA content. *Cytometry*, New York, v.39, n.2, p.141-150, 2000.

CLERICI, M., et al. Type 1/type2 cytokine modulation of T-cell programmed cell death as a model for human immunodeficiency virus pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, Washington, v.91, n.25, p.11811-11815, 1994.

COHEN, G. M. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.*, London, v.326, p.1-16, 1997.

COHEN, G. M., et al. Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Biochem, J.*, London, v.286, p.331-334, 1992.

COTRAN, S.R., HUMAR, V., COLLINS, T. **Pathologic Basis of Disease.** 6.ed. Philadelphia. W.B. Saunders Company, 1999.

COTTON, M.F., et al. Apoptosis of CD4+ and CD8+ T cells isolated immediately ex vivo correlates with disease severity in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Pediatr. Res.*, Baltimore, v.42, n.5, p.656-664, 1997.

DARNAY, B. G., AGGARWAL, B. B. Early events in TNF signaling: a story of associations and dissociations. *J. Leukoc. Biol.*, New York, v. 61, p. 559-566, 1997.

DEVERAUX, Q.L., TAKAHAASHI, R., SALVESEN, G.S., REED, J.C. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*, London, v.388, p.300-304, 1997.

DHEIN, J., et al. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1(Fas/CD95). *Nature*, London, v.373, p.438-441, 1995

DONG, Z., et al. Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. *Am. J. Pathol.*, Philadelphia, v.115, p.1205-1213, 1997.

DUCKETT, C.S., et al. A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J.*, Oxford, v.15, p.2685-2694, 1996.

DUKE, R.C., OJCIUS, D. M., YOUNG, D.E. Cell suicide in health and disease. *Sci. Am.*, New York, v.275, p.80-87, 1996.

EVAN, G.J., VOUSDEN, K.H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, London, v.411, p.342-348, 2001.

FADOK, V.A., et al. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.*, Baltimore, v.148, p.2207-2216, 1992.

FAUCI, A.S. Host factors in the pathogenesis of HIV disease. *Antibiot. Chemother.*, Basel, v.48, p.4-12, 1996.

FALCIERI, E., et al. The protein kinase inhibitor staurosporine induces morphological changes typical of apoptosis in MOLT-4 cells without concomitant DNA fragmentation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, New York, v.193, p.19-25, 1993.

FERNANDES-ALNEMRI, T., et al. In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FAD-like domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 93, p. 7464-7469, 1996.

FEHSEL, K., KOLB-BACHOFEN, V., KOLB, H. Analysis of TNF- α -induced DNA strand breaks at the single cell level. *Am. J. Pathol.*, Philadelphia, v.139, p.251-254, p.1991.

Flanagan Produkte. **Toxizitätsstudien zu MegaHydrin.** Disponível em http://www.flanaganprodukte.de/MegaHydrin/MegaHydrin_Studie/megahydrin_studie.html. Acesso em: junho de 2003.

FRENCH, L.E., et al. Fas and Fas ligand in embryos and adult mice: ligand expression in several immune-privileged tissues characterized by apoptotic cell turnover. *J. Cell. Biol.*, New York, v.133, p.335-343, 1996.

FREY, T. Correlated flow cytometric analysis of terminal events in apoptosis reveals the absence of some changes in some model systems. *Cytometry*, New York, v.28, p.253-263, 1997.

FUJITA, E., et al. Wortmannin enhances activation of CPP32 (caspase-3) induced by TNF or anti-Fas. *Cell Death Differer.* London, v. 5, p. 289-297, 1998.

GATTI, R., et al. Comparison of annexin V and calceina-AM as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocal laser microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, Baltimore, v.46, p.895-900, 1998.

GEHRI, R., et al. The Fas receptor in HIV infection: expression on peripheral blood lymphocytes and role in the depletion of T cells. *AIDS*, London, v.10, p.9-16, 1996.

GERMAIN, R.N. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat. Rev. Immunol.*, London, v.2, p.309-322, 2002.

GOLD, R., et al. Detection of DNA fragmentation in apoptosis: Application of in situ nick translation to cell culture systems and tissue sections. *J.Histochem. Cytochem.*, Baltimore, v.41, p.1023-1030, 1993.

