

Ana Carolina de Almeida

**Expressão de SIRP α e SHP-1 na
Anemia Hemolítica Autoimune**

Orientador: Antonio Condino Neto

Co-orientadora: Sara Teresinha Olalla Saad

Campinas, 2009

Ana Carolina de Almeida

**Expressão de SIRP α e SHP-1 na
Anemia Hemolítica Autoimune**

Tese apresentada ao Curso de
Doutorado em Farmacologia da
Universidade Estadual de
Campinas, como requisito parcial à
obtenção do título de Doutor em
Farmacologia

Orientador: Antonio Condino Neto

Co-orientadora: Sara Teresinha Olalla Saad

Campinas, 2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

AL64e Almeida, Ana Carolina de
Expressão de SIRP α e SHP-1 na anemia hemolítica autoimune /
Ana Carolina de Almeida. Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadores: Antonio Condino-Neto, Sara Teresinha Olalla Saad
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Anemia hemolítica auto-imune. 2. Fagocitose. 3. Monócitos.
4. Heme. I. Condino-Neto, Antonio. II. Saad, Sara Teresinha
Olalla. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. IV. Título.

**Título em inglês : “SIRP-alpha and SHP-1 expression in autoimmune
hemolytic anemia”**

Keywords: • Autoimmune hemolytic anemia
• Phagocytosis
• Monocytes
• Heme

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

**Prof. Dr. Antonio Condino-Neto
Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli
Profa. Dra. Helena Zerlotti Wolf Grotto
Profa. Dra. Maria Heloisa de Souza Lima Blotta**

Data da defesa: 22-04-2009

Banca examinadora de Tese de Doutorado

ANA CAROLINA DE ALMEIDA

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Antonio Condino Neto

Antônio Condino Neto

Membros:

Professor (a) Doutor (a) Lúcia Helena Faccioli

Lúcia Helena Faccioli

Professor (a) Doutor (a) Pérsio Roxo Júnior

Pérsio Roxo Júnior

Professor (a) Doutor (a) Maria Heloisa De Souza Lima Blotta

Maria Heloisa De Souza Lima Blotta

Professor (a) Doutor (a) Helena Zerlotti Wof Grotto

Helena Zerlotti Wof Grotto

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 22/04/2009

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha família: Pai, Mãe, Cuca, Mar, Dodó e Didi. Vocês me dão força e coragem para que eu siga em frente. E me dão amor para que o caminho seja colorido.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Antonio Condino Neto, pela oportunidade e pelo apoio. Foi o primeiro a me advertir que pesquisa vicia;

À Dra. Sara Terezinha Olalla Saad, minha co-orientadora, pela atenção e objetividade;

À Dra. Maria de Lourdes Barjas Castro, pela orientação, ajuda com os pacientes e por me apoiar nos momentos de tensão;

À Jussara Rehder, pelo apoio no trabalho de bancada, mas principalmente pela amizade;

Ao pessoal do laboratório: Juliana, Silvana, Patrícia, Carolina, Mateo, Walmir, Marília, Edgar, Marcos, Josias, Mayara, Bruna. Amigos para todas as horas;

A Soraya Massaro Barbosa, minha primeira aluna e um grande orgulho;

A Maria de Fátima Locatelli, pela orientação sobre tudo o que se relacionou aos pacientes;

A Roberto Zulli, pela ajuda com a análise estatística;

Ao pessoal da administração, Simone e Milton, pela prontidão em resolver toda a burocracia;

Aos amigos de fora, por me fazerem acreditar que tudo daria certo.

SUMÁRIO

	Pág.
Lista de abreviaturas e siglas	xix
Lista de figuras	xxix
Lista de quadros	xxxiii
Resumo	xxxv
Abstract	xxxix
1. Introdução	43
1.1. Monócitos e macrófagos.....	45
1.2. Receptores de Inibição.....	47
1.3. SIRP α	50
1.4. CD47.....	53
1.5. SHP-1.....	65
1.6. Anemia Hemolítica Autoimune.....	69
2. Justificativa e Objetivos	77
2.1. Justificativa.....	79
2.2. Objetivos.....	80
2.2.1. Objetivos Gerais.....	80
2.2.2. Objetivos Específicos.....	80
3. Material e Métodos	83
3.1. Seleção dos doadores sadios.....	85
3.2. Avaliação Imunohematológica dos pacientes com AHAI.....	85
3.2.1. Teste da Antiglobulina Direto (TAD).....	85

3.2.2. Eluato.....	86
3.2.3. Pesquisa de autoanticorpos.....	86
3.3 Seleção dos pacientes com Anemia Hemolítica Autoimune.....	87
3.4. Separação e cultura de células.....	88
3.5. Reação de Polimerização em Cadeia (PCR).....	89
3.6. Western Blotting.....	90
3.7. Ensaio de Eritrofagocitose.....	92
3.8. ELISA.....	92
3.9. Análise Estatística.....	93
4. Resultados.....	95
4.1. Expressão gênica e protéica de SIRP α e SHP-1 em monócitos normais.....	97
4.2. Ensaio de eritrofagocitose.....	102
4.3. Caracterização imunohematológica e índices hematimétricos dos pacientes com AHAI.....	103
4.4. Expressão gênica de SIRP α e SHP-1 em pacientes com AHAI..	107
4.5. Expressão gênica de SIRP α e SHP-1 em monócitos normais cultivados com prednisolona.....	110
4.6. Cinética de liberação de IL-10 versus cinética de expressão gênica de SIRP α e SHP-1 em monócitos normais e células U937.....	112
4.7. Expressão gênica de SIRP α e SHP-1 e expressão de proteína SIRP α em monócitos normais cultivados com hemina.....	116

5. Discussão	121
5.1. Glicocorticóide.....	124
5.2. Interferon- γ e Fator de Necrose Tumoral- α	126
5.3. Anemia Hemolítica Autoimune.....	129
5.4. Considerações finais.....	135
6. Conclusões	139
7. Referências Bibliográficas	143

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac		Anticorpo
ADCC		Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpos
AHAI		Anemia Hemolítica Autoimune
ATCC		<i>American Type Cell Culture</i>
autoAc		Auto-anticorpos
BIT		<i>Brain Ig-like molecule with tyrosine-based activation motifs</i>
cDNA		Ácido Desoxirribonucléico Complementar
CEACAM-1		<i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1</i>
cGMP		<i>Cyclic Guanosine Monophosphate</i>
CO ₂		Dióxido de Carbono
CSF		Fator de crescimento de colônia
C-terminal		Terminal carboxi
CTLA-4		<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
DC		Células dendríticas
EGFR		<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EPO		Eritropoietina
EPO-R		Receptor de eritropoietina
ERK		<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
EROs		Espécies reativas do oxigênio
FBS		<i>Fetal bovine serum</i>
Fc α R		Receptor Fc α
Fc ϵ R		Receptor Fc ϵ
Fc γ R		Receptor Fc γ
Fc γ RIIA		Receptor Fc γ IIA
Fc γ RIIB		Receptor Fc γ IIB
Fc γ RIIIA		Receptor Fc γ IIIA

FYB	 <i>FYN-binding protein</i>
GC	Glicocorticóide
GH	Hormônio de crescimento
GR	Receptor de glicocorticóide
GRB2	 <i>Growth-factor-receptor-bound protein 2</i>
GREs	 <i>Glucocorticoid response elements</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
Hb/Ht	Hemoglobina/hematócrito
HO-1	Heme oxigenase-1
hsp	 <i>Heat shock protein</i>
IAP	 <i>Integrin-associated protein</i>
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenase
IFN- γ	Interferon-gama
Ig	Imunoglobulina
IGF-1	 <i>Insulin-like growth factor- 1</i>
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IgSF	 <i>Imunoglobulin superfamily</i>
IL-1	Interleucina-1
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-12p70	Interleucina-12 subunidade p70
IL-12R	Receptor de interleucina-12
IL-15	Interleucina-15
IL-17	Interleucina-17
IL-18	Interleucina-18
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-2	Interleucina-2

IL-23	Interleucina-23
IL-2R	Receptor de interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
ILT	 <i>Ig-like transcript/leukocyte immunoglobulin receptor</i>
iNOS	 <i>Induced nitric oxide synthase</i>
ITAM	 <i>Tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	 <i>Tyrosine-based inhibition motif</i>
KIR	 <i>killer cell Ig-like receptor</i>
LAIR-1	 <i>Leukocyte-associated Ig-like receptors-1</i>
LIR	 <i>Ig-like transcript/leukocyte immunoglobulin receptor</i>
LMD	 <i>Lipid microdomain</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
mAc	Anticorpo monoclonal
MAFA	 <i>Mast cell function-associated antigen</i>
MAPquinase	 <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
mDC	Células dendríticas maduras
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
MIP-1 α	 <i>Macrophage inflammatory protein 1 alpha</i>
MRF	 <i>Macrophage fusion receptor</i>
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida-Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NF- κ B	Fator nuclear κ B
NK	 <i>Natural killer</i>
NKG-2A	 <i>Natural killer cell lectin</i>
NO	Óxido nítrico
NOD	 <i>Nonobese diabetic</i>
N-terminal	Terminal amino

O ₂	Oxigênio molecular
PCR	Reação de polimerização em cadeia
PECAM-1	 <i>Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PILR-A	 <i>Paired Ig-like type 2 receptor α</i>
PKC	Proteína kinase C
PLA2	Fosfolipase A2
PLC γ	Fosfolipase C gama
PLD	Fosfolipase D
PMSF	Fenilmetanosulfonilfluoreto
PTP	Proteína tirosina fosfatase
PTPN6	 <i>Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6</i>
RGD	Aminoácidos Arg-Gly-Asp
RNI	Intermediários reativos do nitrogênio
RPMI	 <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RT	Transcrição reversa
SDS	 <i>Sodium dodecyl sulphate</i>
SDS-PAGE	 <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SH3	 <i>Src homology 3 domain</i>
SHIP	 <i>SH2 domain-containing inositol phosphatase</i>
SHP-1	 <i>Src homology region 2-domain-containing phosphatase-1</i>
SHP-2	 <i>Src homology region 2-domain-containing phosphatase-2</i>
SHPS-1	 <i>SH2-domain-containing phosphatase substrate-1</i>
SIRP	Proteína reguladora de sinal
SP-A	Proteína surfactante-A
SP-D	Proteína surfactante-B
TAD	Teste de Antiglobulina Direto
TBS	 <i>Tris buffered saline</i>
TCR	 <i>T cell receptor</i>
TLR	 <i>Toll-like receptor</i>
TMB	Tetrametilbenzidina

TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
TSP	Trombospondina
TYK-2	Tirosina quinase-2
Tyr	Tirosina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Inibição da eritrofagocitose.....	54
Figura 2:	Estrutura do CD47 (ou IAP).....	60
Figura 3:	Sinais que determinam a eritrofagocitose.....	65
Figura 4:	Mecanismo de ação dos glicocorticóides.....	74
Figura 5:	Expressão gênica e protéica de SIRP α em monócitos normais cultivados com dexametasona ou IFN γ e TNF α	98
Figura 6:	Expressão gênica e protéica de SHP-1 em monócitos normais normais cultivados com dexametasona ou IFN γ e TNF α	100
Figura 7:	Ensaio de eritrofagocitose por monócitos normais normais cultivados com dexametasona ou IFN γ e TNF α	103
Figura 8:	Expressão gênica relativa de SIRP α em monócitos de doadores saudáveis e pacientes com AHA antes e após corticoterapia.....	108

Figura 9: Expressão gênica relativa de SHP-1 em monócitos de doadores sadios e pacientes com AHAi antes e depois de corticoterapia.....	109
Figura 10: Expressão gênica de SIRP α e SHP-1 em monócitos normais cultivados com prednisolona.....	111
Figura 11: Cinética de expressão gênica relativa de SIRP α e SHP-1, e de liberação de IL-10 por células mielomonocíticas U937.....	113
Figura 12: Expressão gênica e protéica de SIRP α em monócitos cultivados com hemina®.....	117
Figura 13: Expressão gênica de SHP-1 em monócitos cultivados com hemina®.....	119

LISTA DE QUADROS

	Pág.
Quadro 1: Receptores inibidores do sistema imune.....	50
Quadro 2: Caracterização imunohematológica dos pacientes com AHAI avaliados no estudo.....	105
Quadro 3: Índices hematimétricos dos pacientes com AHAi pré e pós- Gc estudados.....	106

RESUMO

SIRP α (Signal Regulatory Protein α) é um receptor que medeia funções inibidoras em fagócitos. Sua ativação e conseqüente fosforilação dos ITIMs ocorre pela ligação ao CD47 presente na membrana dos eritrócitos, e permite o recrutamento e a ativação de SHP-1, a qual desfosforila substratos específicos envolvidos na mediação de diversos efeitos fisiológicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o papel da dexametasona (dexa) e de IFN γ /TNF α sobre a expressão de SIRP α e SHP-1; a consequência desta regulação sobre a eritrofagocitose; e o nível de expressão gênica de SIRP α e SHP-1 em monócitos de pacientes com anemia hemolítica autoimune (AHAI) antes e depois de corticoterapia. Monócitos de doadores saudáveis e células mielomonocíticas U937 foram cultivados por 48 horas com dexa (1 μ M) ou IFN γ (100U/ml) e TNF α (1000U/ml), por 6 horas com Hemina® (30uM), ou por 72 horas com prednisolona (0,15 e 1mg/l). Monócitos foram isolados de pacientes com AHAi antes e depois da corticoterapia. A expressão gênica de SIRP α e SHP-1 foi determinada por PCR em Tempo Real, a expressão protéica de SIRP α e SHP-1 foi determinada por Western Blotting, e a capacidade de eritrofagocitose foi determinada por microscopia. IFN γ e TNF α , *in vitro*, promoveram o aumento da expressão gênica e protéica de SIRP α e a expressão gênica de SHP-1, em paralelo com a redução da capacidade de eritrofagocitose em monócitos normais. Em contrapartida, embora tenha aumentado a expressão gênica de SIRP α e SHP-1, dexa *in vitro* não alterou a expressão destas proteínas, assim como não alterou a capacidade de eritrofagocitose de monócitos normais. A expressão gênica de SIRP α e SHP-1 foi maior em monócitos de pacientes com AHAi em comparação a doadores saudáveis. Após corticoterapia, a expressão gênica de SIRP α e SHP-1 em monócitos de pacientes com AHAi se mostrou similar a doadores saudáveis. Pacientes com AHAi estudados antes da corticoterapia apresentaram baixos níveis de hemoglobina e após corticoterapia esse índice de mostrou normal. A expressão gênica de SIRP α foi aumentada pela cultura de monócitos com hemina, mas a expressão de proteína permaneceu a mesma.

Nossos resultados confirmam o papel fundamental da SIRP α na regulação da eritrofagocitose e sugere que a expressão de mRNA de SIRP α em monócitos de pacientes com AHAI antes de corticoterapia é aumentada pela liberação de heme, e que a redução da expressão gênica de SIRP α após corticoterapia se deve a um efeito indireto desta droga pela redução da eritrofagocitose e diminuição da disponibilidade de heme.

Palavras-chave: SIRP α , SHP-1, receptores de inibição, eritrofagocitose, anemia hemolítica autoimune, citocinas inflamatórias.

ABSTRACT

SIRP α (Signal Regulatory Protein α) is an inhibitory receptor in phagocytes. Its activation and consequent phosphorylation of ITIMs occurs by the binding to CD47 on erythrocyte membrane, what allows SHP-1 recruitment, which dephosphorylates specific substrates involved in the mediation of several physiologic effects. The aim of this work was to determine the role of dexamethasone and IFN γ /TNF α upon SIRP α and SHP-1 expression, and the consequence of this regulation over erythrophagocytosis; and to evaluate the regulation of SIRP α and SHP-1 in peripheral blood monocytes (PBM) of autoimmune hemolytic anemia (AIHA) patients before and after glucocorticoid (GC) therapy. PBM from healthy donors and U937 myelomonocytic cells were cultured for 48 hours with dexamethasone (1 μ M) or IFN γ (100U/ml) and TNF α (1000U/ml), for 6 hours with Hemin (30 μ M), or for 72 hours with prednisolone (0.15 and 1mg/l). PBM were isolated from AIHA patients under GC therapy or not. SIRP α and SHP-1 gene expression was determined by Real Time PCR, SIRP α and SHP-1 protein level was determined by Western Blotting, and erythrophagocytosis was determined by microscopy. IFN γ and TNF α increased SIRP α gene and protein expression and SHP-1 gene expression, in parallel with a decrease in erythrophagocytosis ability in PBM. On the other hand, although SIRP α and SHP-1 gene expression was significantly increased, dexamethasone did not alter SIRP α and SHP-1 protein expression, and did not alter erythrophagocytosis ability in monocytes. SIRP α and SHP-1 expression was significantly higher in PBM from AIHA patients compared to normal. After GC therapy, SIRP α and SHP-1 expression was similar in PBM of AIHA patients compared to healthy donors. AIHA patients studied before glucocorticoid therapy showed low hemoglobin and after glucocorticoid therapy the level of hemoglobin was normal. SIRP α gene expression was increased by culture with hemin, but protein expression remained the same. Our results confirm the key role of SIRP α in erythrophagocytosis regulation and suggest that SIRP α mRNA expression in AIHA patients before glucocorticoid

therapy is increased by heme release, and the decrease of SIRP α gene expression after glucocorticoid therapy is due to an indirect effect of this drug by the reduction of erythrophagocytosis and free heme availability.

Keywords: SIRP α , SHP-1, inhibitory receptor, erythrophagocytosis, autoimmune hemolytic anemia, inflammatory cytokines.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Monócitos e macrófagos

O sistema fagocítico mononuclear é formado por células de uma linhagem comum que apresentam como função primária a fagocitose. Essas células se originam na medula óssea (células tronco → monoblastos), circulam no sangue (monócitos), e se tornam maduras e ativadas em diversos tecidos (macrófagos). São definidas como macrófagos no tecido conjuntivo, células microgliais no sistema nervoso central, células reticulares nos órgãos linfóides, osteoclastos no tecido ósseo, células de Kupffer no fígado e macrófagos alveolares nos pulmões (1).

No organismo, o crescimento e diferenciação dos macrófagos são estreitamente regulados por fatores de crescimento específicos, como IL-3, CSF-1, GM-CSF, IL-4 e IL-13, e inibidores, como IFN- α/β , TGF- β e LIF (leukimia inhibitory factor), que variam consideravelmente na sua potência e seletividade (2). Já a combinação de citocinas, *in vitro*, apresenta efeitos diferentes nos macrófagos em relação à soma das partes (3). A resposta de crescimento das células monocíticas a um estímulo extrínseco diminui progressivamente e de forma marcante durante a diferenciação de células-tronco até o precursor de monoblastos, monócitos e macrófagos (2).

IFN- γ e TNF- α , duas citocinas produzidas por macrófagos, apresentam funções imunomoduladoras e pró-inflamatórias. O IFN- γ potencializa a apresentação de antígenos e a liberação de citocinas inflamatórias (4), e aumenta

a liberação por fagócitos de produtos como espécies reativas do oxigênio (EROs) e óxido nítrico (NO), que desempenham um importante papel na atividade antimicrobiana dessas células (5-8). O mecanismo de ação do IFN- γ envolve a ligação a receptores específicos da superfície celular, ativação de moléculas sinalizadoras de transdução, e a consequente modulação da expressão gênica (9).

O TNF- α exerce uma variedade de efeitos fisiológicos e patogênicos. Esta citocina pode apresentar efeitos pró e anti-apoptóticos, dependendo do contexto; controlar a ativação e capacidade de resposta de muitas células, incluindo células do sistema imune; e é o principal elemento de iniciação e perpetuação da resposta inflamatória (10). Além dos macrófagos, linfócitos e monócitos liberam TNF- α principalmente em resposta à presença de lipopolissacarídeos bacterianos (LPS). Seu mecanismo de ação envolve a ligação a receptores específicos chamados Receptores de TNF (TNF-R), e seu principal efeito fisiológico é a promoção da resposta inflamatória pelo recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção (11).

A associação de IFN- γ e LPS *in vitro* apresenta uma ação sinérgica na ativação de macrófagos, e está associada ao aumento da atividade microbicida pela produção de reativos intermediários do nitrogênio (RIN) e EROs, ao aumento produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, e à ativação da imunidade celular (12). A sinergia entre IFN- γ e TNF- α ocorre principalmente em nível de transcrição gênica, pela ativação sinérgica de vias de transdução de sinal e fatores de transcrição. Em macrófagos, IFN- γ e TNF- α promovem a ativação sinérgica da

molécula de transdução de sinal STAT1, assim como aumentam de forma sinérgica a expressão, capacidade de ligação ao DNA e ativação do fator de transcrição IRF1 (13).

1.2. Receptores de Inibição

A ativação da fagocitose em macrófagos é mediada por vários receptores diferentes, incluindo $Fc\gamma R$ e receptores do complemento, que desempenham um papel importante no clearance celular e em processos autoimunes, como a anemia hemolítica autoimune (AHA). As imunoglobulinas ligam-se a receptores na membrana dos fagócitos por meio da sua porção Fc. Os receptores para imunoglobulina são classificados como $Fc\gamma R$ (para IgG), $Fc\alpha R$ (para IgA) e $Fc\epsilon R$ (para IgE) (14).

A ativação desses receptores medeia eventos inflamatórios importantes, como fagocitose, citotoxicidade celular dependente de anticorpos, liberação de mediadores inflamatórios e produção de citocinas. A interação do receptor de ativação $Fc\gamma R$ com a IgG faz com que tirosina-quinases da família Src fosforilem resíduos de tirosina nos ITAMs (*tyrosine-based activation motifs*) da porção citoplasmática deste receptor e em cadeias acessórias gama ou delta que se associam ao $Fc\gamma RIIA$ e $Fc\gamma RIIB$. Os ITAMs fosforilados se tornam sítios de agrupamento da tirosina-quinase Syk, a qual é ativada e desencadeia a cascata de eventos pró-fagocíticos, levando à ativação transcrricional, rearranjo de citoesqueleto, e à liberação de mediadores inflamatórios. Muitas moléculas

sinalizadoras, incluindo cálcio, proteína quinase C (PKC), fosfolipase A2 (PLA2), fosfolipase C γ (PLC γ), fosfolipase D (PLD), fosfatidilinositol 3-quinase (PI-3K), "extracellular signal-regulated kinase" (ERK), e GTPases da família Rho, estão envolvidas na sinalização fagocítica, mas seus papéis exatos nesse processo permanecem pouco elucidados (15-17).