GORCZYCA, W., GONG, J., DARZYNKIEWICZ, Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res.*, Chicago, v.53, p.1945-1951, 1993.

GOUGEON, M.L., et al. Programmed cell death in AIDS-related HIV and SIV infections. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, New York, v.9, p.553-563, 1993.

— et al. Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons: increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression. *J. Immunol.*, Baltimore, v.156, p.3509-3520, 1996.

— et al. Demonstration of an engagement process towards cell death by apoptosis in lymphocytes of HIV infected patients. *C.R. Acad. Sci. III*, Paris, v. 312, p529-537, 1991.

HAN, X., et al. Synergistic stimulatory effects of tumor necrosis factor α and interferon γ on replication of human immunodeficiency virus type 1 and apoptosis of HIV-1 infected host cells. *Eur. J. Clin. Invest.*, Berlin, v.26, p.286-292, 1996.

HELLERSTEIN, M., et al. Directly measured kinetics of circulating T lymphocytes in normal and HIV-1-infected humans. *Nat. Med.*, New York, v. 5, p. 83-89, 1999.

HENRY, J.B. **Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais.** 19. ed. São Paulo: Manole, 1999, p.1552.

HOCKENBERRY, D.M. Bcl-2, a novel regulador of cell death. *BioEssays*, Cambridge, v.17, p.631-638, 1995.

HOMBURG, C. H., et al. Human neutrophils lose their surface FCgRIII and acquire annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood*, New York, v. 85, p. 532-540, 1995.

HOSAKA, N., et al. Membrane and soluble forms of Fas (CD95) and Fas ligand in peripheral blood mononuclear cells and in plasma from human immunodeficiency virus-infected persons. *Infect. Dis.*, Chicago, v.178, p.1030-1039, 1998.

HUANG, Z. The chemical biology of apoptosis: exploring protein-protein interactions and the life and death of cells with small molecules. *Chem. Biol.*, Massachusetts, v.9, p.1059-1072, 2002.

HSU, H., et al. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell*, Cambridge, v.64, p.299-308, 1996.

HSU, H., et al. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation. *Cell*, Cambridge, v.81, p.495-504, 1995.

IMAI, Y., et al. The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis. *Nature*, London, v.398, n.6730, p.777-785, 1999.

IRMLER, M., et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, London, v.388, p.190-195, 1997.

KANNAN, K., JAIN, S. K. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*, Ireland, v.7, n.7, p.153-163, 2000.

KATO, M., et al. Evaluation of mitochondrial function and membrane integrity by dual fluorescent staining for assessment of sperm status in rats. *J. Toxicol. Sci.*, Sapporo, v.27, n.1, p.11-18, 2002.

KATSIKIS, P.D., et al. Fas antigen stimulation induced marked apoptosis of T lymphocytes in human immunodeficiency-virus infected individuals. *J. Exp. Med.*, New York, v.181, p.2029-2036, 1995.

KELEKAR, A., THOMPSON, C.B. Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell. Biol.*, Cambridge, v.8, p.324-330, 1998.

KERR, J. F. R., WYLLIE, A.H., CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, London, v.26, p.239-257, 1972.

KIMURA, E., et al. A macrocyclic zinc(II) fluorophore as a detector of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, Washington, v.100, n.7, p.3731-3736, 2003.

KING, L.B., ASHWELL, J.D. thymocyte and T cell apoptosis: is all death created equal? *Thymus*, Amsterdam, v.23, p.209-230, 1994.

KOKAWA, K., SHIKONE, T., NAKANO, R. Apoptosis in the human uterine endometrium during the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, Philadelphia, v. 81, p.4144-4147, 1996.

KOOPMAN G., et al. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, New York, v.84, p.1415-1420, 1994.

KRAMMER, P.H. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, London, v.407, p.789-795, 2000.

KUMAN, S. The apoptotic cystein protease CPP32. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, Exeter, v. 29, p. 393-396, 1997.

KUWANA, T., et al. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*, Cambridge, v.111, p.331-342, 2002.

LASSUS, P., HIBNER. Detection and quantification of apoptosis in transiently transfected adherent cells. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v.26, n.22, p.5233-5234, 1998.

LAZEBNIK, Y. A., et al. Nuclear events of apoptosis in vitro in cell-free mitotic extracts: a model system for analysis of the active phase of apoptosis. *J. Cell. Biol.*, New York, v.123, p.7-22, 1993.

LECOEUR, H., GOUGEON, M.L. Comparative analysis of flow cytometric methods for apoptosis quantization in murine thymocytes and human peripheral lymphocytes from controls and HIV-infected persons. Evidence for interference by granulocytes and erythrocytes. *J. Immunol. Methods*, Amsterdam, v.198, p.87-99, 1996.

LEE, W.D., et al. Tilimicosin-induced bovine neutrophil apoptosis is cell-specific and downregulates spontaneous LIB4 synthesis without increasing Fas expression. *Vet. Res.*, Paris, v.35, n.2, p.213-224, 2004.

LELIEVRE, J.D., et al. Interleukin 7 increases Human Immunodeficiency Virus type-1 LAI-mediated Fas-induced T-cell death. *J. Virol.*, Baltimore, v.79, n.5, p.3195-3199, 2005.

LEONARDO, M., et al. Mature T lymphocyte apoptosis – Immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu. Rev. Immunol.*, Palo Alto, v.17, p.221-253, 1999.

LEWIS, D.E., et al. Anergy and apoptosis in CD8+ T cells from HIV-infected persons. *J. Immunol.*, Baltimore, v.153, p.412-420, 1994.

Li, H., et al. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, Cambridge, v.94, n.4, p.491-501, 1998.

LILES, C.W. Apoptosis-role in infection and inflammation. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, London, v.10, p.165-170, 1997.

LISTON, P., et al. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature*, London, v.379, p.349-353, 1996.

LOO, D.T., RILLEMA, J.R. Measurement of cell death. *Methods. Cell Biol.*, New York, v.57, p.251-264, 1998.

LUM, J.J., et al. VprR77Q is associated with long-term nonprogressive HIV infection and impaired induction of apoptosis. *J. Clin. Invest.*, Berlin, v.111, p.1547-1554, 2003.

LUO, X., et al. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, Cambridge, v.94, n.4, p.481-490, 1998.

MAGNUSSON, C., VAUX, D.L. Signalling by CD95 and TNF receptors: not only life and death. *Immunol. Cell. Biol.*, Adelaide, v.77, n.1, p.41-46, 1999.

MARTIN, S.J., et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by over expression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.*, New York, v.182, n.5, p.1545-1556, 1995.

McCARTHY N.J., EVAN, G.I. Methods for Detecting and quantifying apoptosis. *Curr. Top. Dev. Biol.*, New York, v.36, p.259-279, 1998.

McGEEHAN, G. M., et al. Regulation of tumor necrosis factor: a processing by a metalloproteinase inhibitor. *Nature*, London, v. 370, p. 558-561, 1994.

McCLOSKEY, T.W., et al. CD95 expression and apoptosis during pediatric HIV infection: early up regulation of CD95 expression. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, New York, v.87, p.33-41, 1998.

MEMON, S. A., HOU, M.B., ZAZHARCHUK, C.M. Apoptosis induced by a chimeric Fas/FLICE receptor: lack of requirement for Fas- or FADD-binding proteins. *J. Immunol.*, Baltimore, v. 160, p. 2046-2049, 1998.

MEIER, P., FINCH, A., EVAN, G. Apoptosis in development. *Nature*, London, v.407, p.796-801, 2000.

MEYAARD, L., et al. Programmed death of T cells in human immunodeficiency virus infection. No correlation with progression to disease. *J. Clin. Invest.*, Berlin, V.93, P.982-988, 1994.

MEYAARD, L., SCHUITEMAKER, H., MIEDEMA, F. T cell dysfunction in HIV infection: anergy due to defective antigen-presenting cell function? *Immunol. Today*, Cambridge, v.14, p.161-164, 1993.

MILLER, D. K. The role of the caspase family of cysteine proteases in apoptosis. *Immunology*, London, v. 95, p. 35-49, 1997.

MOHLER, K. M., et al. Protection against a lethal dose of endotoxin by inhibitor of tumor necrosis factor processing. *Nature*, London, v. 370, p. 218-220, 1994.

MOLECULAR PROBES INCORPORATION. Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit (L-3224). Eugene, 1999. 6p. Manual Técnico.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. 5ª Edição. New York. USA: John Wiley & Sons, 2001.