A princípio se assumia que respostas indutoras (expressão gênica, liberação de citocinas, secreção e entrada no ciclo celular) eram terminadas pelo decaimento do ligante ou dessensibilização do receptor, que levaria à cessação da sinalização. Embora esses mecanismos sejam claramente operativos, atualmente sabemos que existem receptores inibidores que funcionam para atenuar sinais indutores, desempenhando assim um importante papel regulador em biologia (18). Assim, esses sinais de ativação também estão sujeitos a uma regulação negativa que pode envolver os ITIMs (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs*) (17), que consistem da sequência I/V-X-pY-X-X-L/V/I, e são locais de ligação para as fosfatases SHP-1, SHP-2 (*Src homology region 2-domain-containing phosphatase-1 e 2*) e SHIP (*SH2 domain-containing inositol phosphatase*) (19).

Os receptores de inibição compartilham grupos ITIM que, quando fosforilados, formam sítios de ligação para os domínios SH2 de SHP-1 e SHIP. Há um alto nível de conectividade nesse sistema, sendo que essas fosfatases também podem se ligar a seqüências ITAM e a outras moléculas adaptadoras como Shc e Grb2. Além disso, a atividade das fosfatases é controlada pela ligação aos seus sítios de ligação e pela fosforilação de tirosinas (17).

Fosforilação em tirosina de proteínas é um mecanismo central em todos os tipos de células mamíferas para a regulação da função de proteínas e é controlada pelo balanço entre as atividades de quinases e fosfatases. Sob condições basais a maior parte das proteínas é mantida em estado não fosforilado. Para manter esse estado, presume-se que a atividade fosfatase basal supere a atividade quinase basal, o que pode ocorrer por inativação de quinases e/ou ativação de fosfatases (17).

Os receptores inibidores podem ser classificados em dois grupos principais com base em diferenças estruturais (Quadro 1). A maior parte destes receptores são proteínas monoméricas que contém múltiplos domínios da superfamília das imunoglobulinas (IgSF) em suas regiões extracelulares. O primeiro grupo inclui FcγRIIB, família Siglec, proteína reguladora de sinal α (SIRP α), *Ig-like transcripts/leukocyte immunoglobulin receptors* (ILTs/LIRs), *killer cell Ig-like receptor* (KIR), PECAM-1, CEACAM-1, *leukocyte-associated Ig-like receptors-1* (LAIR-1), CMRF-35H, e *paired Ig-like type 2 receptor α* (PILR-A). O segundo grupo de receptores inibidores envolve moléculas *lectin-like* tipo C como *mast cell function-associated antigen* (MAFA), *natural killer cell lectin* (NKG2A), e CD72. O quadro abaixo mostra os membros da família de receptores de inibição, seus receptores putativos de ativação, e seus ligantes encontrados em células do sistema imune humano (20).

Receptores de inibição	ITIMs	Receptores de ativação putativos	Ligantes	Localização
Fc γ RIIB	1	Fc γ RIII, Fc γ RIIA, Fc ϵ RI	Complexos de IgG	1q23-24
Siglec 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11	2-5		Ácido siálico	19q13.4
MAFA	1	Fc ϵ RI?		12p12-13
SIRP α	2	SIRP β	CD47	20p13
LIRs	4	ILT1, 7, 8, 6a	HLA	19q13.4
KIR	2	KIR2DS, KIR3DS	HLA	19q13.4
LAIR1	2		EP-CAM	19q13.4
CTLA-4		CD28	CD80, CD86	2q33
PD-1	1	ICOS	PD-1 ligante	2q37.3
CD72	2			9p
CD5	1			11q13
CD31	6		CD31	17q23
CD66a	2			19q13.2
NKG2A	2	NKG2C, NKG2E	HLA-E	12p13.1-2

Quadro 1: Receptores inibidores do sistema imune (20).

1.3. SIRP α

Na comunicação entre eritrócitos e macrófagos, o principal sinal de inibição da eritrofagocitose é dado pela comunicação entre a SIRP α , presente na membrana dos macrófagos, e o CD47 presente na membrana dos eritrócitos.

SIRP (*Signal Regulatory Protein*) é uma família de glicoproteínas composta por SIRP α , SIRP β e SIRP γ , sendo que a diferença entre as moléculas

reside apenas na porção citoplasmática. SIRP β tem uma porção citoplasmática muito curta de apenas seis aminoácidos e não apresenta motivos de sinalização para associação com fosfatases. Associa-se à DAP12 (ou KARAP), uma proteína adaptadora que contém ITAM, por meio de um aminoácido com uma cadeia lateral básica na sua região transmembrana, transmitindo um sinal de ativação, embora seu ligante seja ainda desconhecido. Como SIRP β , SIRP γ tem uma região citoplasmática curta (de quatro aminoácidos), mas não tem uma cadeia lateral de aminoácidos carregados na região transmembrana e, portanto, não se associa à DAP12, parecendo não transduzir sinal algum. SIRP α e SIRP γ se ligam ao CD47, sendo que SIRP α liga-se com muito maior afinidade que SIRP γ . SIRP γ é expressa por células T, e parece funcionar como uma proteína acessória na resposta destas células. A região extracelular das SIRPs consiste de três domínios *Ig-like*, embora também seja expressa uma forma de SIRP α com um *splicing* alternativo com apenas o domínio *Ig-like* distal. Além disso, o gene na SIRP α é altamente polimórfico (21, 22).

A denominação SIRP α é usada principalmente para essas moléculas expressas em humanos e ratos, mas também é conhecida como SHPS-1 (*SH2-domain-containing phosphatase substrate-1*, expressa em camundongos), MyD-1 (ou CD172, expressa em bovinos), BIT (*brain Ig-like molecule with tyrosine-based activation motifs*), MRF (*macrophage fusion receptor*), p84 *neural adhesion molecule* (23).

SIRP α é altamente expressa por neurônios (24) e células mielóides com capacidade fagocítica, como granulócitos, monócitos, macrófagos e células

dendríticas. Uma fraca expressão de SIRP α também é detectada em outros tipos celulares como fibroblastos e células endoteliais (23). Em fagócitos, SIRP α funciona como receptor de inibição, com efeitos similares aos descritos para os receptores inibitórios de células NK (25). Em neurônios, a SIRP α é expressa pelos axônios (21), e parece ser necessária para a modulação do crescimento axonal por moléculas da matriz extracelular, com a laminina (26).

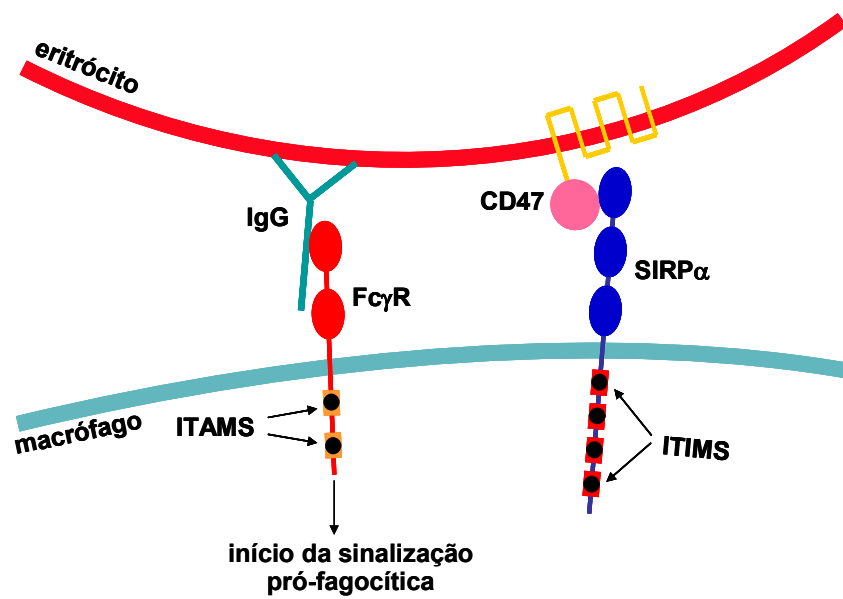
Além de ligar-se ao CD47, SIRP α também se associa a ligantes solúveis, as proteínas surfactantes A e D (SP-A e SP-D), que estão presentes em altas concentrações nos pulmões. SP-A e SP-D se ligam à mesma região da SIRP α que o CD47 (27).

A região citoplasmática da SIRP α é altamente conservada entre ratos, camundongos e humanos. O grau de glicosilação varia consideravelmente entre as espécies, e pode afetar o acesso aos locais de ligação, dificultando a interação da SIRP α com o CD47 (21). O grau de glicosilação e a consequente determinação das propriedades adesivas da SIRP α pode determinar sua especificidade tecidual e seu envolvimento em vários processos biológicos. A SIRP α sem galactose se liga a várias células presentes nos linfonodos, enquanto a SIRP α galactosilada se liga predominantemente a macrófagos do seio subcapsular e medulares. Isto pode indicar que em adição ao CD47, outros ligantes para a SIRP α estão presentes nos macrófagos, que podem provavelmente interagir com os glicanos presentes na SIRP α . Possíveis *counter-receptors* capazes de interagir com os glicanos da SIRP α hematopoiética são, por exemplo, *carbohydrate binding proteins* com afinidade por galactose terminal (galectinas) ou ácidos siálicos (siglecs) (28). Os

diferentes níveis de glicosilação fazem com que a SIRP α apresente diferentes massas de acordo com o tecido (22).

A SIRP α , uma vez ativada, inibe os sinais pró-fagocíticos dos receptores Fc e de complemento (14, 29). A região citoplasmática da SIRP α contém quatro ITIMs e uma região rica em prolina próxima ao terminal carboxi, que representa um local de ligação para as moléculas *Src homology 3 (SH3) domain-containing*. A fosforilação dos resíduos de tirosina associados aos ITIMs permite o recrutamento de SHP-1, SHP-2 e SHIP, que por sua vez desfosforilam substratos protéicos específicos envolvidos na mediação de vários efeitos fisiológicos (22, 30, 31). A SIRP α regula negativamente a fagocitose em macrófagos esplênicos através da sua formação de um complexo com a SHP-1 (32) (Figura 1).

1.



2.

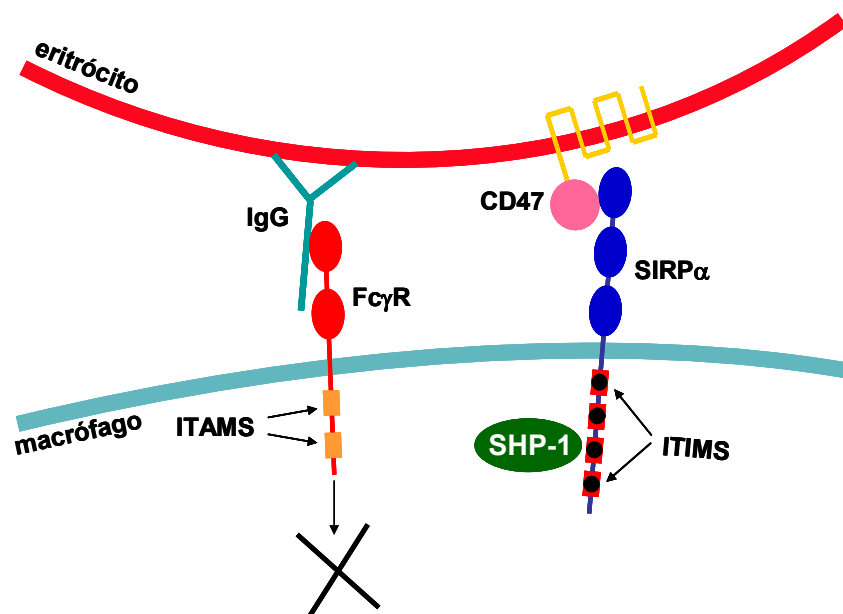


Figura 1: Inibição da eritrofagocitose: 1. Fosforilação das porções ITAM do receptor de ativação (Fc γ R, no exemplo) e das porções ITIM do receptor de inibição (SIRP α) por tirosina quinases da família Src; 2. Recrutamento e ativação da tirosina fosfatase SHP-1 pelos ITIMs fosforilados do receptor de inibição, seguido de desfosforilação dos ITAMs do receptor de ativação e conseqüente inibição da cascata de eventos pró-fagocíticos (23).

A ligação da SIRP α provoca a inibição da atividade celular, resultando em, por exemplo, reduzida fagocitose por macrófagos, retenção intracelular de TNF α e inibição da migração *in vivo* de células polimorfonucleares através do colágeno. Em fibroblastos, SIRP α está envolvida na organização do citoesqueleto mediada por integrinas (21, 33). Smith et al. (2003) (33) mostraram que a retenção intracelular de TNF α (em células mononucleares humanas e U937) provocada pela ligação da MyD-1 ocorre através da inibição da PI3-Kinase, via p85. A secreção de outras citocinas (como IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 p70, IL-15, IFN- γ) não é afetada, indicando que as propriedades inflamatórias da MyD-1 na secreção de citocinas pró-inflamatórias mediada por LPS é especificamente restrita ao TNF α (33). Em glioblastomas, a interação SIRP α -SHP2 regula negativamente a ativação de PI3-Kinase induzida por EGFR, o que contribui para o processo de transformação (34). Em células ovarianas de hamster, a ativação da SHPS-1 em resposta à insulina ou adesão provoca a associação de SHP2 e o aumento a ativação da MAP quinase (35).

Além de SHP-1 e SHP-2, SIRP α também se liga a duas proteínas adaptadoras fosforiladas (*Src-family-associated phosphoprotein 2* ou SCAP2, e *FYN-binding protein* ou FYB), e à proteína adaptadora *growth-factor-receptor-*

bound protein 2 (GRB2), mas o papel dessas interações ainda não é conhecido (21).

A fosforilação de SIRP α pode ser induzida pela interação com CD47, porém a adesão à vitronectina é suficiente para induzir esta fosforilação sem o reconhecimento de CD47 (36). A sinalização CD47-SIRP α em macrófagos depende principalmente da atividade da fosfatase SHP-1 (14, 37), que altera o estado de fosforilação do receptor de ativação e inibe a conversão de GDP-Rac para seu estado ativado GTP-ligado (38).

A afinidade da interação CD47-SIRP α também pode variar dependendo do contexto biológico e pode não refletir simplesmente a expressão das moléculas per se (36). A região citoplasmática da SIRP α regula a afinidade de ligação entre SIRP α e o CD47, regulando, conseqüentemente, múltiplas funções deste receptor. A ausência da cauda citoplasmática provoca um aumento na afinidade de ligação do CD47 com a SIRP α e aumenta a formação de clusters de SIRP α onde há contato com CD47 (39).

Camundongos com mutação da cauda citoplasmática da SHPS-1 apresentam trombocitopenia e esplenomegalia, que deve ser atribuída, ao menos em parte, à combinação da eritrofagocitose pelos macrófagos esplênicos e uma resposta compensatória à anemia. A SHPS-1, através de sua interação com CD47 nos eritrócitos, regula a atividade fagocítica de macrófagos esplênicos por eritrócitos de maneira negativa, desta forma determinando a vida média dos eritrócitos individuais e controlando o número de eritrócitos circulantes (32).

SIRP α também pode funcionar como um receptor de ativação na produção de óxido nítrico (NO) e EROs em macrófagos quando ligada por anticorpos (24, 25), além de também poder potencializar os eventos iniciais da sinalização de integrinas e regular positivamente a cascata de sinalização MAP-quinase em resposta à insulina quando é superexpressa em células transfectadas (40). Alblas et al. (2006) (41) mostraram que a ligação de SIRP α por anticorpo monoclonal ou pela proteína de fusão recombinante composta pelo domínio Ig extracelular do CD47 de camundongo e pela porção Fc da IgG1 humana pode aumentar a expressão da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e a conseqüente produção de NO, e ativar o sistema NADPH oxidase, e sugerem que a H₂O₂ formada impede que a SHP-1 desfosforile JAK/STAT recrutadas para a SIRP α fosforilada, desencadeando assim, um sinal intracelular pró-inflamatório. Este mecanismo envolve a ação cooperativa das vias de sinalização de JAK/STAT e PI3-K/RAC/NADPH oxidase (NOX)/H₂O₂, mas é independente de NF- κ B. Os autores sugerem que a sinalização positiva ou negativa resultante da ligação da SIRP α depende da natureza da função efetora. Deve considerar que os ensaios foram desenvolvidos com ligantes solúveis, sendo que o CD na membrana celular pode apresentar alterações em sua conformação, por exemplo. Além disso, também se deve considerar a sinalização dos componentes associados à SIRP α , o que torna esse cenário ainda mais complexo (41).

Mitsuhashi et al. (2005) (42) mostraram que na musculatura esquelética a SHPS-1 é modulada dependendo de influências neurais. O estudo mostrou que em músculos denervados de camundongos, SHPS-1 é expressa em maior

quantidade, não interage com a SHP-2, e apresenta alterações na sua glicosilação e localização. Isto sugere que a SHPS-1 pode desempenhar um importante papel em músculos denervados (26).

Em plaquetas, após ligação com SHPS-1, CD47 serve como um receptor de inibição para a sinalização mediada por $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. A interação entre o CD47 das plaquetas e o SHPS-1 expresso nas células endoteliais e/ou em leucócitos pode contar para a prevenção da formação de trombos (43).

No sistema nervoso, a interação $\text{SIRP}\alpha$ -CD47 ocorre entre a $\text{SIRP}\alpha$ expressa por axônios e o CD47 expresso por dendritos em neurônios hipocámpais, e entre sítios de contato sináptico na retina (21). Wang et al. (2006) (26) mostraram que a $\text{SIRP}\alpha$ dos cones de crescimento parece ser dinamicamente associada aos LMDs (microdomínios lipídicos), provavelmente incluindo receptores de fatores de crescimento e integrinas. A ativação desses receptores estimula temporariamente, via kinases da família Src, a fosforilação de $\text{SIRP}\alpha$ e a ligação de SHP2. Isto afeta a razão de crescimento axonal estimulada por IGF-1, provavelmente via ativação de SHP-2 e modulação da sinalização do receptor de IGF-1 (26).

O papel da SHPS-1 no desenvolvimento de tumores vem sendo estudado, mas os resultados ainda são controversos. Chen et al. (2004) (36) mostraram que a maioria das linhagens celulares de tumores expressa $\text{SIRP}\alpha$, embora os níveis de expressão variem consideravelmente, dependendo do tipo de tumor. $\text{SIRP}\alpha$ é expressa em astrócitos malignos, enquanto estudos em ratos revelaram que astrócitos normais não expressam $\text{SIRP}\alpha$ (36). Já Oshima et al.

(30) relataram que mais de 40% dos tecidos de câncer de mama mostraram expressão diminuída de SHPS-1, e que a expressão de SHPS-1 é bastante reduzida nas células transformadas com produtos de oncogene como v-Src, k-Ras, v-Fps, e papilomavírus de células T grandes, sugerindo que reguladores chave do controle de crescimento podem ser regulados pela SHPS-1 (44). Assim, o efeito final da expressão de SIRP α pode depender da célula na qual é expresso assim como dos complexos de sinalização em questão (36).

1.4. CD47

CD47 (ou IAP, *integrin-associated protein*) é uma glicoproteína amplamente expressa que funciona como um marcador de próprio para os eritrócitos (45). Eritrócitos expressam altos níveis de CD47 acoplado ao complexo Rh e à proteína 4.2 do complexo banda 3 da membrana (24, 45).

O CD47 é um membro da superfamília das Ig de proteínas de membrana, com um único domínio *IgV-like* amino-terminal, uma extensão altamente hidrofóbica com cinco segmentos passando transmembrana, e um domínio citoplasmático carboxi-terminal (Figura 2). O domínio Ig é necessário para a interação do CD47 com as suas integrinas associadas $\alpha v\beta 3$, $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha II\beta\beta 3$ e com seus ligantes trombospondina (TSP) e SIRP α (25, 30, 31, 46).

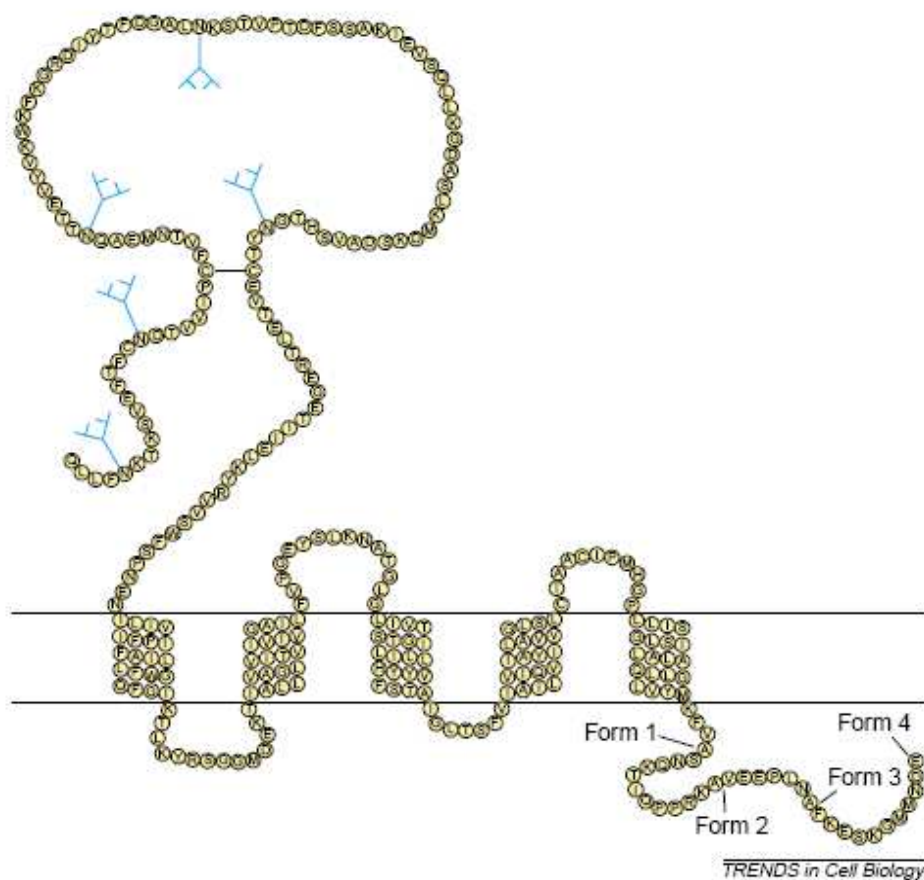


Figura 2: Estrutura do CD47 (ou IAP). O domínio extracelular do tipo IgV altamente glicosilado é seguido de cinco segmentos transmembrana que terminam em uma cauda citoplasmática que apresenta quatro formas de *splicing* alternativo, dando origem a quatro isoformas (31).

CD47 é importante na migração trans-endotelial e trans-epitelial de neutrófilos, monócitos e linfócitos, e na ativação de fagócitos por proteínas de matriz *RGD-containing*, como vitronectina, fibrinogênio, e colágeno tipo IV. Um efeito peculiar da ligação do CD47 por anticorpos monoclonais (mAc) ou TSP é induzir a apoptose caspase-independente em células T, e em leucemia linfocítica crônica (25). O CD47 também está envolvido na captura constitutiva de células T

no endotélio inflamatório sob *shear stress* fisiológico. Este efeito parece ser devido à transdução de um sinal de ativação dentro da célula T, que pode ser mediado tanto pela interação do CD47 com a TSP quanto com a SIRP α (47).

Em células da musculatura lisa vascular e endotelial, a ligação da TSP1 ao CD47 apresenta ação anti-angiogênica, inibindo a resposta fenotípica estimulada por NO e a sinalização de cGMP (48). A importância fisiopatológica deste efeito fica evidente em dois trabalhos de Isenberg et al. (2007) (49) e Isenberg et al. (2008) (50). No primeiro (49), os autores mostraram que camundongos CD47-nulls, ou com expressão de CD47 suprimida, são protegidos de necrose causada por isquemia aguda. No segundo, Isenberg et al. (2008) (50) mostraram que esta sinalização também pode conferir susceptibilidade aos efeitos lesivos da radiação, pois camundongos TSP1-null ou CD47-null apresentam pronunciada resistência às lesões por radiação.

CD47 no eritrócito pode reduzir o clearance *in vivo* e a fagocitose *in vitro* de eritrócitos IgG opsonizados pela interação com a SIRP α do macrófago. Da mesma maneira, a interação CD47-SIRP α também regula a fagocitose CR3/amb2 mediada por integrina de eritrócitos opsonizados por C3bi (25).

Eritrócitos de camundongos deficientes em CD47 (CD47^{-/-}) são rapidamente eliminados da circulação de recipientes selvagens, mas não são afetados em recipientes CD47^{-/-}, o que sugere que o macrófago também seja regulado pela expressão de CD47 na sua superfície ou em seu ambiente. Além disso, a ingestão de eritrócitos IgG-opsonizados por macrófagos é regulada pelo CD47 de maneira dose-dependente, pois eritrócitos com expressão de CD47

reduzida em 50% são mais rapidamente eliminados que eritrócitos normais, e mais lentamente eliminados que eritrócitos CD47-null (51). Esta eliminação ocorre sem a participação de células T e B clássicas, ativação de complemento ou anticorpos. O clearance de eritrócitos ocorre primariamente no baço, principalmente por macrófagos da poupa vermelha, já que a esplenectomia abole quase completamente a eliminação de eritrócitos (21, 45).

Tanto SIRP α quanto CD47 podem prover sinal intracelular, e ambos podem estar presentes na mesma célula (21, 41). Confirmando esta observação, Ishikawa-Sekigami et al. (2006) (52) mostraram que tanto a SHPS-1 quanto o CD47 na superfície dos macrófagos esplênicos são necessários para o aumento da fagocitose de eritrócitos CD47-/- por essas células. A ablação de CD47 na superfície dos eritrócitos provavelmente promove a fagocitose desses glóbulos por macrófagos não apenas como o resultado da perda da interação inibitória entre CD47 e SIRP α , mas também pela geração de um sinal estimulador que precisa de ambos CD47 e SIRP α nos macrófagos (52). Em camundongos NOD (*nonobese diabetic*), eritrócitos CD47-/- são mais susceptíveis à destruição imune mediada por autoanticorpos (autoAc) devido ao fato de a falta de interação CD47-SIRP α aumentar os sinais pró-fagocíticos induzidos por Fc γ R e CR. Camundongos NOD anêmicos apresentam concentrações mais elevadas de IgG e IgM em camundongos CD47-/- que em CD47+, sugerindo que a produção dos autoAc anti-eritrocitários é acelerada na ausência de CD47 (25).

CD47 e seu receptor cognato SIRP α entregam um sinal negativo bidirecional para células T e células dendríticas (DC), mas o resultado desta

interação ainda é bastante controverso. Estudos de Latour et al. (2001) (53) mostraram que em células dendríticas, a interação CD47/SIRP α inibe a capacidade de resposta à IL-12 por células T anti-CD3-ativadas, um fenômeno associado à diminuição da expressão de IL-12R. Assim, os autores propõem que este par de moléculas esteja envolvido na regulação negativa da resposta inflamatória, na terminação de respostas imunes Ag-específicas iniciadas pelo contato entre mDC e células T naive, e/ou na inibição de respostas Th1 indesejadas (53). Em contrapartida, Seiffert et al. (2001) (54) mostraram que, considerando a interação entre DC e LT, a sinalização SIRP α -CD47 pode promover a proliferação dos LT e contribuir para a ativação de LT citotóxicos antígeno-específicos.

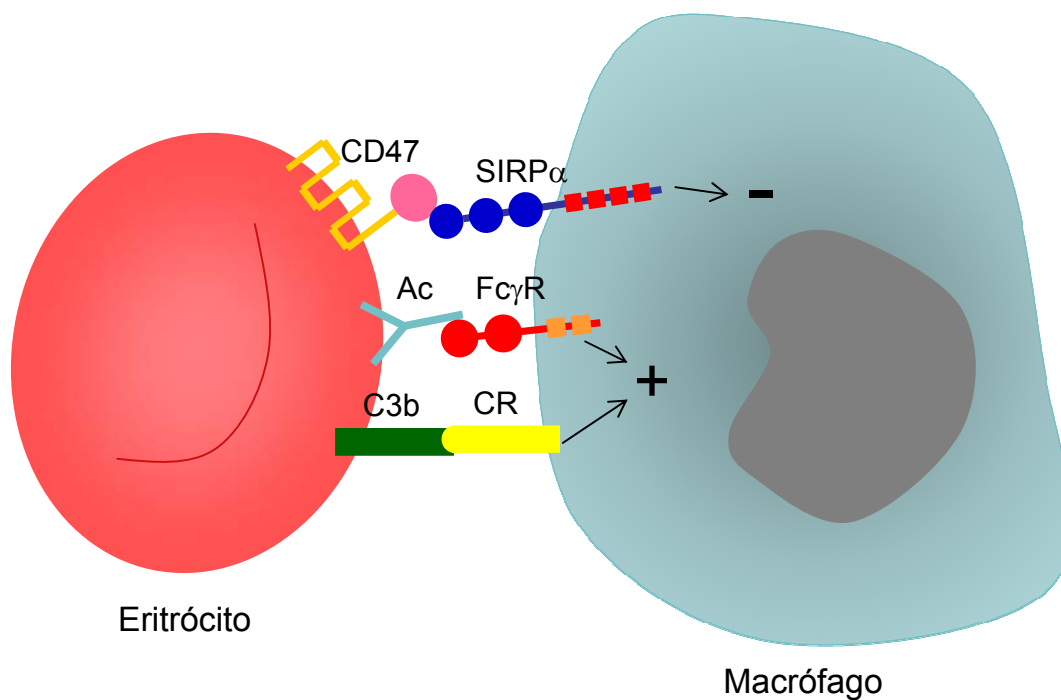
A ligação do CD47 ao TSP também modula a função de monócitos pela supressão da liberação de IL-12, inibindo a resposta de proliferação e de liberação de IFN γ induzidas por IL-12 em linfócitos T ativados (55).

Macrófagos esplênicos da poupa vermelha podem fagocitar eritrócitos CD47-/- não-opsonizados. O mecanismo de reconhecimento pró-fagocítico utilizado por esses macrófagos não é conhecido em detalhes, mas parece envolver o reconhecimento da calreticulina da superfície celular dos eritrócitos pelo *LDL receptor-related protein 1* no macrófago (25).

Head et al. (2005) (56) mostraram que a sinalização da fosfatidilserina e consequente perda de viabilidade dos eritrócitos pode ser mediada pela ligação do CD47 com mAc, TSP-1 e o peptídeo derivado 41NK que se liga especificamente ao CD47, o que sugere que o CD47 possa estar envolvido na indução da morte de

eritrócitos. Estudos referentes ao efeito da ligação do CD47 sobre a apoptose em diferentes linhagens celulares (como Jurkat, linhagens de células mielóides e de células B) mostraram resultados controversos, sugerindo que o contexto biológico, o estado de ativação celular, co-sinalização por moléculas acessórias, conformação e flexibilidade antigênica, fatores de crescimento e citocinas são componentes que podem estar envolvidos na determinação da resposta à ligação do CD47 (46). Em células viáveis, CD47 previne a fagocitose, mas em células senescentes ou apoptóticas o CD47 pode ser importante na facilitação do clearance celular por macrófagos (25).

A atividade de fagocitose do macrófago é determinada por um balanço entre sinais de inibição e ativação. A fagocitose é determinada pela força de sinalização relativa da SIRP α ligada pelo CD47 e de Fc γ R, receptores de complemento ou outros receptores pró-fagocíticos (Figura 3). Parece que nem os sinais de ativação ou inibição são dominantes. Ao contrário, a atividade fagocítica é determinada pela integração desses dois sinais (57).



Adaptado de Madame Curie Bioscience Database: Hematologic Diseases: Autoimmune Hemolytic Anemia and Immune Thrombocytopenic Purpura. In: Landers Bioscience, 2006.

Figura 3: Sinais que determinam a eritrofagocitose. O estabelecimento ou não da eritrofagocitose é o resultado do somatório das forças relativas dos sinais de ativação ($\text{Fc}\gamma\text{R}$, CR) e de inibição ($\text{SIRP}\alpha$) (57).

1.5. SHP-1

$\text{SIRP}\alpha$ é um dos substratos diretos da fosfatase SHP-1, e Timms et al. (1998) (19) sugerem que as funções fisiológicas mais importantes de SHP-1 sejam regular a proliferação e a ativação de macrófagos.

A SHP-1 desempenha um papel de sinalização negativa, mantendo proteínas de sinalização em um estado inativo desfosforilado. Portanto, é

apropriado que SHP-1 seja mantida em um estado de atividade basal alto que possa ser rapidamente desligado sob ativação celular (58, 59).

O C-terminal das proteínas tirosina fosfatases (PTPs) SHPs são ricos em motivos que a permitem regular, de alguma maneira, a função das fosfatases. Há cinco tipos de mecanismos que podem operar dentro do C-terminal: 1) tirosinas que podem ser fosforiladas; 2) serinas que podem ser fosforiladas; 3) motivos de interação *membrane lipid*; 4) motivos de localização *lipid raft*; 5) motivos de interação ricos em domínios prolina (60).

Os domínios SH2 regulam a atividade fosfatase das enzimas SHP-1 e 2. Em estado inativo, o domínio SH2 N-terminal permanece em contato com o domínio catalítico da molécula, restringindo o acesso dos substratos à fosfatase. O C-terminal permanece exposto e procura por potenciais sítios de ligação fosforilados em Tyr (podem ser ITIMs), e a ligação de um fosfopeptídeo ao domínio SH2 N-terminal provoca uma transição alostérica no domínio SH2 de um estado inativado para um estado ativado e a subsequente desfosforilação do substrato. Esses substratos podem ser receptores ativados ou moléculas de sinalização, como as JAKs (família Janus Kinase de tirosina quinases 1, 2, 3 e TYK-2) ativadas (58, 61).

Embora a expressão de SHP-1 seja predominantemente hematopoiética, expressão moderada desta proteína é aparente em muitos tecidos não hematopoiéticos incluindo células epiteliais malignas. Em células não-hematopoiéticas, SHP-1 é importada para dentro do núcleo e geralmente regula positivamente a sinalização celular, enquanto em células hematopoiéticas, SHP-1 é expressa no citoplasma (58, 61).

Camundongos sem SHP-1 funcional (fenótipo *motheaten*) exibem doença autoimune severa de múltiplos órgãos, levando à morte dentro de três semanas após o nascimento (59). Esses camundongos exibem concentração aumentada de citocinas inflamatórias (IL-6, IFN γ e TNF α) no soro. Adicionalmente, linfócitos T e B desses animais secretam quantidades elevadas de citocinas (IL-6, IFN γ e TNF α) em cultura celular, e há maior número de células T expressando o IL-2R. Em camundongos com mutação parcial de SHP-1 (*motheaten* viable, ou *Mev*), a expressão aberrante de NF- κ B tem o potencial de causar defeitos funcionais na produção e regulação de citocinas e medeia condições fisiológicas que promovem autoimunidade (62). Além disso, após tratamento com IFN α , GH ou EPO, esses animais apresentam hiperfosforilação de JAK1 e JAK2 (61). Além disso, a perda de função da SHP-1 aumenta a diferenciação de células Th1 e a produção de IFN- γ por essas células, indicando que a SHP-1 regula negativamente a resposta Th1 e a produção de IFN γ (63).

Em plaquetas humanas em condições basais, a atividade SHP-1 é alta e diminui sob ativação celular com trombina. Esta ativação constitutiva da SHP-1 pode ser mediada por ligação constitutiva dos seus domínios SH2 a um complexo protéico que inclui a PKC α (e esta ligação deve envolver proteínas intermediárias, pois a PKC α não é Tyr fosforilada em condições basais em plaquetas) e têm implicação na ativação constitutiva de SHP-1 na célula (59).

Em células progenitoras eritróides, SHP-1 se liga seletivamente à pY429 no domínio citoplasmático do EPO-R. Esta interação medeia a

desfosforilação e inativação de JAK2, o que é importante para a modulação negativa dos sinais gerados pelo EPO-R ativado (64).

Em linfócitos T, o papel regulador negativo da SHP-1 na sinalização através complexo TCR/CD3 é mediado dentro dos *lipid rafts* (estruturas lipídicas firmemente empacotadas e altamente ordenadas, que ficam na membrana plasmática mais fluida). O C-terminal da SHP-1 é importante na mediação da localização desta fosfatase em *lipid rafts* e isto é, portanto, crítico para o papel inibidor da SHP-1 em eventos de sinalização iniciados através do TCR (58, 60). Os efeitos da SHP-1 na sinalização TCR traduzem não apenas para a regulação negativa da proliferação de células T, mas também para a supressão da maturação/expansão TCR-dirigida e deleção clonal no timo, o que pode influenciar a transição entre seleção positiva e negativa e, por extensão, os eventos celulares que levam à autoimunidade (65).

O papel da SHP-1 na transformação celular também vem sendo estudado. Há um alto nível de expressão de SHP-1 na maioria das linhagens celulares de carcinoma epitelial ovariano e tecidos de câncer epitelial ovariano invasivos. Mok et al. (1995) (66) supõe que mutações somáticas ao longo do gene PTPN6 (o gene que codifica para SHP-1) podem resultar na geração de uma proteína biologicamente alterada com maior estabilidade e acumulação.

Dos 107 genes que codificam PTPs, 38 são classificadas como PTPs clássicas, caracterizadas pelo motivo V/I-H-C-S-X-G dentro de seu domínio catalítico, e são estritamente fosfotirosina-específicas. De todas as PTPs ativas, apenas as duas PTPs citosólicas SHP-1 e SHP-2 contém domínios SH2 consecutivos, o que confere especificidade biológica pela interação simultânea de

dois domínios SH2 da enzima de sinalização (no caso, da fosfatase), com os ITIMs (ou ITAMs) bifosforilados dos receptores ou substratos (67).

Há cinco isoformas conhecidas de SHP, sendo quatro SHP-1 e uma SHP-2. Três variantes da SHP-1 apresentam variações no terminal N da proteína, e uma isoforma apresenta o N-terminal conservado, mas o C-terminal é estendido. SHP-1 e SHP-2, embora estruturalmente semelhantes, apresentam diferentes papéis na transdução de sinal: enquanto SHP-1 desempenha um papel de sinalização negativa, SHP-2 geralmente desempenha um papel positivo na sinalização celular levando à ativação celular. Enquanto a expressão de SHP-1 é restrita principalmente às células hematopoiéticas, SHP-2 é mais amplamente expressa. Ambas são expressas em muitas células hematopoiéticas (58).

1.6. Anemia Hemolítica Autoimune

A anemia hemolítica auto-imune (AHAI) resulta do aumento da taxa de destruição das hemácias associado à presença de auto-anticorpos dirigidos a esses glóbulos. Sua incidência corresponde a 1 a 2 casos/100.000 (68, 69). Alguns autores a consideram como um componente de uma doença sistêmica complexa secundária a uma disfunção do sistema imune (69). Os achados laboratoriais que caracterizam hemólise exacerbada são: redução de hemoglobina/hematócrito (Hb/Ht) e de haptoglobina, e aumento de reticulócitos, bilirrubina indireta, urobilinogênio urinário e da enzima lactato desidrogenase. Os aspectos clínicos da AHAI envolvem os sinais clássicos de anemia, como tontura, fraqueza, palidez e falta de ar (70).

A classificação das AHAI é feita com base no tipo de anticorpo e temperatura na qual ele reage *in vivo*, podendo ser classificada em AHAI por auto-anticorpos a quente, por auto-anticorpos a frio, ou por hemolisinas bifásicas (71).

Na AHAI a quente, autoanticorpos aderem aos eritrócitos em temperatura entre 35 e 40°C, resultando em seqüestro por macrófagos esplênicos e hemólise extravascular. É a forma mais comum de AHAI; a produção dos autoanticorpos pode ser idiopática ou secundária a doenças linfoproliferativas, autoimunes, imunodeficiências, infecções ou drogas. Os autoanticorpos são geralmente da classe IgG (principalmente IgG1 e IgG3), mas também podem ser IgA e IgM, e ligam-se a antígenos eritrocitários de alta frequência na população (68, 71).

Os auto-anticorpos a frio são do tipo IgM e reagem em temperatura inferior a 30°C. Estes anticorpos fixam complemento e costumam ser direcionados a antígenos específicos (anti-I, anti-i e anti-Pr). A hemólise é predominantemente intravascular, porém pode acontecer também pela aderência das hemácias a macrófagos, principalmente células de Kupffer, através de seus receptores de complemento. A AHAI por anticorpos a frio pode ser idiopática ou secundária a doenças linfoproliferativas ou infecciosas (*Mycoplasma*, mononucleose) (68).

Já na AHAI por hemolisinas bifásicas, os auto-anticorpos são principalmente da classe IgG, fixam complemento a 30°C e promovem a lise das hemácias a 37°C, resultando também em hemólise intravascular. O principal exemplo deste tipo de AHAI é a hemoglobinúria paroxística ao frio, caracterizada pelo aparecimento de hemólise aguda em criança com história de infecção viral recente (72, 73).

O nível do clearance de eritrócitos *in vivo* e fagocitose *in vitro* é determinado pela quantidade de auto-Ac ligados à superfície das hemácias em sistemas experimentais. Apesar do papel proeminente da IgG anti-eritrocitária, a fagocitose de eritrócitos mediada por macrófagos na AHAI é provavelmente mediada por uma atividade sinérgica dos receptores Fcγ e de complemento, pois eritrócitos opsonizados com pequenas concentrações de IgG não são eliminados *in vivo* na ausência de complemento, e vice-versa, sendo que baixas concentrações de ambas resultam em eficiente fagocitose (25).

O diagnóstico de AHAI é estabelecido quando o paciente apresenta evidências clínicas ou laboratoriais de hemólise associadas à presença de auto-anticorpo. O Teste de Antiglobulina Direto (TAD) com soro poliespecífico positivo indica se há presença de um anticorpo antieritrocitário aderido à membrana das hemácias. Entretanto não é um teste específico, sendo necessários outros testes para melhor caracterização e também para a investigação do autoanticorpo circulante, como o TAD com soros monoespecíficos anti-IgG, IgM, IgA, C3, C3dg e a pesquisa e identificação de autoanticorpos circulantes. A evolução da AHAI idiopática por auto-anticorpos a quente não é previsível. Os pacientes podem alternar períodos de remissão e recaídas. Já o curso clínico da AHAI secundária depende da doença de base e sua evolução (71), sendo que se podem passar anos desde o começo do processo hemolítico e os primeiros sinais e sintomas da doença de base (69).

Muitos casos de AHAI a quente ocorrem após infecção viral como hepatite C ou A, HIV-1, Epstein-Barr, rubéola ou varicela. Diversas linhas de

evidências apontam para a fagocitose como o principal mecanismo envolvido no efeito exacerbado de vírus sobre doenças hemolíticas autoimunes mediadas por anticorpos. Neste contexto, se cogita que citocinas pró-inflamatórias liberadas pelo indivíduo durante a resposta à infecção viral desempenhem um papel significativo na ativação de macrófagos e desenvolvimento de eritrofagocitose em AHAI pós-infecção viral (74-77). Além da anemia hemolítica autoimune, a eritrofagocitose por macrófagos é um fenômeno que pode ser encontrado em diversas outras situações, como em doenças metabólicas ou malignas (78).