MOURDJEVA, M., et al. Dynamics of membrane translocation of phosphatidylserine during apoptosis detected by a monoclonal antibody. *Apoptosis*, New York, v.10, n1, p.209-217, 2005.

NAGATA, S. Fas-mediated apoptosis. *Adv. Exp. Med. Biol.*, New York, v. 406, p.119-124, 1996.

NAGATA, S. Fas ligand-induced apoptosis. *Annu. Rev. Genet.*, New York, v.33, p.29-55, 1999.

NAKAYAMA, S., et al. A case of multiple pulmonary infarctions associated with Sjogren's syndrome and antipsychotic agent administration. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi*, Tokyo Do Gakkai, v.42, n.11, p.975-980, 2004.

NERI, S., et al. Calcein-acetoxymethyl cytotoxicity assay: Standardization of a method allowing additional analyses on recovered effector cells and supernatants. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, Washington, v.8, n.6, p.1131-1135, 2001.

NEWTON, K., HARRIS, A.W., STRASSER, A. FADD/MORT1 regulates the pre-TCR checkpoint and can function as a tumour suppressor. *EMBO J.*, Oxford, v.19, p.931-941, 2000.

NICOLETTI, I., et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, Amsterdam, v.139, p.271-279, 1991.

OFFIT, P., A, CUNNINGHAM, S., L., DUDZIK, K., I. Memory and distribution of virus-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and CTL precursors after rotavirus infection. *J. Virol.*, Baltimore, v. 65, p 1318-1324, 1991.

OLIVIER R. Flow cytometry technique for assessing effects of N-acetylcysteine on apoptosis and cell viability of human immunodeficiency virus-infected lymphocytes. *Methods Enzimol.*, New York, v.251, p.270-278, 1995.

PANTALEO, G., et al. Studies in subjects with long-term non progressive human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v.332, n.4, p.209-216, 1995.

PATEL, C.A., MUKHTAR, M., POMERANTZ, R.J. Human Immunodeficiency Virus type 1 Vpr induces apoptosis in human neuronal cells. *J. Virol.*, Baltimore, v.74, n.20, p.9717-9726, 2000.

PATKI, H.A., LEDERMAN, M.M. Detection of apoptotic cells by selective precipitation of [³H] thymidine-labelled DNA. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, Washington, v.3, n.1, p1-4, 1996.

PETIT, P.X., et al. Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J. Cell. Biol.*, New York, v.130, p.157-167, 1995.

RATHMELL, J.C., et al. Deficiency in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis. *Nat. Immunol.*, New York, v.3, p.932-939, 2002.

RATHMELL, J.C., THOMPSON, C.B. Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell*, Cambridge, v.109, S97-S107, 2002.

REED, J.C. Bcl-2 family proteins. *Oncogene*, Basingstoke, v.17, p.3225-3236, 1998.

ROSEN, A., CASCIOLA-ROSEN, L. Macromolecular substrates for the ICE-like protease during apoptosis. *J. Cell. Biochem*, New York v. 64, p. 50-54, 1997.

ROSHAL, M., ZHU, Y., PLANELLES, V. Apoptosis in AIDS. *Apoptosis*, London, v.6, p.103-116, 2001.

SAIKUMAR, P., et al. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am. J. Med.*, New York, v.107, n.5, p.489-506, 1999.

SALEH A., et al. Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for caspase-9-activation. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 274, p 17941-17945, 1999.

SALGAME, P., et al. An ELISA for detection of apoptosis. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v.25, n.3, p.680-681, 1997.

SALMENA, L., et al. Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. *Genes. Dev.*, Cold Spring Harbor, v.17, p.883-895, 2003.

SALVESEN, G.S. Caspase 8: Igniting the death machine. *Structure. Fold. Des.*, London, v.7, p.R225-R229, 1999.

SCAFFIDI, C., et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.*, Oxford, v. 17, p. 1675-1687, 1998.

SCHIMID, I., et al. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry*, New York, v.13, p.204-208, 1992.

SCHIMID, I., et al. A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunofluorescence by single laser flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, Amsterdam, v.170, n2, p. 145-157, 1994.

SCHWARTZMAN, R. A., CIDLOWSKI., L.A. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr. Rev.*, Baltimore, v.14, p.133-151, 1993.