Em contrapartida, diversos estudos apontam a AHAI como uma doença com padrão de liberação de citocinas predominantemente Th2. Pacientes com AHAI apresentam redução da produção de citocinas Th1 como IFN γ e IL-12, e aumento da produção de citocinas Th2 como IL-10 e IL-4. Também se observa um aumento da produção de IL-2, que é atribuído à necessidade de estímulo de proliferação de células T e não a um aumento da estimulação Th1 (79).

O tratamento de primeira escolha nas AHAIs é o glicocorticóide (GC), que pode ser prednisona (1 mg/Kg/dia) (70) ou pulsoterapia de metilprednisolona ou dexametasona para os casos mais graves (80). Prednisona é uma pró-droga inativa que sofre metabolismo oxidativo no fígado, catalizado pela 11 β -hidroxi esteróide desidrogenase, formando a droga ativa prednisolona. Aproximadamente 70% da prednisona administrada por via oral é absorvida e convertida em prednisolona, e esta conversão é rápida e extensa (81, 82).

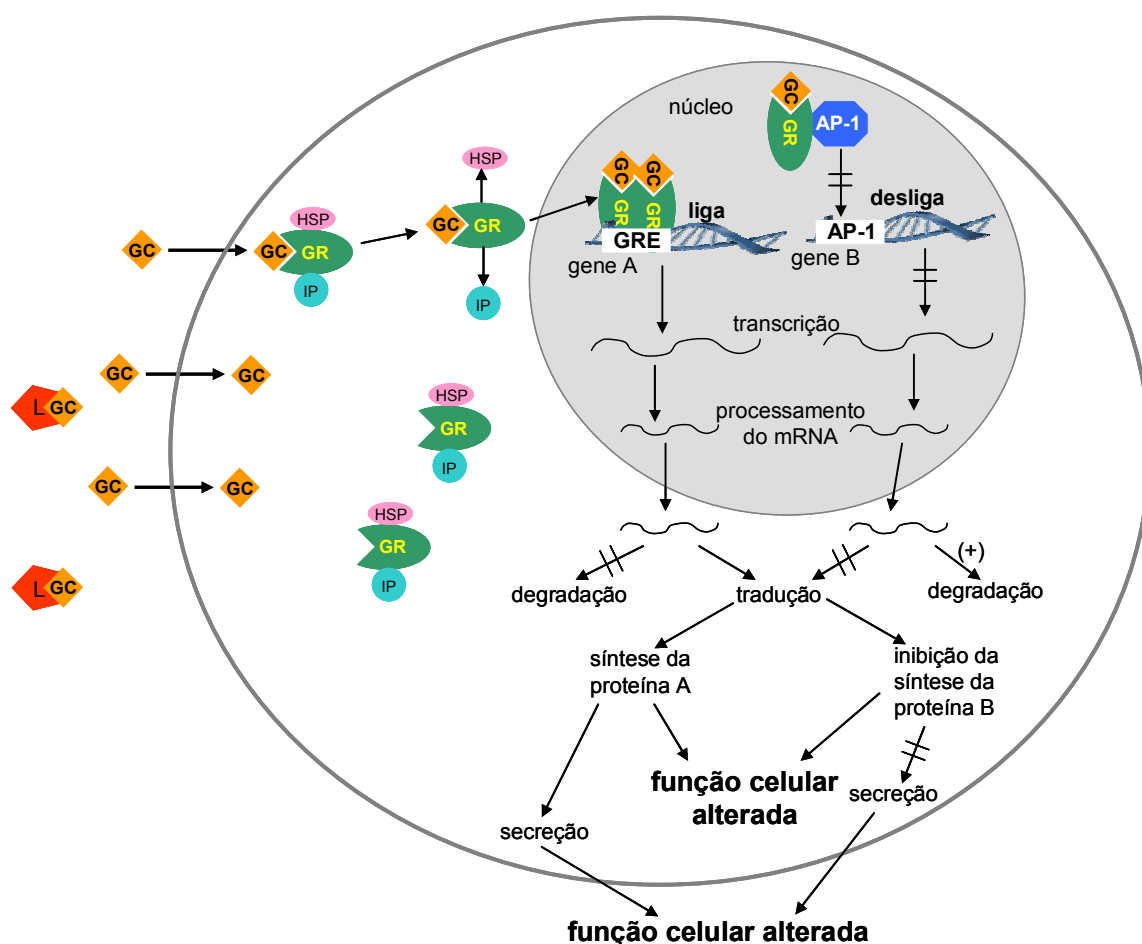
Aproximadamente 20% dos pacientes atingem remissão completa da doença após corticoterapia. A melhora hematológica alcançada na terapia com

glicocorticóide parece envolver a redução da quantidade de autoAc aderidos aos eritrócitos e séricos e a supressão do seqüestro de eritrócitos por macrófagos esplênicos (71).

Os pacientes com AHAI têm significativamente maior número de Fc γ R que controles normais, sendo que homens, tanto controles quanto pacientes, apresentam maior número que mulheres nas mesmas condições. A administração de glicocorticóide *in vivo* leva à diminuição do número destes Fc γ R, que ocorre de maneira dose-dependente (83). *In vitro*, o tratamento de polimorfonucleares humanos com concentração terapêutica de dexametasona causa uma diminuição na citotoxicidade celular dependente de Ac (ADCC) e na fagocitose. Isto se deve ao menos em parte à redução da expressão de Fc γ RI e CR3 (84), além de uma redução da habilidade de ligação dos receptores de IgG e C3b, o que secundariamente resulta na diminuição da atividade metabólica (85).

Os efeitos anti-inflamatórios dos glicocorticóides são mediados principalmente por receptores que modulam a expressão de genes específicos (84). Após penetrar nos tecidos, os glicocorticóides ligam-se a receptores de glicocorticóides (GR) no citoplasma. No processo de ligação ocorre a liberação de uma proteína conhecida como “proteína de choque térmico” (hsp 90). O complexo hormônio-receptor é então transportado até o núcleo, onde se liga a “elementos de resposta aos glicocorticóides” (GREs) em seqüências palindrômicas de DNA específicas localizadas ao redor dos genes transcrionalmente ativados pelos GRs (86, 87).

Além de modular a transcrição, os GCs também apresentam efeitos em eventos celulares mais tardios, incluindo a tradução de RNA, síntese protéica, e secreção. Também podem alterar a estabilidade de mRNAs de diversas citocinas e outras proteínas, alterando consequentemente as concentrações intracelulares dessas moléculas (88) (Figura 4).



Adaptado de Boumpas et al., Ann Intern Med 1993;119(12):1198-208.

Figura 4: Mecanismo de ação dos glicocorticóides. Os glicocorticóides (GC) circulam como moléculas livres ou complexadas a proteínas de ligação plasmáticas (L). Após a entrada do esteróide na célula, este se liga a receptores presentes no citosol (GRs) complexados a proteína de choque térmico (HSP) e imunofilina (IP). A ligação do esteróide ao

complexo provoca a dissociação da HSP e da IP. O complexo receptor-ligante transloca para o núcleo onde se liga a (ou próximo a) sequências de DNA flanqueadoras 5' de certos genes. Essas regiões são conhecidas como "Elementos de Resposta aos Glicocorticóides" (GREs). A ligação do receptor às seqüências reguladoras de genes específicos aumenta ou diminui sua expressão. No primeiro caso, os GCs aumentam a transcrição ou estabilidade ou ambos do mRNA, que é traduzido nos ribossomos para a proteína correspondente. No segundo caso, os GCs suprimem certos genes em nível de transcrição por interagir e prevenir a ligação dos fatores nucleares necessários para a ativação dos genes (por exemplo, AP-1). Em outros casos, os GCs exercem seus efeitos pós-transcricionalmente pelo aumento da degradação do mRNA ou pela inibição da síntese ou secreção de proteínas. NLS₂ = seqüências de localização nuclear 1 e 2; τ_1 and τ_2 = domínios de transativação 1 e 2 (88).

Para os pacientes que não respondem a esta medicação (cerca de 10%) ou que necessitam manutenção de prednisona em doses acima de 0,25 mg/Kg/dia para o controle da doença, deve-se considerar a esplenectomia ou o uso de drogas imunossupressoras, como a ciclofosfamida e a azatioprina (68, 69, 71, 89). Qualquer destes tratamentos requer monitoramento constante dos efeitos colaterais relacionados.

Com o objetivo de explicar por que alguns autoAc humanos anti-eritrocitários são mais hemolíticos que outros, Olsson et al. (2006) (25) sugerem que como o CD47 está associado ao complexo de proteínas do Rh, há a possibilidade de que alguns Ac sejam capazes de interferir com a interação CD47-SIRP α . Assim, a modulação da sinalização decorrente da ligação entre CD47 e

SIRP α constitui uma alternativa potencial para controlar ou mesmo impedir a destruição dos eritrócitos na AHAI.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2.1. JUSTIFICATIVA

A sinalização SIRP α -CD47 entre monócitos e eritrócitos, mediada pela ação da fosfatase SHP-1, desempenha papel fundamental na inibição da eritrofagocitose. O conhecimento da regulação farmacológica da expressão de SIRP α e SHP-1, assim como a influência dessa regulação sobre a atividade funcional de monócitos, visam contribuir para a elaboração de uma ferramenta potencial para o controle da eritrofagocitose em doença hemolítica.

A cultura de monócitos com GC nos permite avaliar o efeito direto desta droga sobre a expressão de SIRP α e SHP-1, assim como sobre a atividade eritrofagocítica de monócitos. Com isso podemos determinar se a regulação da expressão dessas proteínas faz parte do mecanismo dos GCs de inibição da eritrofagocitose *in vivo*. A determinação do efeito de IFN γ /TNF α sobre a expressão de SIRP α e SHP-1, e sobre a capacidade de eritrofagocitose de monócitos de doadores saudáveis nos permite avaliar o papel dessas citocinas no desenvolvimento de AHAI após infecção viral. Além disso, a determinação do nível de expressão gênica de SIRP α e SHP-1 em pacientes com AHAI a quente nos permite avaliar como esse sistema funciona no curso da doença hemolítica, após tratamento farmacológico, e o seu envolvimento na fisiopatologia da AHAI.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar a modulação da expressão gênica e protéica de SIRP α e SHP-1 por dexametasona e pelas citocinas IFN γ e TNF α , e a consequência desta modulação sobre a atividade eritrofagocítica de monócitos humanos de doadores sadios. Além disso, avaliamos a expressão gênica de SIRP α e SHP-1 em pacientes com AHAI antes e após corticoterapia, e o possível papel da citocina IL-10 e da hemina nesta regulação.

2.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar o efeito da dexametasona e das citocinas IFN γ /TNF α sobre a expressão gênica e protéica de SIRP α e SHP-1 em monócitos de doadores sadios;
- 2) Avaliar o efeito da dexametasona e das citocinas IFN γ /TNF α sobre a atividade eritrofagocítica de monócitos de doadores sadios;
- 3) Determinar o nível de expressão gênica de SIRP α e SHP-1 em monócitos de pacientes com AHAI antes e após corticoterapia;
- 4) Avaliar o efeito da prednisona sobre a expressão gênica de SIRP α e SHP-1 em monócitos de doadores sadios;
- 5) Comparar a cinética de expressão gênica de SIRP α e de SHP-1 à cinética de liberação da citocina IL-10 em células mielomonocíticas U937;

- 6) Avaliar a influência do heme na expressão de $\text{SIRP}\alpha$ e SHP-1 em monócitos de doadores sadios;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Seleção doadores sadios

Foram selecionados 32 doadores de sangue para o isolamento de monócitos destinados à determinação da regulação farmacológica *in vitro* da expressão de SIRP α e SHP-1. Outros 4 doadores Rh+ foram selecionados para isolarmos eritrócitos para os ensaios de eritrofagocitose. Todos os doadores seguiram os seguintes critérios de exclusão: fumo; processo inflamatório, infeccioso ou doença genética; uso de anti-inflamatórios não-esteroidais ou drogas antimicrobianas nos últimos 30 dias; ou uso de anti-inflamatórios esteroidais ou outros imunossupressores nos últimos 6 meses; ou transfusão de hemoderivados nos últimos 3 meses. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas de acordo com a Resolução 96/196 do Ministério da Saúde do Brasil. Todos os participantes assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido antes de serem incluídos no protocolo.

3.2. Avaliação Imunohematológica dos pacientes com AHAI:

A caracterização imunohematológica dos pacientes com AHAI estudados envolveu os seguintes ensaios:

3.2.1. Teste da Antiglobulina Direto (TAD)

O TAD foi realizado para se determinar a presença de auto-Ac e/ou complemento aderidos à membrana das hemácias dos pacientes avaliados. À

princípio de fez o TAD utilizando-se soro poliespecífico, que apontou para a presença ou não de IgG ou complemento. Confirmando este ensaio, se fez o TAD utilizando-se soros monoespecíficos anti-IgG, anti-IgM, anti-IgA e anti-C3d, o que nos permitiu identificar a classe dos auto-Ac aderidos às hemácias ou se esta estava sensibilizada por complemento. Os anticorpos utilizados no ensaio se ligam aos auto-Ac presentes na membrana das hemácias testadas promovendo sua aglutinação. Assim, o TAD foi realizado pela técnica de gel centrifugação com soros poliespecífico (DiaMed – ID, Cressier Sur Morat, Suíça) e monoespecíficos (DiaMed – ID, Cressier Sur Morat, Suíça).

3.2.2. Eluato

O ensaio de eluato confirmou o caráter anti-eritrocitário dos auto-Ac aderidos às hemácias dos pacientes. Para isso se promoveu a eluição dos auto-Ac aderidos às hemácias utilizando a técnica da glicina ácida (DiaMed, DiaMed Latino América, Brasil), e o eluato obtido foi testado contra hemácias de triagem comerciais (DiaMed, DiaMed Latino América, Brasil). Assim como no TAD, presença dos Ac anti-eritrocitários (que se ligam às hemácias comerciais) é determinada por ensaio de aglutinação. Desta forma se pôde determinar a especificidade dos Ac aderidos às hemácias.

3.2.3. Pesquisa de auto anticorpos

A pesquisa de anticorpos detecta a presença de auto e/ou alo-Ac anti-eritrocitários no soro dos pacientes. Para isso utilizamos a técnica de gel centrifugação (assim como no TAD, ou seja, Ac específicos promovem a aglutinação de hemácias sensibilizadas), onde o soro do pacientes foi testado

diretamente contra hemácias de triagem (DiaCell III, DiaMed Latino América, Brasil).

3.3. Seleção dos pacientes com Anemia Hemolítica Autoimune

Monócitos de pacientes com AHAI foram utilizados para determinarmos a possibilidade de haver alguma relação entre o nível de expressão gênica de SIRP α e SHP-1 e o desenvolvimento de doença hemolítica.

Amostras de sangue foram coletadas de 6 pacientes com AHAI a quente antes de corticoterapia (pré -GC) e 5 pacientes com AHAI a quente após corticoterapia (pós-GC), atendidos no Hemocentro da Universidade Estadual de Campinas. Dos 6 pacientes avaliados no grupo pré-GC, 3 foram também avaliados no grupo pós-GC. Os demais pacientes do grupo pré-GC não compareceram para nova coleta de sangue durante o tratamento. O diagnóstico de AHAI baseou-se em avaliação imunohematológica (descrita anteriormente) e os pacientes do grupo pré-GC incluídos em nosso estudo se encaixaram nos seguintes critérios, simultaneamente:

- TAD poliespecífico positivo;
- TAD monoespecífico positivo para IgG;
- Confirmação da presença de autoanticorpos séricos (pesquisa de autoanticorpos) e aderidos às hemácias (ensaio de eluição de autoanticorpos).

Com relação à caracterização imunohematológica, a presença de IgA confirmada através de TAD monoespecífico foi considerada critério de exclusão, enquanto a presença de complemento não foi utilizada como critério de inclusão

ou exclusão. Desta forma, procuramos estudar um grupo homogêneo, embora com n pequeno. A coleta das amostras dos pacientes pré-GC foi feita no momento do diagnóstico, antes de qualquer tratamento. Os pacientes com AHAi avaliados pós-GC obedeceram aos critérios de terem sido anteriormente diagnosticados com AHAi a quente, seguindo os mesmos parâmetros estabelecidos para os pacientes pré-GC estudados, e estarem sob corticoterapia (prednisona, 1 mg/kg/dia) há 3 meses ou mais.

Para a seleção dos pacientes com AHAi contamos com a colaboração das hematologistas Profa. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad e Dra. Maria de Lourdes Barjas-Castro. Dos 8 pacientes estudados, 6 eram mulheres e 2 eram homens, com idade entre 18 e 65 anos. Nenhum dos pacientes recebeu transfusão de sangue antes da coleta da amostra.

3.4. Separação e cultura de células

Monócitos de sangue periférico foram obtidos de doadores sadios e pacientes com AHAi. Células mononucleares foram separadas do sangue periférico por centrifugação em gradiente de densidade com Ficoll-Paque 1,077, e os monócitos foram isolados por adesão em placas de poliestireno durante 1 hora a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar. Células mielomonocíticas U937 foram utilizadas nos ensaios de cinética de expressão gênica de SIRP α e SHP-1, e de liberação da citocina IL-10, pois precisávamos de grande quantidade de células e optamos por utilizar células de linhagem. As células U937 foram obtidas da ATCC (American Type Culture Collection), e

mantidas a 5×10^5 células/ml em meio RPMI 1640 completo suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS) inativado pelo calor, penicilina G (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml) e L-glutamina (2mM), a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar. Monócitos de pacientes com AHA foram utilizados logo após a separação. Monócitos de doadores sadios e células U937 foram cultivados com dexametasona (Dexa: 1µM por 48 ou 72 horas), interferon-γ (IFN_γ - 100 U/ml) e fator de necrose tumoral α (TNF_α - 1000 U/ml, por 48 horas), prednisolona (Pred: 0,15mg/l ou 1mg/l por 72 horas) ou Hemina® (30 µM, por 6 horas), em meio RPMI 1640 completo suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS) inativado pelo calor, penicilina G (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml) e L-glutamina (2mM), a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar.

3.5. Reação de Polimerização em Cadeia - PCR

Para determinar os níveis de mRNA transcrito de SIRP_α e SHP-1 foi realizada a análise quantitativa relativa de expressão em tempo real (Real Time PCR). Essa metodologia é baseada no monitoramento da fluorescência emitida durante a reação de polimerização em cadeia (PCR) pela ligação de um corante ("SYBR Green") na fita recém sintetizada. O RNA foi extraído usando o Kit Trizol (Invitrogen, Catalog n° 15596-026) dos monócitos recém-isolados ou cultivados, e das células U937 de acordo com as instruções do fabricante. Reação de transcrição reversa foi realizada utilizando-se o Kit SuperScript II RT (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) e hexâmeros randômicos. Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foram desenhados utilizando-se o software Primer Express (Applied

Biosystems, Foster City, CA, USA) para se amplificar especificamente o cDNA do gene de interesse. As seqüências de *primers* foram SIRP α *forward* GCCAGCGGTCAGCAAAAG, SIRP α *reverse* TGTTCGGTTCATTAGATCCAGTGT, SHP-1 *forward* CGAGGTGTCCACGGTAGCTT, and SHP-1 *reverse* ATCCGAATATGGGTACCTGAT. A expressão gênica de β -actina, um gene de expressão constitutiva, foi usada como controle interno para determinarmos a quantidade e qualidade do cDNA. As reações foram feitas em um volume de 12 μ l de SYBR Green Master Mix PCR (Applied Biosystems), e realizadas em placa MicroAmp Optical de 96 poços (Applied Biosystems) usando o 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems). Para confirmar a especificidade e reprodutibilidade da reação de PCR em Tempo Real, a precisão intra-ensaio foi calculada de acordo com a equação $E=10^{(1-1/\text{slope})}$. Os transcritos analisados demonstraram razão de eficiência da reação de PCR acima de 99% para ambos os *primers* utilizados (correlação do coeficiente de Pearson $r>0,95$). Duas réplicas de cada amostra foram corridas na placa e a expressão dos genes estudados foi normalizada contra a expressão gênica de β -actina.

3.6. Western Blotting

Utilizamos a técnica de Western Blotting para fazer uma quantificação relativa das proteínas SIRP α e SHP-1 em monócitos cultivados em condições basais (grupo controle), com dexametasona, IFN γ /TNF α ou hemina. Esta técnica se baseia na detecção de proteínas específicas através da reação antígeno-anticorpo seguida da detecção do complexo por reação de precipitação. A proteína total foi extraída de monócitos cultivados usando tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,02% azida sódica, 100 μ g/ml PMSF, 1,0 μ g/ml aprotinina, 1%

Triton X-100). 20µg de cada amostra de proteína foram misturados a dois volumes de tampão SDS 3x (2% SDS, 5% glicerol, azul de bromofenol, 5% mercaptoetanol), fervidos por 5 minutos e separados por gel SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) 8% durante 90 minutos em 80V. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas em leite desnatado a 5% por 1 hora, lavadas com TBS/Tween 20 (0,05% TBS, 0,1% Tween 20), e incubadas com anticorpo (Ac) de coelho IgG anti-SIRPα (1:1000, Invitrogen) ou Ac de coelho IgG anti-SHP-1 (1:1000, Invitrogen) *overnight* a 4°C. O excesso de Ac primário foi removido lavando-se as membranas 4 vezes com tampão TBS-Tween 20. As membranas foram em seguida incubadas por 1 hora com o Ac secundário de cabra IgG anti-IgG de coelho conjugada com *horseradish peroxidase* (1:5000, Invitrogen). As membranas foram lavadas novamente por 4 vezes com TBS/Tween 20 e as bandas peroxidase-positivas foram detectadas usando o Kit Opti-4CN™ Substrate (Bio-Rad, Cat n° 170-8235). As mesmas membranas foram então incubadas com Ac de coelho IgG anti-β-actin (1:5000, Invitrogen) por 1 hora, e após a remoção do excesso de Ac primário por lavagem com TBS/Tween 20, foram novamente incubadas com o mesmo Ac secundário de cabra IgG anti-IgG de coelho conjugada com horseradish peroxidase por 1 hora. Após a nova detecção de bandas peroxidase-positivas, a expressão relativa de proteína foi calculada usando a β-actina como controle interno constitutivo.

3.7. Ensaio de eritrofagocitose

Este ensaio foi realizado a fim de determinarmos a atividade funcional de monócitos de indivíduos sadios cultivados expressando diferentes níveis de SIRP α . O ensaio de eritrofagocitose foi realizado se incubando eritrócitos autólogos Rh+ sensibilizados com anticorpo anti-D (1:30, Invitrogen) e complemento (utilizando-se o soro do próprio doador), com monócitos cultivados com dexametasona ou IFN γ /TNF α na proporção de dez eritrócitos para um monócito. A opsonização foi confirmada por TAD utilizando soros poli e monoespecíficos. Após 30 minutos de eritrofagocitose, os monócitos foram imobilizados em uma lâmina de vidro por centrifugação CytoSpin, e coloridos utilizando-se o corante Leishmann. A porcentagem de eritrofagocitose foi determinada por microscopia óptica e os resultados foram expressos como Eritrofagocitose Relativa (ER), considerando-se os resultados obtidos pelos monócitos cultivados em condições basais como 1,0. Para isso utilizamos a seguinte equação:

$$ER = \frac{\% \text{ EF tratamento (dexametasona ou IFN}\gamma\text{/TNF}\alpha\text{)}}{\% \text{ EF controle}}$$

% EF: porcentagem de eritrofagocitose determinada por microscopia.

3.8. ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbant Assay*)

Para a dosagem de IL-10 liberada por células U937 foram utilizados Kits comerciais (DuoSet, RD Systems, EUA). Os ensaios foram realizados em placas MultiSort (Nunc, Dinamarca) segundo os protocolos do fabricante. Resumidamente, as placas foram incubadas com anticorpos de captura e, após

bloqueio, submetidas à incubação com amostras e diluições do padrão recombinante do Kit. Em seguida, houve a incubação com anticorpos de detecção conjugados à biotina. A incubação seguinte ocorreu com uma solução de estreptavidina conjugada à peroxidase. A revelação da reação foi feita com peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina (TMB) e a parada ocorreu pela adição de H_2SO_4 2N. A leitura da intensidade da coloração foi realizada em 450nm. O limite de detecção de IL-10 foi de 46,9 pg/ml. Foi estabelecida uma curva padrão com gráfico de dispersão, no qual a variável X foi a densidade óptica obtida nas leituras, e Y foi a concentração da citocina IL-10. A equação da reta do gráfico foi obtida através de uma linha de tendência polinomial, que foi aceita somente quando r^2 foi maior que 0,95 no programa GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc, 2007). Todas as amostras e pontos da curva padrão foram feitos em duplicata. Os resultados foram expressos em pg/ml.

3.9. Análise estatística

Os dados foram representados como a média $\pm$ erro padrão da média (SEM). As comparações entre monócitos cultivados com dexametasona, $\text{IFN}\gamma/\text{TNF}\alpha$, ou hemina, e as mesmas células cultivadas em condições basais foram feitas utilizando-se o teste de Mann-Whitney (para dados não pareados) ou o teste pareado de Wilcoxon, conforme indicado. A expressão gênica de SIRP α e SHP-1 de doadores saudáveis foi comparada a pacientes com AHA através do teste de

Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. Os dados foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$ (90, 91).

4. RESULTADOS

4.1. Expressão gênica e protéica de SIRP α e SHP-1 em monócitos normais:

Em monócitos de doadores sadios, a cultura com dexametasona ou IFN γ e TNF α por 48 horas provocou um aumento significativo na expressão gênica de SIRP α (figura 5, painel A) e SHP-1 (figura 6, painel A) quando comparamos a monócitos cultivados em condições basais (grupo controle, formados por células cultivadas nas mesmas condições, mas na ausência de dexametasona, IFN γ e TNF α , prednisolona ou hemina. Paralelamente, IFN γ e TNF α aumentaram significativamente a expressão da proteína SIRP α em monócitos de doadores sadios (figura 5, painel B), mas não alteraram a expressão da proteína SHP-1 (figura 6, painel B). Já dexametasona, quando usada por 48 horas reduziu significativamente a expressão da proteína SIRP α (figura 5, painel B). Ao aumentarmos o tempo de cultura com dexametasona para 72 horas observamos um discreto aumento na expressão da proteína SIRP α , que passou a ter o mesmo nível de expressão que as células cultivadas em condições basais (figura 5, painel C). Além disso, a cultura com dexametasona não alterou a expressão da proteína SHP-1 (figura 6, painel B).

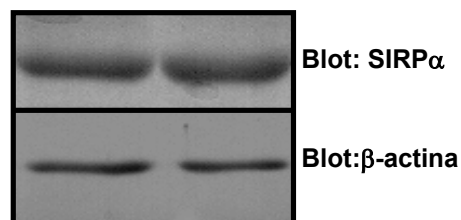
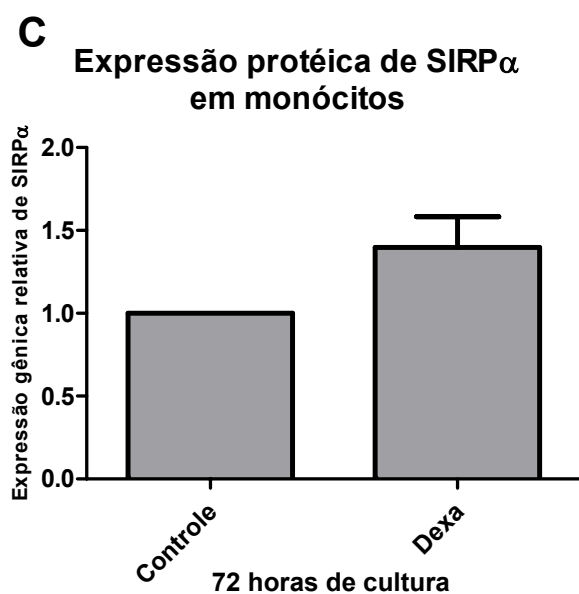
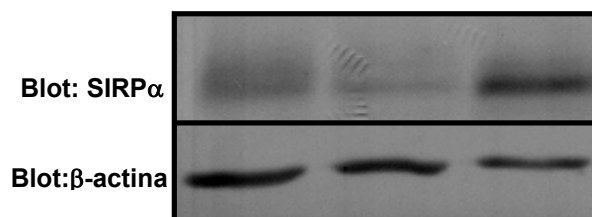
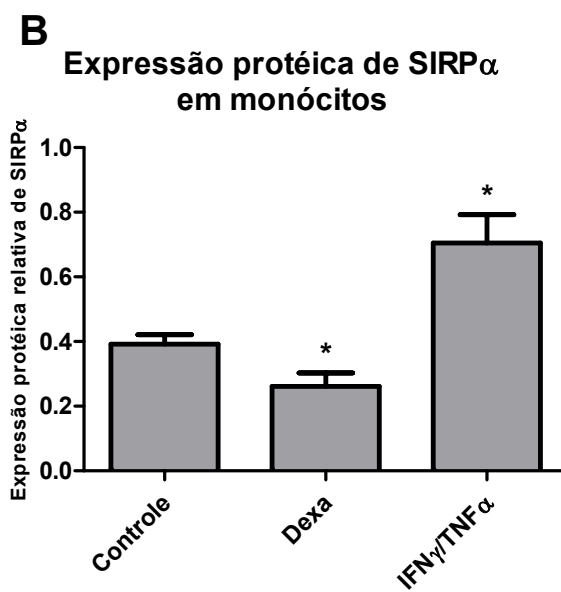
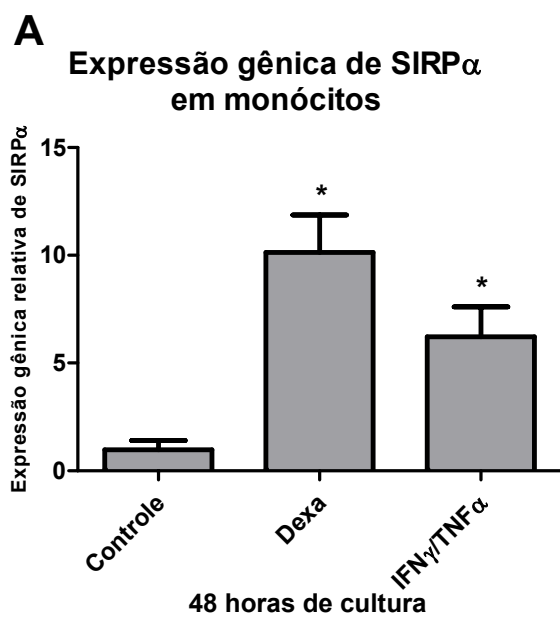


Figura 5: Expressão gênica e protéica de SIRP α em monócitos normais cultivados com dexametasona ou IFN γ e TNF α . **Painel A:** Expressão gênica relativa de SIRP α em monócitos de doadores saudáveis cultivados com dexametasona (1 μ M) ou IFN γ (100U/ml) e TNF α (1000U/ml) durante 48 horas. Em monócitos de sangue periférico, tanto dexametasona quanto IFN γ /TNF α promoveram aumento significativo na expressão gênica de SIRP α após 48 horas de cultura, em comparação às mesmas células cultivadas em condições basais (n=4) (dexametasona: p=0,0286, n=4; IFN γ /TNF α : p=0,0286, n=4, Teste de Mann-Whitney). **Painel B:** Expressão da proteína SIRP α em monócitos de doadores saudáveis cultivados com dexametasona (1 μ M) ou IFN γ (100U/ml) e TNF α (1000U/ml) durante 48 horas. IFN γ /TNF α aumentaram a expressão da proteína SIRP α em monócitos, em comparação às mesmas células cultivadas em condições basais (n=10) (IFN γ /TNF α : p=0,0098, n=10, Teste de Wilcoxon). Neste tempo de cultura, monócitos cultivados com dexametasona apresentaram menor expressão da proteína SIRP α que monócitos cultivados em condições basais (dexametasona: p=0,0059, n=10, Teste de Wilcoxon). **Painel C:** Expressão da proteína SIRP α em monócitos de doadores saudáveis cultivados com dexametasona (1 μ M) durante 72 horas. Monócitos cultivados com dexametasona por 72 horas apresentaram o mesmo nível de expressão da proteína SIRP α que células cultivadas em condições basais (dexametasona: p=0,0938, n=6, Teste de Wilcoxon).

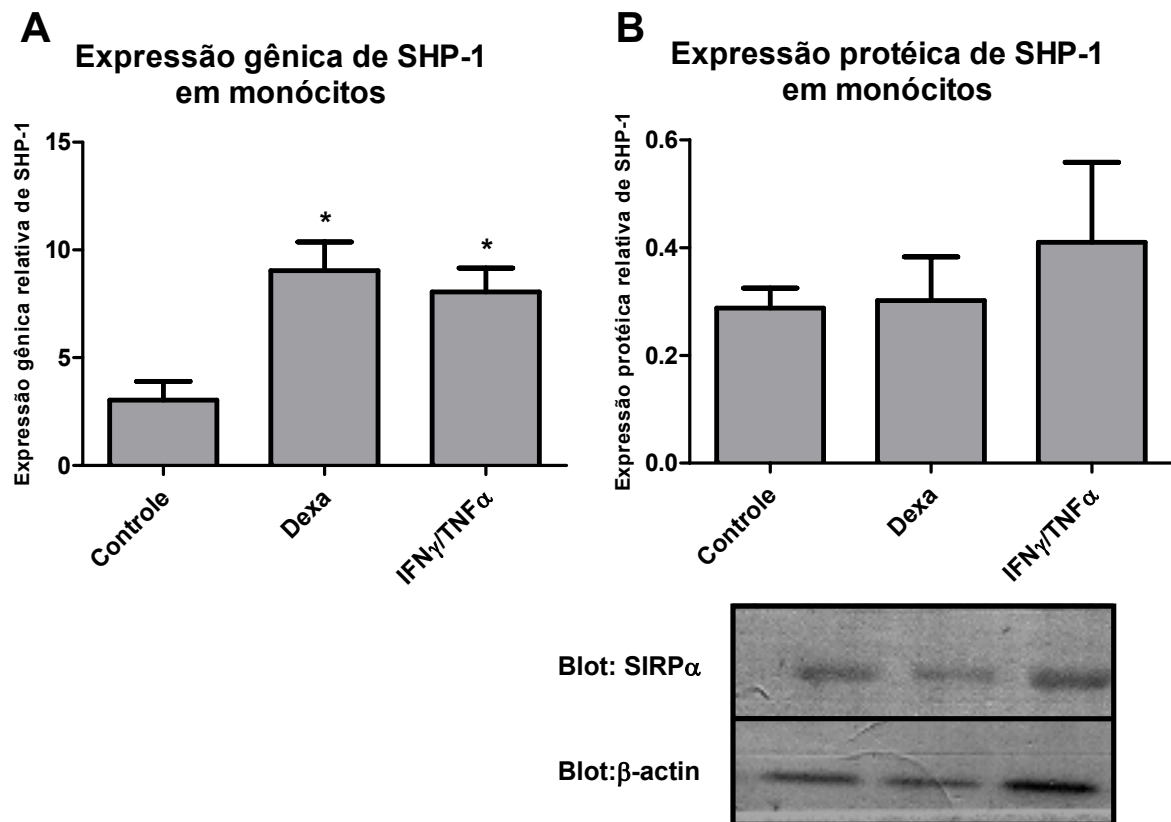


Figura 6: Expressão gênica e protéica de SHP-1 em monócitos normais cultivados com dexametasona ou IFN γ e TNF α . **Painel A:** Expressão gênica relativa de SHP-1 em monócitos de doadores saudáveis cultivados com dexametasona (1 μ M) ou IFN γ (100U/ml) e TNF α (1000U/ml) durante 48 horas. Em monócitos, tanto dexametasona quanto IFN γ /TNF α promoveram aumento significativo na expressão gênica de SHP-1 após 48 horas de cultura, em comparação às mesmas células cultivadas em condições basais (n=5) (dexametasona: p=0,0159, n=5; IFN γ /TNF α : p=0,0357, n=4, Teste de Mann-Whitney). **Painel B:** Expressão da proteína SHP-1 em monócitos de doadores saudáveis cultivados com dexametasona (1 μ M) ou IFN γ (100U/ml) e TNF α (1000U/ml) durante 48 horas. A expressão da proteína SHP-1 em monócitos não é alterada pela cultura com dexametasona ou IFN γ /TNF α , quando comparamos com as mesmas

células cultivadas em condições basais (n=5) (dexametasona: $p=0,08125$; $\text{IFN}\gamma/\text{TNF}\alpha$: $p=0,6250$, n=5, Teste de Wilcoxon).

4.2. Ensaio de eritrofagocitose:

Em paralelo ao aumento da expressão gênica e protéica de SIRP α , a cultura com IFN γ e TNF α reduz significativamente a fagocitose de eritrócitos por monócitos de indivíduos saudáveis. Dexametasona, que não alterou a expressão das proteínas SIRP α ou SHP-1, não alterou também a fagocitose de eritrócitos por monócitos de indivíduos saudáveis (figura 7).

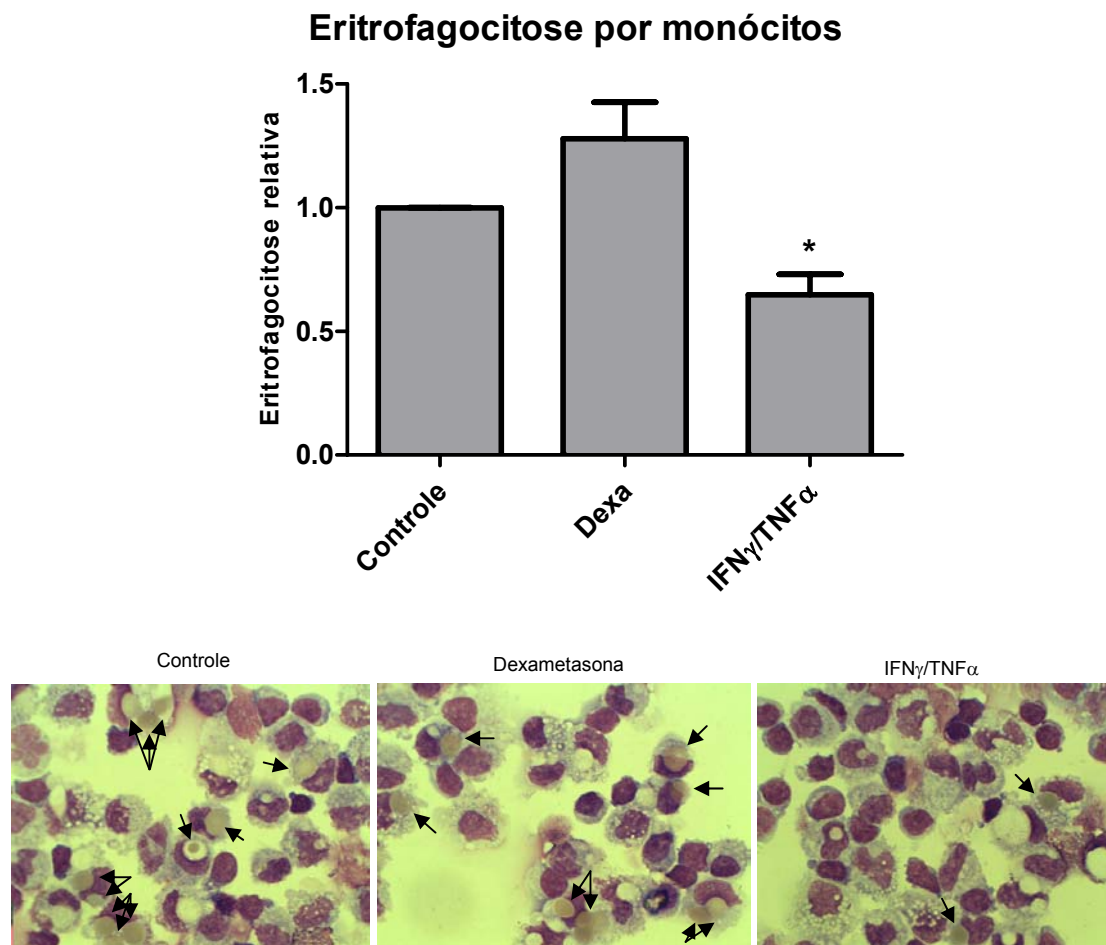


Figura 7: Ensaio de eritrofagocitose por monócitos normais normais cultivados com dexametasona ou IFN γ e TNF α . Eritrofagocitose por monócitos de doadores saudáveis cultivados com dexametasona (1 μ M) e/ou IFN γ (100U/ml) e TNF α (1000U/ml) durante 72 e 48 horas, respectivamente. Monócitos cultivados com IFN γ /TNF α por 48 horas apresentaram menor capacidade de fagocitar eritrócitos opsonizados que células cultivadas em condições basais (n=4) (IFN γ /TNF α : p=0,0265, n=4, Teste de Mann-Whitney). Em contrapartida, a cultura de monócitos com dexametasona não alterou sua capacidade de eritrofagocitose, em comparação também às células cultivadas em condições basais (dexametasona: p=0,3005, n=4, Teste de Mann-Whitney).

4.3. Caracterização imunohematológica e índices hematimétricos dos pacientes com AHAI:

Os pacientes com AHAI que participaram do estudo foram submetidos a testes laboratoriais para a detecção de auto anticorpos no soro e ligados às hemácias. Todos os pacientes avaliados antes de corticoterapia apresentaram TAD positivo com soro poliespecífico, assim como TAD positivo com soros monoespecíficos que confirmaram a presença de níveis elevados de IgG, IgM e C3d. Ensaio de eluição de anticorpos das hemácias e pesquisa de auto anticorpos também apresentaram resultado positivo nos pacientes estudados (quadro 2). Além disso, os pacientes portadores de AHAI estudados antes de corticoterapia apresentaram redução significativa de Hb/Ht, associada a aumento de reticulócitos (quadro 3).

Os pacientes com AHAI estudados após corticoterapia apresentaram TAD positivo quando utilizado soro poliespecífico, sendo que o TAD com soros monoespecíficos indicou a presença apenas de IgG. Além disso, a maioria dos pacientes apresentou resultados positivos para os ensaios de eluição de anticorpos das hemácias e pesquisa de auto anticorpos (quadro 2). Em contrapartida, pacientes com AHAI após corticoterapia apresentam níveis normais de Hb/Ht e de reticulócitos (quadro 3).

Quadro 2: Caracterização imunohematológica dos pacientes com AHAI avaliados no estudo:

Pacientes com AHAI apresentaram TAD positivo, indicando a presença de IgG, IgM e C3d. Nos pacientes pós-GC estudados, IgM e C3d não foram detectados, enquanto IgG se encontrou presente na membrana dos eritrócitos e no soro. TAD: Teste da Antiglobulina Direto; CRTL: Controle Autólogo. Positivo (+); Indetectável (-); Não determinado (ND).

Pacientes antes de terapia com GC	TAD Soro poliespecífico	TAD Soros monoespecíficos						Eluição de Anticorpos	Pesquisa de auto-anticorpos
		IgG	IgM	IgA	C3	C3d	CRTL		
TFL	+	+	+	-	-	+	-	+	+
IAPM	+	+	+	-	-	+	-	+	+
MLS	+	+	+	-	-	+	-	+	+
CPC	+	+	+	-	-	+	-	+	+
JMM	+	+	+	-	-	+	-	+	+
MLP	+	+	+	-	-	+	-	+	+
Pacientes após terapia com GC	TAD Soro poliespecífico	TAD Soros monoespecíficos						Eluição de Anticorpos	Pesquisa de auto-anticorpos
		IgG	IgM	IgA	C3	C3d	CRTL		
HSC	+	+	-	-	-	-	-	-	ND
MLP	+	+	-	-	-	-	-	+	+
MLS	+	+	-	-	-	-	-	+	+
CPC	+	+	-	-	-	-	-	ND	ND
MFS	+	+	-	-	-	-	-	+	+

Quadro 3: Índices hematimétricos dos pacientes com AHAI pré e pós-Gc estudados: Pacientes com AHAI pré-GC apresentaram reticulocitose e baixos níveis de hemoglobina. Os pacientes do grupo pós-GC apresentaram Hb/Ht e reticulócitos normais. Hb: hemoglobina; Ht: hematócrito; H: homem; M: mulher.