SENDO, F., et al. Regulation of neutrophil apoptosis - its biological significance in inflammation and the immune response. *Human Cell*, Tokyo Hito Saibo Kenkyukai, v. 9, p.215-222, 1996.

SLOAND, E.M., et al. Role of Fas ligand and receptor in the mechanism of T-cell depletion in acquired immunodeficiency syndrome: effect on CD4+ lymphocyte depletion and human immunodeficiency virus replication. *Blood*, New York, v.89, p.1357-1363,1997.

SOENGAS, M.S., et al. Apaf-1 and caspase-9 in p53 dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science*, Washington, v. 284, p 156-159, 1999.

STASSI, G., et al. Fas/Fas ligand-driven T cell apoptosis as a consequence of ineffective thyroid immunoprivilege in Hashimoto's thyroiditis. *J. Immunol.*, Baltimore, v.162, p.263-267, 1999.

STERN, M., et al. Apoptosis in human eosinophils. Programmed cell death in the eosinophil leads to phagocytosis by macrophages and is modulated by IL-5. *J. Immunol.*, Baltimore, v.148, p.3543-3549, 1992.

STRANGE, R., et al. Programmed cell death during mammary gland involution. *Methods. Cell Biol.*, New York, v.46, p.355-368, 1995.

STROH, C., SCHULZE-OSTHOFF, K. Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspases substrates, *Cell. Death Differ.*, London, v. 5, p. 997-1000, 1998.

TANAKA, M., et al. Fas ligand in human serum. *Nat. Med.*, New York, v. 2, p. 317-322, 1996.

TELFORD, W.G., KING, L.E., FRAKER, P.J. Comparative evaluation of several DNA dyes in the detection of apoptosis-associated chromatin degradation by flow cytometry. *Cytometry*, New York, v.13, p.137-143, 1992.

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

TONETTI, M.S., CORTELLINI, D., LANG, N.P. In situ detection of apoptosis at sites of chronic bacterially induced inflammation in human gingival. *Infect Immun.*, Bethesda, v.66, n.11, p.5190-5195, 1998.

TREITINGER, A. **Os Efeitos da Suplementação de N-acetilcisteína em pacientes soropositivos para o HIV.** 2002. 178f. Tese (Doutorado em Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

TSCHOPP, J., et al. The fight of viruses against apoptosis. *Curr. Opin. Genet Dev.*, London, V.9, P.82-87, 1998.

TSOKOS, G.C., LIOSSIS, S.N. Immune cell signaling defects in lupus: activation, anergy and death. *Immunol. Today*, Cambridge, v.20, p.119-124, 1999.

VanENGELAND, M., et al. Plasma membrane alterations and cytoskeletal changes in apoptosis. *Exp. Cell. Res.*, New York, v. 235, p. 421-430, 1997.

VanENGELAND, M., et al. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, New York, v.31, p.1-9, 1998.

VASATKO, T., et al. A. Spontaneous necrosis of parathyroid adenoma. *Vnitr Lek.*, Praha, v.50, n.10, p.781-785, 2004.

VAUX, D., L., STRASSER, A.,. The molecular biology of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v 93, p.2239-2244, 1996.

VERMES, I., et al. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *J. Immunol. Methods*, Amsterdam, v. 184, p. 39-51, 1995.

VIGNAUX, F., et al. TCR/CD3 coupling to Fas-based cytotoxicity. *J. Exp. Med.*, New York, v.181, p.781-786, 1995.

YANG, E., KORSMEYER, S.J. Molecular thanatopsis: a discourse on the Bcl-2 family and cell death. *Blood*, New York, v.88, p.386-401, 1996.

ZAJAC, A, J., et al. Fas dependent CD4+ cytotoxic T-cell-mediated pathogenesis during virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 93, p. 14730-14735, 1996.

ZHANG, J., et al. Fas- mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/MORT 1. *Nature*, London, v. 392, p. 296-300, 1998.

WATERHOUSE, N.J., SEDELIS, K.A., CLARKE, C.J.P. Granzyme B: the chalk-mark of a cytotoxic lymphocyte. *J. Transl. Med.*, London, v.2, n.36, p.1-3, 2004.