Pacientes antes de terapia com GC	Hb / Ht (g/dl / %)	Reticulócitos (% / $\times 10^9/l$)
TFL	4.4 / 13.1	2.08 / 93.5
IAPM	4.3 / 11.6	0.23 / 3.5
MLS	6.0 / 20.5	22.57 / 416.3
CPC	7.4 / 21.8	15.31 / 403.4
JMM	6.8 / 21.1	18.29 / 373.8
MLP	4.5 / 12.3	18.68 / 389.2
Pacientes após terapia com GC	Hb / Ht (g/dl / %)	Reticulócitos (% / $\times 10^9/l$)
HSC	10.5 / 30.9	0.71 / 23.3
MLP	14.9 / 43.5	1.28 / 65.2
MLS	11.9 / 34.1	2.85 / 107.5
CPC	12.0 / 34.3	0.83 / 40.9
MFS	11.5 / 32.9	3.61 / 122.3

Valores de referência	Hb (g/dl)	Ht (%)	Reticulócitos (%)	Reticulócitos ($\times 10^9/l$)
	H=15.5+/-2,5 M=14.0+/-2,5	H=47+/-7 M=42+/-5	0.5-2.5	22-139

4.4. Expressão gênica de SIRP α e SHP-1 em pacientes com AHAI:

Monócitos de pacientes com AHAI antes de corticoterapia apresentaram expressão gênica de SIRP α (figura 8) e SHP-1 (figura 9) aumentadas em comparação a monócitos normais. Após corticoterapia, monócitos de pacientes com AHAI expressaram o mesmo nível de mRNA de SIRP α e SHP-1 que monócitos normais.

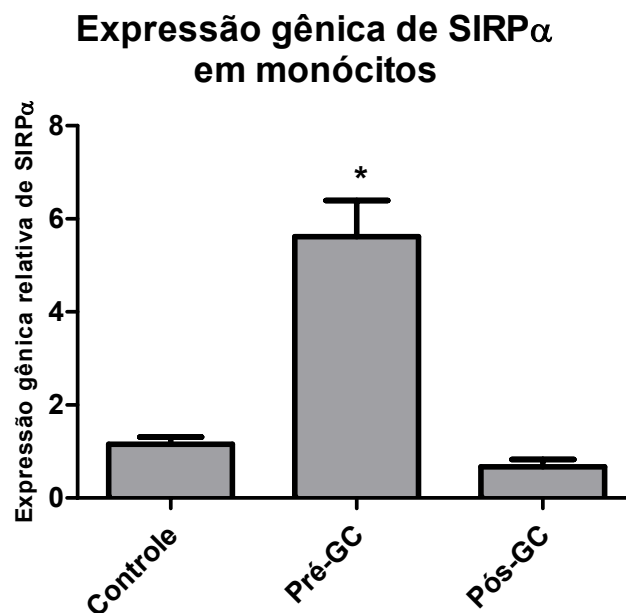


Figura 8: Expressão gênica relativa de SIRP α em monócitos de doadores sadios (controle, n=14), e em monócitos de pacientes com AHAI antes (pré-GC, n=6) e após (pós-GC, n=5) corticoterapia. Monócitos de pacientes com AHAI pré-GC apresentaram expressão gênica de SIRP α significativamente maior que monócitos de doadores sadios e que monócitos de pacientes com AHAI pós-GC ($p=0,0007$, Teste de Kruskal-Wallis; controle versus pré-GC: $p<0,05$; pré-GC versus pós-GC: $p<0,05$, pós-teste de Dunn). Monócitos de pacientes com AHAI pós-GC apresentaram o mesmo nível de expressão gênica de SIRP α que monócitos de doadores sadios (controle versus pós-GC: $p>0,05$, pós-teste de Dunn).

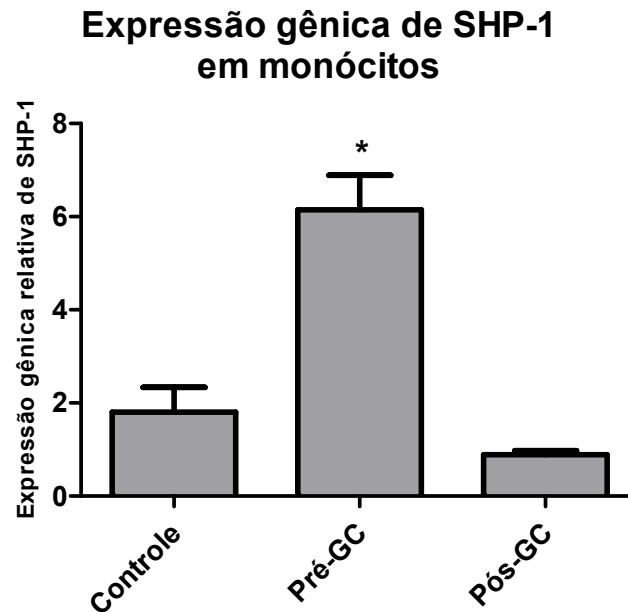


Figura 9: Expressão gênica relativa de SHP-1 em monócitos de doadores sadios (controle, n=11), e em monócitos de pacientes com AHAI antes (pré-GC, n=6) e depois (pós-GC, n=5) de corticoterapia. Monócitos de pacientes com AHAI pré-GC apresentaram expressão gênica de SHP-1 significativamente maior que monócitos de doadores sadios e que monócitos de pacientes com AHAI pós-GC ($p=0,004$, Teste de Kruskal-Wallis; controle versus pré-GC: $p<0,05$; pré-GC versus pós-GC: $p<0,05$, pós-teste de Dunn). Monócitos de pacientes com AHAI pós-GC apresentaram o mesmo nível de expressão gênica de SHP-1 que monócitos de doadores sadios (controle versus pós-GC: $p>0,05$, pós-teste de Dunn).

4.5. Expressão gênica de SIRP α e SHP-1 em monócitos normais cultivados com prednisolona:

Como mostrado anteriormente, dexametasona promoveu um aumento significativo na expressão gênica de SIRP α e SHP-1 em monócitos de doadores saudáveis *in vitro*. *In vivo*, monócitos de pacientes tratados com prednisona apresentaram expressão gênica de SIRP α e SHP-1 significativamente menor que pacientes com AHA antes de corticoterapia. Para esclarecer se o efeito da prednisona *in vitro* seria diferente do observado com dexametasona sobre a expressão gênica de SIRP α e SHP-1, determinamos a expressão destes genes em monócitos de doadores saudáveis cultivados com prednisolona (o metabólito ativo da prednisona). Nossos resultados mostraram que a prednisolona, tanto em baixa dose (0,15mg/l) quanto em dose aplicada em pulsoterapia (1,0mg/l) aumenta significativamente a expressão gênica de SIRP α (figura 10, painel A) e SHP-1 (figura 10, painel B) em monócitos cultivados por 72 horas.

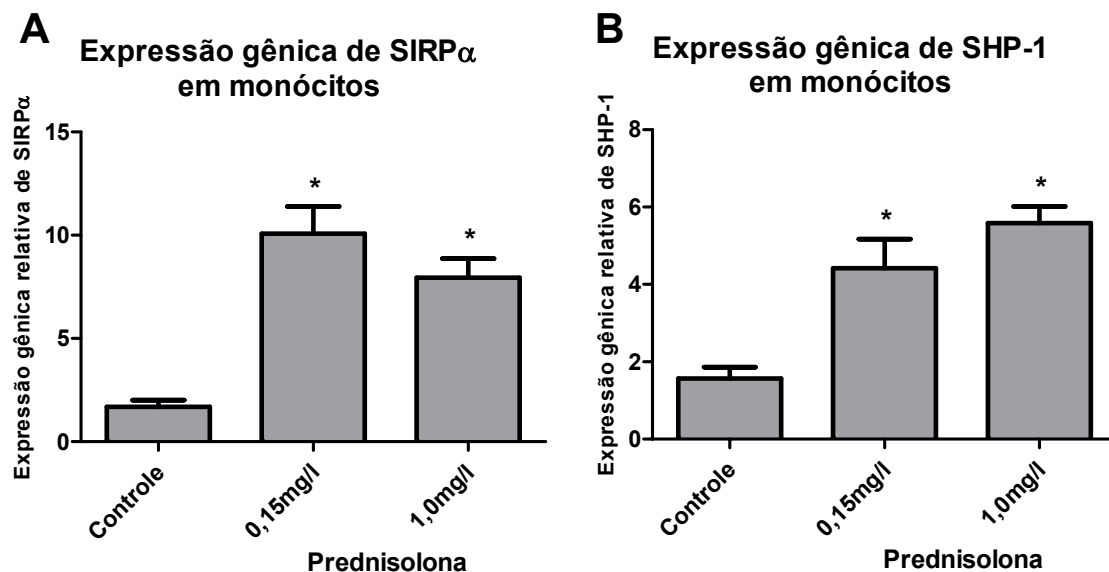
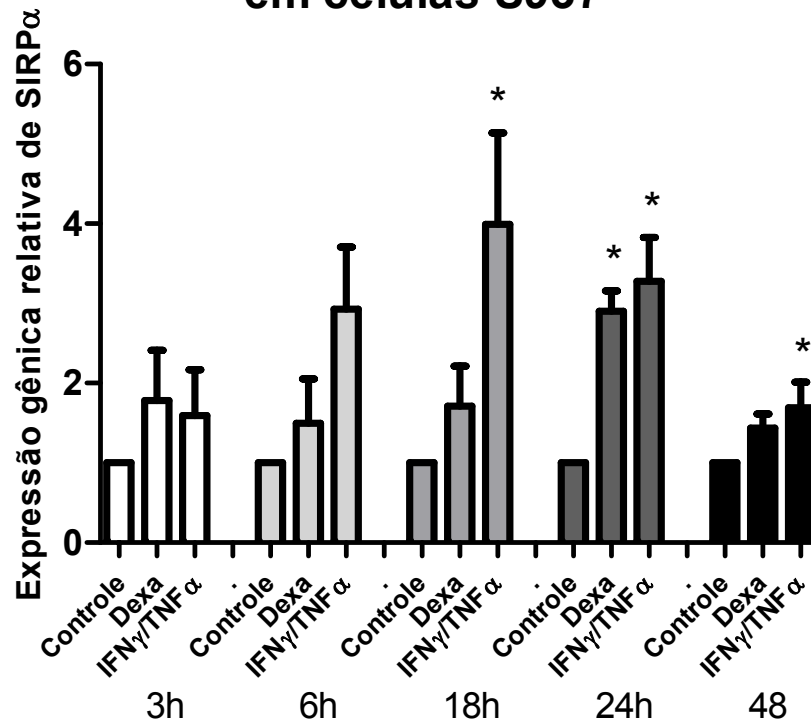


Figura 10: Expressão gênica de SIRP α e SHP-1 em monócitos normais cultivados com prednisolona. **Painel A:** Expressão gênica relativa de SIRP α em monócitos de doadores sadios cultivados com prednisolona (0,15 e 1,0mg/l) durante 72 horas. Em monócitos de doadores sadios, tanto a dose de 0,15mg/l quanto a de 1,0mg/l promoveram aumento significativo na expressão gênica de SIRP α após 72 horas de cultura, em comparação às mesmas células cultivadas em condições basais (n=4) (p=0,0286, n=4, Teste de Mann-Whitney). **Painel B:** Expressão gênica relativa de SHP-1 em monócitos de doadores sadios cultivados com prednisolona (0,15 e 1,0mg/l) durante 72 horas. Em monócitos de doadores sadios, tanto a dose de 0,15mg/l quanto a de 1,0mg/l promoveram aumento significativo na expressão gênica de SHP-1 após 72 horas de cultura, em comparação às mesmas células cultivadas em condições basais (n=4) (p=0,0286, n=4, Teste de Mann-Whitney).

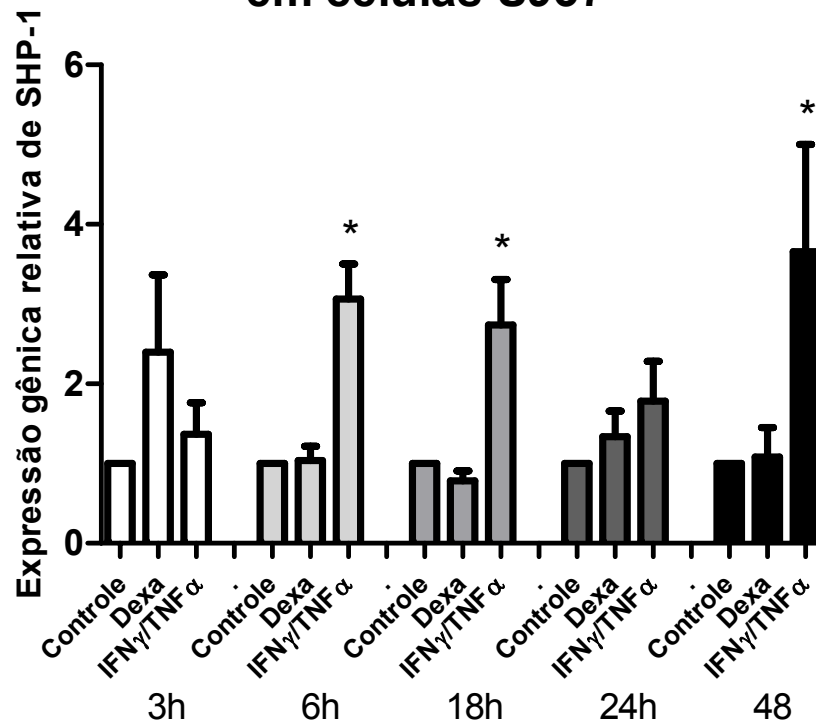
4.6. Cinética de liberação de IL-10 versus cinética de expressão gênica de SIRP α e SHP-1 em células U937:

Comparando a cinética de liberação de IL-10 (figura 11, painel C) e de expressão gênica de SIRP α (figura 11, painel A) e SHP-1 (figura 11, painel B) em células mielomonocíticas U937 cultivadas com dexametasona ou IFN γ e TNF α por 3, 6, 18, 24 e 48 horas, observamos que não há relação direta ou inversa entre a expressão gênica de SIRP α ou SHP-1 e a liberação de IL-10 por células U937.

A Expressão gênica de SIRP α
em células U937



B Expressão gênica de SHP-1
em células U937



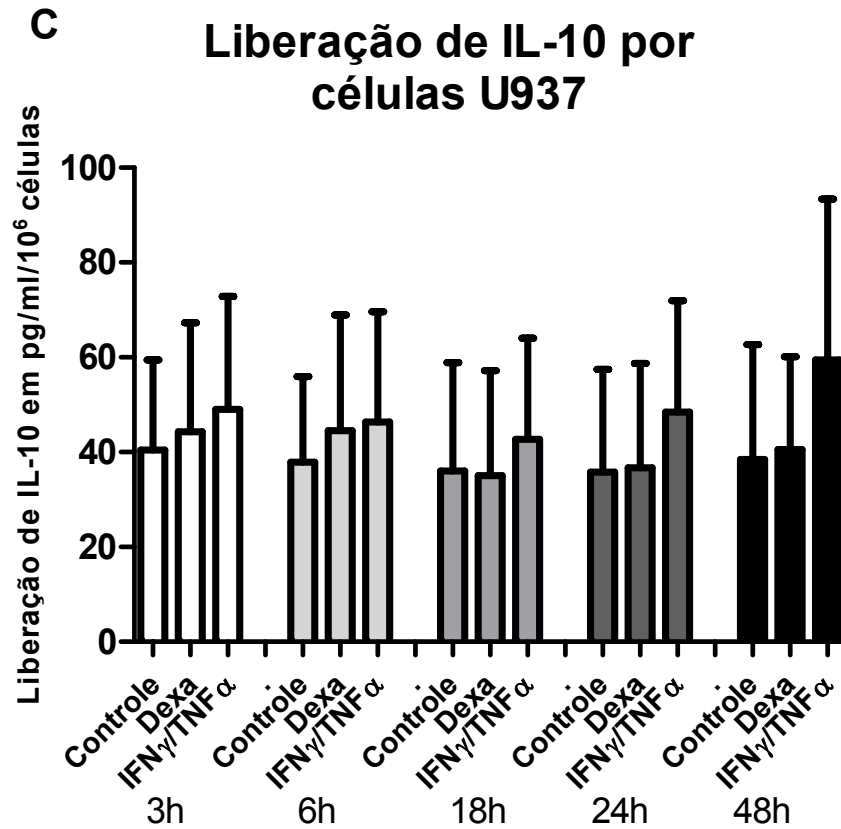


Figura 11: Cinética de expressão gênica relativa de SIRP α e SHP-1, e de liberação de IL-10 por células mielomonocíticas U937 (n=4).

Painel A: Cinética de expressão gênica relativa de SIRP α em células U937 cultivadas com dexametasona (1 μ M) ou IFN γ (100U/ml) e TNF α (1000U/ml) durante 3, 6, 18, 24 e 48 horas (n=4). A expressão gênica de SIRP α em células U937 é significativamente aumentada pela cultura com dexametasona por 24 horas, enquanto IFN γ /TNF α aumentam a expressão deste gene em culturas de 18, 24 e 48 horas, em comparação às mesmas células cultivadas em condições basais (Controle versus dexametasona: 3 horas, p=0,8824; 6 horas, p=0,8824; 18 horas, p=0,3005; 24 horas, p=0,0265; 48 horas, p=0,3005. Controle versus IFN γ /TNF α :

3 horas, $p=0,3005$; 6 horas, $p=0,3005$; 18 horas, $p=0,0265$; 24 horas, $p=0,0265$; 48 horas, $p=0,0265$, Teste de Mann-Whitney).

Painel B: Cinética de expressão gênica relativa de SHP-1 em células U937 cultivadas com dexametasona ($1\mu\text{M}$) ou $\text{IFN}\gamma$ (100U/ml) e $\text{TNF}\alpha$ (1000U/ml) durante 3, 6, 18, 24 e 48 horas ($n=4$). A cultura de células U937 com $\text{IFN}\gamma/\text{TNF}\alpha$ promove aumento significativo na expressão gênica de SHP-1 nos períodos de 6, 18 e 48 horas, enquanto a dexametasona não altera a expressão deste gene nos tempos de cultura indicados, em comparação às mesmas células cultivadas em condições basais (Controle versus dexametasona: 3 horas, $p=0,8824$; 6 horas, $p=0,8824$; 18 horas, $p=0,3005$; 24 horas, $p=0,8824$; 48 horas, $p=0,8824$. Controle versus $\text{IFN}\gamma/\text{TNF}\alpha$: 3 horas, $p=0,3005$; 6 horas, $p=0,0265$; 18 horas, $p=0,0265$; 24 horas, $p=0,3005$; 48 horas, $p=0,0265$, Teste de Mann-Whitney).

Painel C: Cinética de liberação de IL-10 por células U937 cultivadas com dexametasona ($1\mu\text{M}$) ou $\text{IFN}\gamma$ (100U/ml) e $\text{TNF}\alpha$ (1000U/ml) durante 3, 6, 18, 24 e 48 horas ($n=4$). A liberação de IL-10 por células U937 não é alterada pela cultura com dexametasona ou $\text{IFN}\gamma/\text{TNF}\alpha$ nos períodos de tempo indicados, em comparação às mesmas células cultivadas em condições basais (Controle versus dexametasona: 3 horas, $p=0,6250$; 6 horas, $p=0,6250$; 18 horas, $p=0,3750$; 24 horas, $p=0,8750$; 48 horas, $p=0,8000$. Controle versus $\text{IFN}\gamma/\text{TNF}\alpha$: 3 horas, $p=0,3750$; 6 horas, $p=0,3750$; 18 horas, $p=0,6250$; 24 horas, $p=0,1250$; 48 horas, $p=0,1250$, Teste de Mann-Whitney).

4.7. Expressão gênica de SIRP α e SHP-1 e expressão da proteína SIRP α em monócitos normais cultivados com hemina:

A fim de determinar se o aumento na concentração de heme durante a hemólise em pacientes com AHAI teria papel no aumento da expressão gênica de SIRP α e SHP-1 observada neste trabalho, realizamos um ensaio de cinética de expressão gênica de SIRP α por monócitos cultivados por diferentes períodos de tempo com diferentes concentrações de hemina. Os resultados mostraram que há um aumento significativo na expressão deste gene apenas quando monócitos são cultivados por apenas 6 horas na presença de 30 μ M de hemina (figura 12, painel A). A expressão gênica de SHP-1, estudada nos mesmo tempos de cultura e concentrações de hemina, não sofreu alteração significativa (figura 13). Além disso, o aumento da expressão gênica de SIRP α não se refletiu em aumento da expressão da proteína SIRP α (figura 12, painel B).

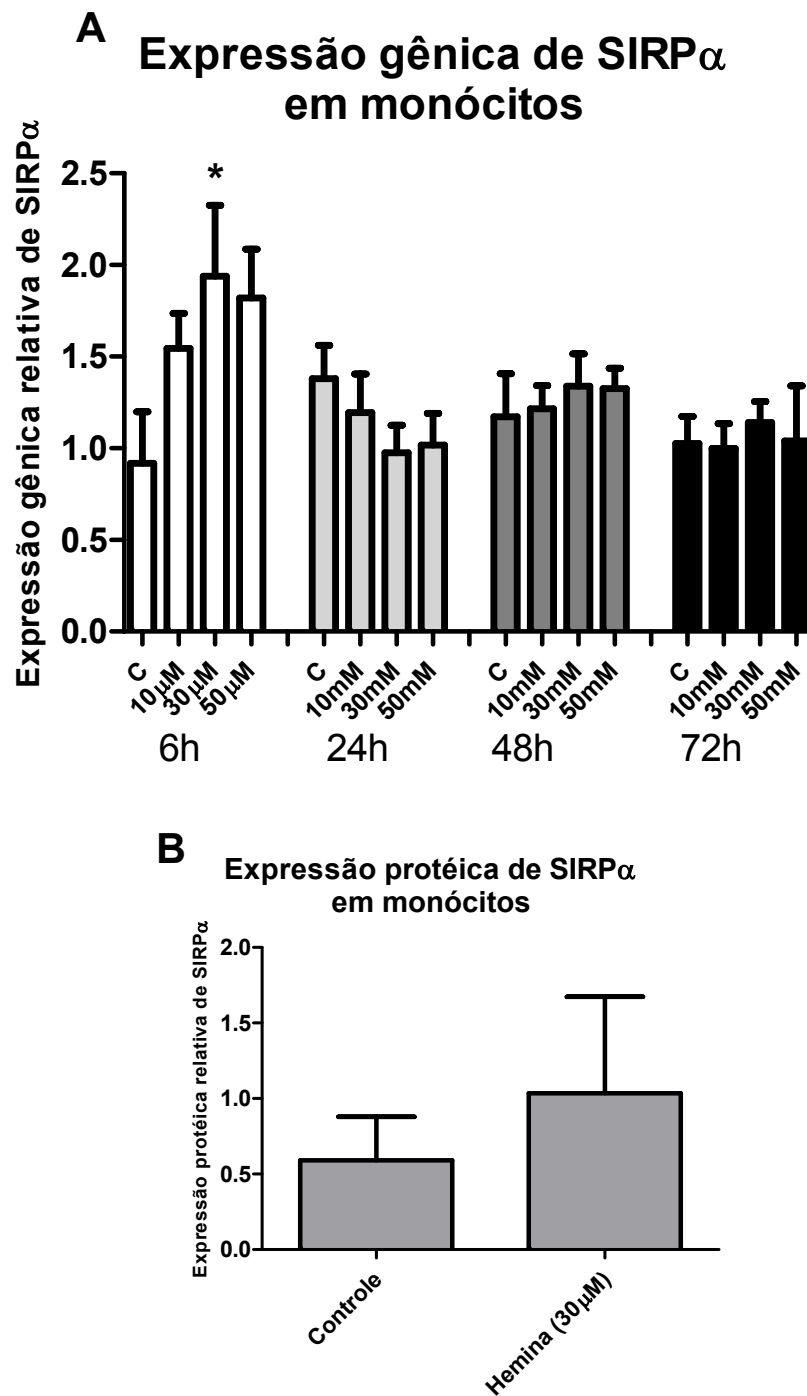


Figura 12: Expressão gênica e protéica de SIRP α em monócitos cultivados com hemina®. **Painel**

A: Expressão gênica de SIRP α em monócitos cultivados por diferentes períodos de tempo (6, 24, 48 ou 72 horas, n=5) com 10, 30 ou 50 μM de hemina®. Em seis horas de cultura observamos um aumento significativo na expressão gênica de SIRP α em

monócitos cultivados com 30 μ M de hemina ($p=0,0317$, Teste de Mann-Whitney). Nos demais tempos de cultura e concentrações de hemina não observamos alteração significativa na expressão gênica de SIRP α ($p>0,05$, Teste de Mann-Whitney). **Painel B:** Expressão protéica de SIRP α em monócitos cultivados por 6 horas com 30 μ M de hemina®. Em comparação às células cultivadas em condições basais, hemina não alterou significativamente o nível de expressão da proteína SIRP α ($p=0,2500$, $n=6$, Teste de Wilcoxon).

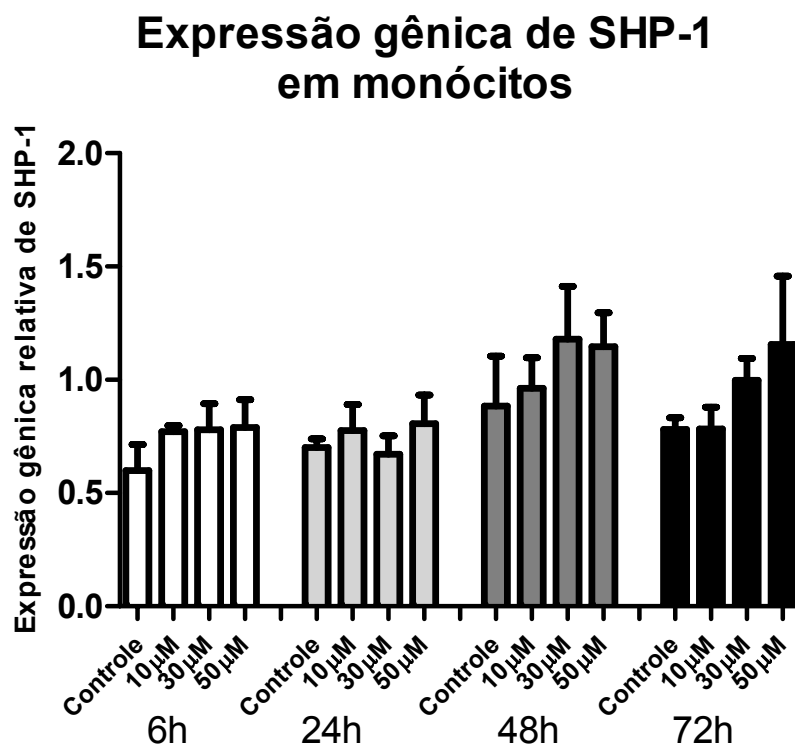


Figura 13: Expressão gênica de SHP-1 em monócitos cultivados por diferentes períodos de tempo (6, 24, 48 ou 72 horas, n=5) com 10, 30 ou 50μM de hemina®. Não observamos alteração significativa no nível de expressão gênica de SHP-1 em monócito cultivados com hemina em nenhum dos tempos de cultura ou concentrações de hemina, em comparação às células cultivadas em condições basais ($p>0,05$, Teste de Mann-Whitney).

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

No sistema imune, o equilíbrio entre ativação e inibição é necessário para iniciar, amplificar, e então controlar respostas imunológicas (92). A sinalização dos imuno-receptores é controlada por mecanismos complexos e rigidamente regulados que envolvem receptores, proteínas tirosina quinases, proteínas tirosina fosfatases, fosfatases lipídicas, ligases ubiquitina, e moléculas adaptadoras inibidoras e ativadoras. O equilíbrio entre ativação e inibição é necessário para modular as respostas imunes, e a maquinaria de inibição é crucial para a manutenção da homeostase das células do sistema imune (20). Desta forma são controladas numerosas respostas celulares, desde autoimunidade, alergia, fagocitose de eritrócitos, doença do enxerto versus hospedeiro, e até a neuroplasticidade (93).

SIRP α é um receptor fundamental para a inibição dos sinais pró-fagocíticos dos receptores Fc e de complemento (14, 29), sendo que a fosfatase SHP-1 desempenha papel fundamental nesta sinalização. Embora a importância da sinalização negativa na resposta imune seja incontestável, pouco se sabe sobre a regulação da expressão de SIRP α e SHP-1 em estado normal ou patológico, assim como sobre sua regulação farmacológica.

Este trabalho investigou a regulação farmacológica de SIRP α e SHP-1 em monócitos de doadores sadios e células mielomonocíticas U937 cultivados com dexametasona, IFN γ /TNF α , prednisolona e hemina, e avaliou o nível de expressão destes genes em pacientes com AHAI antes e após corticoterapia.

5.1. Glicocorticóide

GCs são potentes e efetivos agente anti-inflamatórios e imunossupressores (94, 95) que afetam, até certo ponto, todas células envolvidas na resposta inflamatória. Macrófagos/monócitos são células particularmente sensíveis, e os GCs suprimem a liberação *in vivo* e *in vitro* da maioria dos mediadores inflamatórios conhecidos de macrófagos/monócitos, incluindo $\text{TNF}\alpha$, IL-12, NO, IL-1 β e MIP-1 α , enquanto aumenta a produção de mediadores anti-inflamatórios como IL-10 (94, 95).

A fim de estudarmos o efeito direto do GC sobre a expressão das proteínas inibidoras SIRP α e SHP-1 em monócitos de doadores sadios, cultivamos essas células com dexametasona em concentração equivalente a um pulso de alta dose, uma das formas de se tratar a AHA1 (o equivalente a um pulso de 0,4 mg/kg) (80). Nossos resultados mostraram que a dexta promove um aumento significativo na expressão gênica de SIRP α e SHP-1, mas este efeito não se reflete em aumento da expressão protéica. Pelo contrário, a expressão da proteína SIRP α em monócitos de doadores sadios cultivados com dexta por 48 horas é significativamente menor em comparação a monócitos de doadores sadios cultivados em condições basais. Quando prolongamos o tempo de cultura para 72 horas, observamos um ligeiro aumento na expressão de SIRP α , mas ainda assim esta não é maior que a observada em células controle. Paralelamente, não observamos alteração na capacidade eritrofagocítica de monócitos de doadores sadios cultivados com dexta, quando comparamos aos monócitos de doadores

sadios cultivados em condições basais. Em conjunto, nossos resultados sugerem que a regulação da expressão de SIRP α e SHP-1 não faz parte do mecanismo dos GC de inibição da eritrofagocitose *in vivo*, e sugerem ainda que o efeito da dexametasona em si sobre monócitos não é suficiente para a redução da eritrofagocitose.

In vivo, em paralelo à redução da expressão gênica de SIRP α e SHP-1 observada em pacientes com AHAI, a administração de GC resulta na remissão da hemólise (70). Neste contexto, alguns autores mostraram que hidrocortisona e prednisolona inibem a eritrofagocitose de neutrófilos e macrófagos/monócitos *in vitro* quando utilizadas em altas concentrações, enquanto *in vivo* baixas doses destas drogas inibem significativamente a eritrofagocitose (96, 97). Em nossos experimentos, utilizamos a dexametasona, um GC altamente potente e de efeito prolongado, frequentemente utilizado no gerenciamento de doenças agudas. Dexametasona apresenta atividade glicocorticóide 30 vezes maior que a hidrocortisona e seis vezes maior que a prednisolona (98) e, mesmo utilizada em alta concentração, não observamos qualquer alteração na capacidade de eritrofagocitose em monócitos *in vitro*.

A concentração e o *timing* dos GCs são fatores importantes na determinação de seus efeitos sobre os parâmetros imunológicos (99). Em células microglias e fibroblastos, altas concentrações de GCs aumentam os efeitos antimicrobianos de IFN γ devido a um aumento da atividade da IDO (a enzima que degrada triptofano, indoleamina 2,3-dioxigenase), enquanto baixas concentrações de esteróides não influenciam os efeitos antimicrobianos mediados por IFN γ (100).

Em culturas de células hipocâmpais, enquanto baixas doses de GCs inibem a expressão de IL-1 β e TNF α induzida por excitotoxina, a exposição aguda a altas concentrações de GCs não apresentam este efeito anti-inflamatório. Além disso, a exposição prolongada a altas concentrações de GCs aumenta a expressão destas citocinas, passando a ser então pró-inflamatória (101). Em células epiteliais das vias aéreas, GCs promovem um aumento na expressão de proteínas do complemento, como C3, fator B e fator H induzido pela ativação de TLR, um efeito que pode impulsionar a resposta imune inata em pacientes tratados com GC (102).

Nossos resultados mostraram que a dexametasona, um potente GC, não altera a fagocitose de eritrócitos autólogos opsonizados *in vitro*, assim como não altera a expressão das proteínas SIRP α e SHP-1 em monócitos de doadores saudáveis. Nossos resultados indicam que o efeito terapêutico de inibição da eritrofagocitose observado pela GC-terapia *in vivo* não se deve a uma ação direta desta droga sobre monócitos/macrófagos. Sugerimos ainda que o efeito dos GCs *in vivo* envolva um mecanismo anti-inflamatório sistêmico e cooperativo dos GCs *in vivo*, no qual uma rede de eventos transcricionais e não-transcricionais deva ser crucial para a inibição da eritrofagocitose observada em pacientes com AHA1 após GC-terapia.

5.2. Interferon- γ e Fator de Necrose Tumoral- α

IFN γ e TNF α ativam fagócitos sinergicamente, induzindo essas células a produzirem espécies reativas intermediárias do nitrogênio (RNIs), espécies

reativas do oxigênio (EROs), fatores de estimulação de colônia (CSFs), IL-12, metabólitos do ácido aracdônico, e outros mediadores pró-inflamatórios (6, 103-109). Além disso, a sinergia entre $\text{IFN}\gamma$ e $\text{TNF}\alpha$ também está envolvida na regulação de mecanismos apoptóticos e necróticos em diversos tipos celulares (110, 111), na regulação da expressão de moléculas do MHC, e está particularmente implicada na fisiopatologia de diabetes autoimune *in vivo* (112, 113).

Embora classificadas como citocinas pró-inflamatórias e cruciais para a ativação de macrófagos, $\text{IFN}\gamma$ e $\text{TNF}\alpha$ também podem desenvolver funções inibidoras em situações específicas. Diversos autores descreveram propriedades anti-inflamatórias de $\text{IFN}\gamma$ e $\text{TNF}\alpha$. Em certas circunstâncias, $\text{IFN}\gamma$ apresenta efeitos anti-proliferativos e pró-apoptóticos que envolvem a produção de NO por macrófagos ou células microgliais (114-117) e inibe o desenvolvimento de células CD4⁺ produtoras de IL-17 associadas à autoimunidade (118-120). $\text{TNF}\alpha$ também pode estar envolvido na modulação negativa da resposta inflamatória por mecanismos que incluem indução da apoptose, inibição de IL-12/IL-23, e regulação negativa de CD3⁺ (121-126). Essas propriedades anti-inflamatórias são necessárias para limitar a duração da resposta inflamatória e prevenir o dano tecidual.

Existem diversas evidências na literatura apontando citocinas pró-inflamatórias geradas durante a resposta a infecções virais como importantes mediadores da produção de auto-anticorpos anti-eritrocitários e da ativação de macrófagos. Este é o mecanismo que se sugere para o desenvolvimento de

anemia hemolítica autoimune frequentemente observado após infecção viral (74, 75). Desta forma, procuramos determinar se a regulação da expressão de SIRP α e/ou SHP-1 por citocinas pró-inflamatórias poderia contribuir para o desenvolvimento da eritrofagocitose após infecção viral. Para isto cultivamos monócitos de doadores sadios na presença de IFN γ /TNF α durante 48 horas, e determinamos o nível de expressão gênica e protéica de SIRP α e SHP-1, assim como a capacidade de eritrofagocitose destas células.

Nossos resultados mostraram que IFN γ /TNF α aumentam a expressão gênica de SIRP α e SHP-1 em monócitos de doadores sadios, mas apenas a expressão da proteína SIRP α sofre um aumento significativo. Paralelamente, observamos uma redução significativa na capacidade de eritrofagocitose por monócitos de doadores sadios cultivados com IFN γ /TNF α . A interação SIRP α -CD47 é espécie-específica, e por isso nosso ensaio de eritrofagocitose foi realizado utilizando-se eritrócitos humanos, autólogos e sensibilizados com anticorpo anti-D. Nossos resultados mostram um paralelo entre o aumento da expressão de SIRP α e a inibição da fagocitose de eritrócitos autólogos por monócitos de doadores sadios. A interação entre monócitos/macrófagos e eritrócitos, particularmente no que se refere à eritrofagocitose, envolve sinais positivos e negativos. Receptores Fc γ e de complemento direcionam esta interação para a fagocitose, enquanto a sinalização SIRP α -CD47 inibe este evento ativamente. Isto significa que sinais positivos e negativos atuam simultaneamente nesta comunicação, e o estabelecimento ou não da eritrofagocitose é o resultado do somatório das forças relativas desses sinais (57).

Nossos resultados estão de acordo com o trabalho desenvolvido por Jungi et al. (1991) (127), que mostraram que o tratamento de macrófagos com $\text{IFN}\gamma$ inibe a fagocitose mediada por anticorpos de células humanas tumorais através de receptores Fc tipo II, além de inibir a fagocitose de eritrócitos opsonizados. Fratti et al. (1996) (128) também mostraram que $\text{IFN}\gamma$ protege células endoteliais de lesão provocada por *Candida Albicans* *in vitro* pela inibição da fagocitose, e sugerem que a redução da atividade de fagócitos não profissionais pode ser outro mecanismo pelo qual $\text{IFN}\gamma$ protege o hospedeiro de patógenos intracelulares.

Com base em nossos resultados sugerimos que, embora o envolvimento de $\text{IFN}\gamma$ e $\text{TNF}\alpha$ na patogênese de doenças autoimunes esteja se tornando cada vez mais evidente, no desenvolvimento da anemia hemolítica autoimune após infecção viral essas citocinas parecem desempenhar um papel imunomodulador pelo aumento da expressão de $\text{SIRP}\alpha$ e conseqüente inibição da fagocitose de eritrócitos próprios.

5.3. Anemia Hemolítica Autoimune

Em modelos animais, tanto a ausência de $\text{SIRP}\alpha$ quanto a de CD47 provocam exacerbada eritrofagocitose e conseqüente anemia (21, 45, 52). GC são as drogas de primeira escolha para o tratamento da AHAI, e seu mecanismo de ação envolve a redução da produção de auto-anticorpos e redução da avidéz dos macrófagos pelos eritrócitos (71). Ahrens et al. (2006) (129) mostraram que pacientes com AHAI apresentam níveis normais de CD47, e a fim de determinar

se SIRP α e/ou SHP-1 podem ter alguma participação na fisiopatologia da AHAI, e se a regulação do nível de expressão desses genes faz parte do mecanismo de ação do glicocorticóide que resulta na inibição da hemólise em pacientes com AHAI, avaliamos a expressão destes genes em pacientes portadores de AHAI a quente antes e após corticoterapia.

Em nosso estudo, monócitos de pacientes com AHAI apresentam expressão gênica aumentada de SIRP α e SHP-1 antes de corticoterapia, associada à presença de IgG, IgM e C3d, reticulocitose e baixos níveis de hemoglobina. Após corticoterapia, a expressão gênica de SIRP α e SHP-1, reticulócitos e hemoglobina retornam ao normal, e IgM e C3d se tornam indetectáveis, enquanto IgG ainda se encontra presente na membrana dos eritrócitos e no soro. Como demonstrado por Olsson et al. (2006) (25), IgG e complemento agem de maneira sinérgica, e a ausência de C3d, associada aos demais efeitos inibidores do sistema imune provocados pelos GCs, pode contribuir para a melhora hematológica observada nos pacientes com AHAI após corticoterapia. Não foi possível fazer a determinação da expressão protéica de SIRP α e SHP-1 em pacientes com AHAI devido ao pequeno volume de sangue coletado, o que nos fornecia uma quantidade limitada de monócitos.

Em um trabalho recente, Barros et al. (2008) (130) mostraram que a expressão de SIRP α,β em monócitos de pacientes com AHAI é similar à encontrada em indivíduos saudáveis. Porém, os autores quantificaram as isoformas α e β simultaneamente, enquanto nosso trabalho deu enfoque à expressão gênica apenas de SIRP α , que de fato está envolvida na regulação da eritrofagocitose.

Entretanto, em nossos experimentos de avaliação da regulação farmacológica, pudemos observar que o aumento da expressão gênica de SIRP α ou SHP-1 não se reflete necessariamente em aumento da expressão da proteína final. Desta forma, não podemos afirmar que pacientes com AHAI, que apresentam níveis elevados de mRNA de SIRP α e SHP-1 em comparação a indivíduos saudáveis, apresentam consequentemente maior expressão das respectivas proteínas.

O aumento da expressão gênica de SIRP α e SHP-1 em monócitos de doadores sadios cultivados com dexametasona *in vitro* sugere que a redução da expressão desses genes observada em pacientes com AHAI após corticoterapia não se deve a uma ação direta do GC. Entretanto, considerando que os pacientes com AHAI pós-GC estudados por nós foram tratados com prednisona e não dexametasona, procuramos determinar a acuidade de nossa comparação cultivando monócitos de doadores sadios com prednisolona, o metabólito ativo da prednisona (81, 82). Assim, a cultura de monócitos de doadores sadios foi feita em dose baixa (0,15mg/l) e em dose de pulsoterapia (1,0mg/l), e observamos que sua ação sobre a expressão gênica de SIRP α e SHP-1 é semelhante à ação da dexta. Ou seja, observamos um aumento significativo no nível de mRNA destes genes, o que reforça nossa observação de que na AHAI, outros fatores apresentam maior relevância na regulação da expressão gênica de SIRP α e SHP-1 que o GC empregado na terapêutica.

Somando-se isto ao resultado que mostra que a diminuição da expressão gênica de SIRP α e SHP-1 em pacientes com AHAI após corticoterapia faz com que esse parâmetro se iguale ao observado em monócitos de doadores

sadios, sugerimos que alguma alteração relacionada à fisiopatologia da AHAI seja responsável pelo aumento da expressão gênica de SIRP α e SHP-1 nesses pacientes. Com base nesse raciocínio, procuramos determinar que fatores presentes na fisiopatologia da AHAI poderiam modular a função de monócitos, incluindo a expressão de genes que inibem a eritrofagocitose, e optamos por estudar a possibilidade de modulação pela citocina IL-10 e pelo heme.