WEIL, M., RAFF, M.C., BRAGA, V.M. Caspase activation in the terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Curr. Biol.*, London, v.9, p.361-367, 1999.

WESTENDORP, M.O., et al. Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature*, London, v.375, n.6531, p.497-500, 1995.

WILEY, S. R., et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, Massachusetts, v.3, p.673-682, 1995.

WILLINGHAM, M.C. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *J. Histochem. Cytochem.*, Baltimore, v.47, n.9, p.1101-1109, 1999.

WYLLIE, A. H. Apoptosis: an overview. *Br. Med. Bull*, London, v.53, p.451-465, 1997.

ANEXO 1

**COMPROVANTES DA APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA NO COMITÊ
DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS**

APÊNDICE 1

**TABELAS COM DADOS E ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS PARA OS
MARCADORES ESTUDADOS, APÓS 24 E 48 HORAS DE INCUBAÇÃO**

TABELA 5. Dados e estatísticas descritivas para os pacientes com tempo de incubação de 24hs

Amostra	Células Inviáveis (%)		Células Apoptose (%)		Células Viáveis (%)	
	Anexina	Calceína	Anexina	Calceína	Anexina	Calceína
S1	20,79	15,63	37,85	51,60	39,15	31,79
S2	25,84	14,69	42,76	46,19	29,12	38,70
S3	12,71	7,81	34,64	37,08	51,14	54,10
S4	24,70	33,19	53,49	54,97	18,80	11,19
S5	34,78	25,87	47,08	55,88	18,14	18,25
S6	18,83	19,57	19,77	31,22	61,40	49,21
S7	26,35	20,02	56,00	61,98	15,58	17,34
S8	19,30	14,71	61,47	59,00	19,23	26,29
S9	5,89	5,24	48,21	58,01	45,90	36,75
S10	17,34	13,40	68,83	72,63	13,83	13,97
S11	16,10	10,60	49,70	50,64	34,27	38,76
S12	21,51	22,33	57,32	70,80	20,44	6,55
S13	14,76	8,86	55,26	58,86	29,98	32,28
S14	10,65	7,63	65,02	70,87	24,33	21,50
S15	17,22	8,51	73,22	83,61	9,56	7,88
S16	9,94	4,89	28,49	30,27	61,57	64,84
S17	10,62	14,31	35,75	41,67	53,63	44,02
S18	5,94	2,49	15,88	14,92	78,18	82,59
S19	14,01	7,65	33,56	32,65	52,43	59,70
S20	19,31	12,08	39,22	41,74	41,47	46,18
S21	17,16	11,85	32,82	38,14	50,02	50,01
S22	13,93	10,21	34,12	37,28	51,95	52,51
S23	12,24	7,29	21,36	19,07	66,40	73,64
S24	18,15	19,13	22,78	28,48	59,07	52,39
S25	9,76	7,50	23,09	26,12	67,15	66,38
Mínimo	5,89	2,49	15,88	14,92	9,56	6,55
Máximo	34,78	33,19	73,22	83,61	78,18	82,59
Mediana	17,16	11,85	39,22	46,19	41,47	38,76
Média	16,71	13,02	42,31	46,95	40,51	39,87
Erro Padrão	1,34	1,44	3,24	3,56	3,95	4,22

TABELA 6. Dados e estatísticas descritivas para os pacientes com tempo de incubação de 48hs

Amostra	Células Inviáveis (%)		Células Apoptose (%)		Células Viáveis (%)	
	Anexina	Calceína	Anexina	Calceína	Anexina	Calceína
P1	33,46	21,67	39,99	41,05	26,55	37,28
P2	21,16	16,19	17,29	19,74	61,53	63,93
P3	14,54	12,65	8,06	16,29	76,77	70,80
P4	20,81	11,22	21,34	19,57	56,55	69,19
P5	34,35	26,43	25,43	32,28	40,22	41,29
P6	36,44	22,32	30,11	43,49	32,53	33,88
P7	34,76	31,00	32,39	40,77	32,85	28,23
P8	36,46	31,69	34,07	35,74	29,47	32,57
P9	41,54	26,82	29,91	38,87	27,20	33,59
P10	40,21	44,83	47,70	48,40	12,09	6,77
P11	29,45	24,50	44,57	40,04	25,98	35,46
P12	33,42	33,75	47,01	47,48	15,62	17,40
P13	31,33	28,18	44,21	43,92	24,46	27,90
P14	25,50	21,33	44,39	40,34	30,01	38,33
P15	28,57	27,71	67,73	64,79	3,70	7,50
P16	38,11	34,20	49,19	58,90	12,70	6,90
P17	16,53	14,24	26,55	33,98	56,92	51,78
P18	17,98	15,45	26,68	36,44	55,34	48,11
P19	19,84	12,08	32,21	38,19	47,95	49,73
P20	19,62	21,18	49,50	56,30	30,88	22,52
P21	19,89	18,08	29,62	37,97	50,49	43,95
P22	14,91	7,22	15,69	26,28	69,40	66,50
P23	8,26	5,17	23,11	18,15	68,63	76,68
P24	9,35	7,22	25,60	26,38	65,05	66,40
P25	13,51	9,69	33,35	36,51	53,14	53,80
Mínimo	8,26	5,17	8,06	16,29	3,70	6,77
Máximo	41,54	44,83	67,73	64,79	76,77	76,68
Mediana	25,50	21,33	32,21	38,19	32,85	38,33
Média	25,60	20,99	33,83	37,67	40,24	41,22
Erro Padrão	2,01	2,00	2,65	2,47	4,06	4,10

APÊNDICE 2

TABELAS COM OS RESULTADOS ESTATÍSTICOS DOS MARCADORES ESTUDADOS

TABELA 7. Estatísticas descritivas para o percentual de células viáveis – 24hs

Marcador	n	Média	Erro Padrão	Diferença	t	Valor p
Calceína AM/EthD-1	25	39,87	4,22	0,64	0,49	0,6284
Anexina V-FITC/PI	25	40,51	3,95			

Teste t para dados pareados, com α de 5%:

Não existe diferença entre os marcadores estudados: $p=0,6284$

n= Número de amostras estudadas.

TABELA 8. Estatísticas descritivas para o percentual de células em apoptose – 24hs

Marcador	n	Média	Erro Padrão	Diferença	t	Valor p
Calceína AM/EthD-1	25	46,95	3,56	-4,64	-5,08	<0,0001
Anexina V-FITC/PI	25	42,31	3,24			

Teste t para dados pareados, com α de 5%:

Existe diferença entre os marcadores estudados: $p<0,0001$

n= Número de amostras estudadas.

TABELA 9. Estatísticas descritivas para o percentual de células inviáveis – 24hs

Marcador	n	Média	Erro Padrão	Diferença	t	Valor p
Calceína AM/EthD-1	25	13,02	1,44	3,69	4,37	0,0002
Anexina V-FITC/PI	25	16,71	1,34			

Teste t para dados pareados, com α de 5%:

Existe diferença entre os marcadores estudados: $p=0,0002$

n= Número de amostras estudadas.

TABELA 10. Estatísticas descritivas para o percentual de células viáveis – 48hs

Marcador	n	Média	Erro Padrão	Diferença	t	Valor p
Calceína AM/EthD-1	25	41,22	4,10	-0,98	-0,80	0,4290
Anexina V-FITC/PI	25	40,24	4,06			

Teste t para dados pareados, com α de 5%:

Não existe diferença entre os marcadores estudados: $p=0,4290$

n = Número de amostras estudadas.

TABELA 11. Estatísticas descritivas para o percentual de células em apoptose – 48hs

Marcador	n	Média	Erro Padrão	Diferença	t	Valor p
Calceína AM/EthD-1	25	37,67	2,47	-3,85	-3,62	0,0014
Anexina V-FITC/PI	25	33,83	2,65			

Teste t para dados pareados, com α de 5%:

Existe diferença entre os marcadores estudados: $p=0,0014$

n = Número de amostras estudadas.

TABELA 12. Estatísticas descritivas para o percentual de células inviáveis – 48hs

Marcador	n	Média	Erro Padrão	Diferença	t	Valor p
Calceína AM/EthD-1	25	20,99	2,00	4,61	5,05	<0,0001
Anexina V-FITC/PI	25	25,60	2,01			

Teste t para dados pareados, com α de 5%:

Existe diferença entre os marcadores estudados: $p<0,0001$

n = Número de amostras estudadas.