O padrão de liberação de citocinas na AHAI a quente é predominantemente Th2, com aumento da produção de IL-10 e IL-4, e redução da produção de IL-12 e IFN γ (79, 131). A IL-10 é produzida por linfócitos T e células apresentadoras de antígeno (monócitos, macrófagos, linfócitos B), as quais também são importantes alvos desta citocina que desempenha um importante papel imunossupressor. IL-10 bloqueia a produção de citocinas pró-inflamatórias (incluindo IL-1 α e β , IL-6, IL-12, IL-18 e TNF- α), coestimulação, expressão de MHC de classe II e secreção de quimiocinas (MCP1, MCP5, RANTES, IP-10 e MIP-2). Assim, a IL-10 pode regular diretamente as respostas inata e adaptativa Th1 e Th2 pela limitação da ativação e diferenciação de linfócitos T nos linfonodos, assim como pela supressão da resposta inflamatória nos tecidos (132, 133).

Fagiolo e Toriani-Terenzi (2002) (79) sugerem que o nível aumentado de IL-10 em pacientes com AHAI pode causar uma diminuição secundária na produção de IFN γ , indicando que a produção diminuída de citocinas tipo Th1 e a produção de autoAc em AHAI podem ser secundários ao desbalanço entre IL-10 e IL-12. Adicionalmente, Ji et al. (2004) (134) mostraram que a inibição de IL-12 e

IL-18 é um dos mecanismos pelos quais a IL-10 suprime a ativação e diferenciação de células Th1, e sugerem que, como um importante membro das citocinas Th2, a IL-10 promove não apenas a produção de IgA e IgG por uma ação direta da IL-10 sobre os linfócitos B (135, 136), mas também o efeito dos Ac por aumentar a expressão de CD64, promovendo efeitos imunológicos mediados por IgG. Com base nessas informações procuramos observar se a regulação farmacológica da expressão gênica de SIRP α e/ou SHP-1 apresenta alguma relação com a liberação da citocina IL-10. Nossos resultados mostraram que, em células U937, a expressão gênica de SIRP α é aumentada pela cultura com dexametasona ou IFN γ /TNF α , principalmente após 18 horas de cultura, enquanto a liberação de IL-10 não se altera ao longo da cultura com essas drogas. Já a expressão gênica de SHP-1 aumenta após cultura com IFN γ /TNF α após apenas 6 horas de cultura. Este resultado sugere que a regulação da expressão gênica de SIRP α ou SHP-1 não apresenta relação direta ou inversa com a liberação de IL-10.

Além disso, nossos resultados também mostraram que o efeito da cultura de células U937 com dexametasona sobre a expressão gênica de SHP-1 é diferente do observado em monócitos de doadores saudáveis. Ou seja, enquanto nos monócitos este antiinflamatório promove um aumento significativo na expressão gênica de SHP-1, em células U937 este efeito não ocorre. Embora as células U937 sejam amplamente utilizadas no estudo do comportamento e da diferenciação de monócitos, a resposta de células U937 nem sempre é idêntica a de monócitos de sangue periférico. Um exemplo é o tratamento com IL-10, que induz a expressão de Fc ϵ R2 em células U937, e reduz a expressão deste receptor

em monócitos de sangue periférico. A natureza dessa diferença ainda não é clara, mas pode estar relacionada ao estágio da diferenciação e ativação celular, e possivelmente ao estado de transformação (137).

Em seguida procuramos determinar se o aumento na expressão gênica de SIRP α e SHP-1 em pacientes com AHAI antes de corticoterapia pode estar relacionado ao aumento da disponibilidade de heme liberado durante a eritrofagocitose. Para isso cultivamos monócitos de doadores sadios com diferentes concentrações de hemina durante diferentes períodos de tempo. A cultura de monócitos de doadores sadios com hemina por apenas 6 horas promove um aumento significativo na expressão gênica de SIRP α , mas este efeito não foi observado em culturas mais longas. Em contrapartida, não observamos aumento do nível de expressão de proteína SIRP α , confirmando que o aumento da expressão gênica de SIRP α por si não é suficiente para aumentar a expressão da proteína final. Relacionando este resultado com o trabalho de Barros et al. (2008) (130), que mostrou que pacientes com AHAI apresentam o mesmo nível de expressão de SIRP α,β na membrana dos monócitos, sugerimos que o heme liberado durante o processo de hemólise pode aumentar a expressão gênica de SIRP α sem aumentar expressão da proteína final. A expressão gênica de SHP-1 não sofreu qualquer alteração pela cultura com hemina.

Em macrófagos, a ingestão de eritrócitos e o subsequente aumento da concentração de heme está associada à expressão de heme oxigenase-1 (HO-1), a principal enzima envolvida no catabolismo do heme, convertendo-o em monóxido de carbono (CO), biliverdina e ferro. O ferro livre exerce efeitos

citotóxicos pela formação de EROs e peroxidação lipídica, mas o CO, a biliverdina e a bilirrubina resultantes do catabolismo do heme são compostos altamente antioxidantes e antiinflamatórios (138-140). HO-1 também pode ser induzida pela administração *in vivo* de IL-1, IL-6 e TNF α , assim como por diversas formas de estresse oxidativo, incluindo ânions superóxido e peróxido de hidrogênio (141, 142). O aumento na expressão gênica de SIRP α em monócitos de doadores sadios cultivados com hemina sugere que a expressão gênica aumentada de SIRP α em pacientes com AHAI antes de corticoterapia por nós observada pode ser devido à liberação excessiva de heme durante a eritrofagocitose.

5.4. Considerações finais

Na linfohistiocitose hemofagocítica (HLH), a hemofagocitose é parte de uma síndrome clínica semelhante à sepse causada por severa hipercitocinemia, resultante de uma resposta imune altamente estimulada, mas ineficiente. Sua origem pode ser genética ou adquirida, sendo que a última pode estar associada a doenças infecciosas, malignas ou autoimunes. Uma característica da HLH é a redução ou mesmo ausência da função das células natural killer (NK) e de linfócitos T citotóxicos, o que resulta em resposta prejudicada a infecções virais e na predisposição a tumores. Na HLH, a atividade citotóxica deficiente prejudica não só a eliminação de células que expressam antígenos, mas também a regulação negativa da resposta imune. A ativação imunológica prolongada associada aos altos níveis de citocinas leva ao quadro clínico da HLH (143). Comparando a HLH à AHAI, observamos que ambas resultam de estímulos

prófagocíticos que se sobrepõem aos estímulos antifagocíticos, e sugerimos que a sinalização SIRP α -CD47 pode desempenhar um papel na fisiopatologia da HLH, e que este é outro cenário em que a regulação da expressão de SIRP α poderia representar uma ferramenta terapêutica.

Adicionalmente, considerando que o papel da SIRP α vai além da inibição da eritrofagocitose, o conhecimento relativo a sua regulação ainda pode ter outras implicações terapêuticas. Por exemplo, a expressão de SIRP α na lâmina elástica arterial pode desempenhar um papel na prevenção da formação de trombos, pois inibe a adesão de leucócitos e plaquetas através da ativação da SHP-1 (144). No endotélio cerebral, SIRP α está envolvida na transmigração de monócitos através do endotélio cerebral, que expressa CD47 (78). Assim, de Vries et al. (2002) (78) sugerem que interferência na interação SIRP α -CD47 pode oferecer uma nova ferramenta para se inibir seletivamente a infiltração de monócitos para o cérebro em doenças neuroinflamatórias como esclerose múltipla, podendo se minimizar os sintomas.

O papel da SIRP α na rejeição de transplantes foi estudado por diversos grupos. Ide et al. (2007) (145), estudando a atividade de macrófagos contra células de suíno, mostraram que a expressão de CD47 humano em células suínas reduz radicalmente a susceptibilidade dessas células à fagocitose por monócitos humanos. Takenaka et al., (2007) (146) confirmaram a importância dos macrófagos como mediadores do enxerto após o transplante de células tronco hematopoiéticas e mostraram que variações genéticas (polimorfismos) na sequência codificante do domínio IgV da SIRP α afeta seu nível de interação com o

CD47 e exerce um efeito “tudo-ou-nada” no enxerto dessas células, sugerindo que muitos efeitos pleiotrópicos (múltiplos efeitos de um gene, pois um único gene pode controlar diversas características do fenótipo que muitas vezes não estão relacionadas) da interação SIRP α -CD47 podem influenciar a sobrevivência e o enxerto de células tronco hematopoiéticas humanas. Esses estudos indicam que a sinalização SIRP α -CD47 pode ser um fator adicional para a determinação do sucesso de um transplante de células hematopoiéticas, o que não é garantido apenas pela identidade genética de antígenos humanos leucocitários entre doador e receptor (23).

Além disso, a sinalização SIRP α -CD47 também está implicada na regulação da termogênese pelo sistema nervoso autônomo, na resposta central a estresse e à regulação da formação de memória hipocampo-dependente, além de promover a secreção de insulina por células β pancreáticas (23). Ou seja, o controle da expressão de SIRP α pode constituir uma ferramenta terapêutica potencial para o tratamento de diferentes patologias, como inflamação pulmonar, trombose, doenças neuroinflamatórias, diabetes tipo I e rejeição de transplantes, por exemplo.

Em resumo, nosso trabalho mostra que a SIRP α parece desempenhar um importante papel no controle da eritrofagocitose *in vitro*, visto que o aumento de sua expressão promovido por IFN γ e TNF α é acompanhado por redução da capacidade de eritrofagocitose em monócitos de doadores saudáveis. Sugerimos então que no estabelecimento de AHA viral, as citocinas IFN γ e TNF α desempenham um papel imunomodulador, ao contrário do papel de ativação da

eritrofagocitose sugerido por outros autores. Entretanto, a regulação da expressão de SIRP α e SHP-1 em monócitos não constitui um mecanismo central de controle da eritrofagocitose por GC, que *in vitro* não altera a expressão de SIRP α , SHP-1 ou a capacidade de eritrofagocitose em monócitos de doadores saudáveis. A expressão gênica de SIRP α e SHP-1 em pacientes com AHAI antes de corticoterapia se apresenta aumentada, e isto parece ser devido ao aumento da concentração plasmática de heme, embora não possamos afirmar se o aumento da expressão destes genes em AHAI corresponde a um aumento na expressão das proteínas correspondentes. Para definitivamente descartar o envolvimento de SIRP α e/ou SHP-1 na fisiopatologia da AHAI, é necessário determinar se a SIRP α e o SHP-1 expressos em monócitos de pacientes com AHAI são plenamente funcionais.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

In vitro, dexametasona, $\text{IFN}\gamma/\text{TNF}\alpha$ e heme aumentam a expressão gênica de $\text{SIRP}\alpha$ e SHP-1 por monócitos de doadores sadios, enquanto apenas a expressão protéica de $\text{SIRP}\alpha$ sofre aumento significativo pela cultura com $\text{IFN}\gamma/\text{TNF}\alpha$. Paralelamente, observamos que o aumento na expressão protéica de $\text{SIRP}\alpha$ é acompanhado pela redução da capacidade de fagocitose de eritrócitos autólogos por monócitos de doadores sadios, indicando uma possível correlação entre a expressão de $\text{SIRP}\alpha$ e a habilidade de eritrofagocitose por monócitos. Além disso, ensaios *in vitro* mostraram que não há relação entre a liberação de IL-10 e a expressão gênica de $\text{SIRP}\alpha$ ou SHP-1.

Monócitos de pacientes com AHAi a quente apresentam expressão gênica de $\text{SIRP}\alpha$ e SHP-1 aumentada em relação a monócitos de doadores sadios. Após corticoterapia, monócitos de pacientes com AHAi a quente apresentam o mesmo nível de expressão gênica de $\text{SIRP}\alpha$ e SHP-1 que monócitos de doadores sadios. Além disso, concluímos que expressão gênica de $\text{SIRP}\alpha$ e SHP-1 em pacientes com AHAi a quente parece ser modulada principalmente pelo heme presente na circulação, e não pelo glicocorticoide utilizado na terapia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas ALAP, S. Cellular and Molecular Immunology. 6th edition ed: Saunders; 2007.
2. Paul WE. Fundamental Immunology. 4th edition ed: Lippincott Williams & Wilkins; 1999.
3. Newburger PE, Dai Q, Whitney C. In vitro regulation of human phagocyte cytochrome b heavy and light chain gene expression by bacterial lipopolysaccharide and recombinant human cytokines. J Biol Chem 1991;266(24):16171-7.
4. Badie B, Schartner J, Vorpahl J, Preston K. Interferon-gamma induces apoptosis and augments the expression of Fas and Fas ligand by microglia in vitro. Exp Neurol 2000;162(2):290-6.
5. Cassatella MA, Bazzoni F, Flynn RM, Dusi S, Trinchieri G, Rossi F. Molecular basis of interferon-gamma and lipopolysaccharide enhancement of phagocyte respiratory burst capability. Studies on the gene expression of several NADPH oxidase components. J Biol Chem 1990;265(33):20241-6.
6. Condino-Neto A, Whitney C, Newburger PE. Dexamethasone but not indomethacin inhibits human phagocyte nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity by down-regulating expression of genes encoding oxidase components. J Immunol 1998;161(9):4960-7.
7. Gessani S, Belardelli F. IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance. Cytokine Growth Factor Rev 1998;9(2):117-23.

8. Cassatella MA, Della Bianca V, Berton G, Rossi F. Activation by gamma interferon of human macrophage capability to produce toxic oxygen molecules is accompanied by decreased Km of the superoxide-generating NADPH oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 1985;132(3):908-14.
9. Ossina NK, Cannas A, Powers VC, Fitzpatrick PA, Knight JD, Gilbert JR, et al. Interferon-gamma modulates a p53-independent apoptotic pathway and apoptosis-related gene expression. *J Biol Chem* 1997;272(26):16351-7.
10. Aringer M, Smolen JS. The role of tumor necrosis factor-alpha in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2008;10(1):202.
11. Vitale RF, Ribeiro Fde A. The role of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in bone resorption present in middle ear cholesteatoma. *Braz J Otorhinolaryngol* 2007;73(1):117-21.
12. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005;5(12):953-64.
13. Bartee E, Mohamed MR, McFadden G. Tumor necrosis factor and interferon: cytokines in harmony. *Curr Opin Microbiol* 2008;11(4):378-83.
14. Oldenborg PA, Gresham HD, Lindberg FP. CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPalpha) regulates Fcgamma and complement receptor-mediated phagocytosis. *J Exp Med* 2001;193(7):855-62.
15. Garcia-Garcia E, Rosales C. Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol* 2002;72(6):1092-108.
16. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 1999;17:593-623.

17. Unkeless JC, Jin J. Inhibitory receptors, ITIM sequences and phosphatases. *Curr Opin Immunol* 1997;9(3):338-43.
18. Cambier JC. Inhibitory receptors abound? *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(12):5993-5.
19. Timms JF, Carlberg K, Gu H, Chen H, Kamatkar S, Nadler MJ, et al. Identification of major binding proteins and substrates for the SH2-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1 in macrophages. *Mol Cell Biol* 1998;18(7):3838-50.
20. Li L, Yao Z. Mast cell and immune inhibitory receptors. *Cell Mol Immunol* 2004;1(6):408-15.
21. Barclay AN, Brown MH. The SIRP family of receptors and immune regulation. *Nat Rev Immunol* 2006;6(6):457-64.
22. Kharitonov A, Chen Z, Sures I, Wang H, Schilling J, Ullrich A. A family of proteins that inhibit signalling through tyrosine kinase receptors. *Nature* 1997;386(6621):181-6.
23. Matozaki T, Murata Y, Okazawa H, Ohnishi H. Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRPalpha signalling pathway. *Trends Cell Biol* 2009;19(2):72-80.
24. Adams S, van der Laan LJ, Vernon-Wilson E, Renardel de Lavalette C, Dopp EA, Dijkstra CD, et al. Signal-regulatory protein is selectively expressed by myeloid and neuronal cells. *J Immunol* 1998;161(4):1853-9.
25. Olsson M, Nilsson A, Oldenborg PA. Target cell CD47 regulates macrophage activation and erythrophagocytosis. *Transfus Clin Biol* 2006;13(1-2):39-43.

26. Wang XX, Pfenninger KH. Functional analysis of SIRPalpha in the growth cone. *J Cell Sci* 2006;119(Pt 1):172-83.
27. Janssen WJ, McPhillips KA, Dickinson MG, Linderman DJ, Morimoto K, Xiao YQ, et al. Surfactant proteins A and D suppress alveolar macrophage phagocytosis via interaction with SIRP alpha. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178(2):158-67.
28. van den Nieuwenhof IM, Renardel de Lavalette C, Diaz N, van Die I, van den Berg TK. Differential galactosylation of neuronal and haematopoietic signal regulatory protein-alpha determines its cellular binding-specificity. *J Cell Sci* 2001;114(Pt 7):1321-9.
29. Gresham H, Dale BM, Potter JW, Chang PW, Vines CM, Lowell CA, Lagenaar CF, Willman CL. Negative regulation of phagocytosis in murine macrophages by the Src kinase family member, Fgr. *J Exp Med* 2000;191:515-28.
30. Oshima K, Ruhul Amin AR, Suzuki A, Hamaguchi M, Matsuda S. SHPS-1, a multifunctional transmembrane glycoprotein. *FEBS Lett* 2002;519(1-3):1-7.
31. Brown EJ, Frazier WA. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell Biol* 2001;11(3):130-5.
32. Ishikawa-Sekigami T, Kaneko Y, Okazawa H, Tomizawa T, Okajo J, Saito Y, et al. SHPS-1 promotes the survival of circulating erythrocytes through inhibition of phagocytosis by splenic macrophages. *Blood* 2006;107(1):341-8.
33. Smith RE, Patel V, Seatter SD, Deehan MR, Brown MH, Brooke GP, et al. A novel MyD-1 (SIRP-1alpha) signaling pathway that inhibits LPS-induced TNFalpha production by monocytes. *Blood* 2003;102(7):2532-40.

34. Wu CJ, Chen Z, Ullrich A, Greene MI, O'Rourke DM. Inhibition of EGFR-mediated phosphoinositide-3-OH kinase (PI3-K) signaling and glioblastoma phenotype by signal-regulatory proteins (SIRPs). *Oncogene* 2000;19(35):3999-4010.
35. Takada T, Matozaki T, Takeda H, Fukunaga K, Noguchi T, Fujioka Y, et al. Roles of the complex formation of SHPS-1 with SHP-2 in insulin-stimulated mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 1998;273(15):9234-42.
36. Chen TT, Brown EJ, Huang EJ, Seaman WE. Expression and activation of signal regulatory protein alpha on astrocytomas. *Cancer Res* 2004;64(1):117-27.
37. Neznanov N, Neznanova L, Kondratov RV, Burdelya L, Kandel ES, O'Rourke DM, et al. Dominant negative form of signal-regulatory protein-alpha (SIRPalpha /SHPS-1) inhibits tumor necrosis factor-mediated apoptosis by activation of NF-kappa B. *J Biol Chem* 2003;278(6):3809-15.
38. Kant AM, De P, Peng X, Yi T, Rawlings DJ, Kim JS, et al. SHP-1 regulates Fcgamma receptor-mediated phagocytosis and the activation of RAC. *Blood* 2002;100(5):1852-9.
39. Sato R, Ohnishi H, Kobayashi H, Kiuchi D, Hayashi A, Kaneko Y, et al. Regulation of multiple functions of SHPS-1, a transmembrane glycoprotein, by its cytoplasmic region. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309(3):584-90.
40. Dietrich J, Nakajima H, Colonna M. Human inhibitory and activating Ig-like receptors which modulate the function of myeloid cells. *Microbes Infect* 2000;2(3):323-9.
41. Alblas J, Honing H, de Lavalette CR, Brown MH, Dijkstra CD, van den Berg TK. Signal regulatory protein alpha ligation induces macrophage nitric oxide

production through JAK/STAT- and phosphatidylinositol 3-kinase/Rac1/NAPDH oxidase/H₂O₂-dependent pathways. *Mol Cell Biol* 2005;25(16):7181-92.

42. Mitsuhashi H, Yoshikawa A, Sasagawa N, Hayashi Y, Ishiura S. Denervation enhances the expression of SHPS-1 in rat skeletal muscle. *J Biochem (Tokyo)* 2005;137(4):495-502.

43. Kato H, Honda S, Yoshida H, Kashiwagi H, Shiraga M, Honma N, et al. SHPS-1 negatively regulates integrin α 5 β 3 function through CD47 without disturbing FAK phosphorylation. *J Thromb Haemost* 2005;3(4):763-74.

44. Oshima K, Machida K, Ichigotani Y, Nimura Y, Shirafuji N, Hamaguchi M, et al. SHPS-1: a budding molecule against cancer dissemination. *Cancer Res* 2002;62(14):3929-33.

45. Oldenborg PA, Zheleznyak A, Fang YF, Lagenaur CF, Gresham HD, Lindberg FP. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* 2000;288(5473):2051-4.

46. Pettersen RD. CD47 and death signaling in the immune system. *Apoptosis* 2000;5(4):299-306.

47. Ticchioni M, Raimondi V, Lamy L, Wijdenes J, Lindberg FP, Brown EJ, et al. Integrin-associated protein (CD47/IAP) contributes to T cell arrest on inflammatory vascular endothelium under flow. *Faseb J* 2001;15(2):341-50.

48. Isenberg JS, Ridnour LA, Dimitry J, Frazier WA, Wink DA, Roberts DD. CD47 is necessary for inhibition of nitric oxide-stimulated vascular cell responses by thrombospondin-1. *J Biol Chem* 2006.

49. Isenberg JS, Romeo MJ, Abu-Asab M, Tsokos M, Oldenburg A, Pappan L, et al. Increasing survival of ischemic tissue by targeting CD47. *Circ Res* 2007;100(5):712-20.
50. Isenberg JS, Maxhimer JB, Hyodo F, Pendrak ML, Ridnour LA, DeGraff WG, et al. Thrombospondin-1 and CD47 limit cell and tissue survival of radiation injury. *Am J Pathol* 2008;173(4):1100-12.
51. Olsson M, Nilsson A, Oldenburg PA. Dose-dependent inhibitory effect of CD47 in macrophage uptake of IgG-opsonized murine erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;352(1):193-7.
52. Ishikawa-Sekigami T, Kaneko Y, Saito Y, Murata Y, Okazawa H, Ohnishi H, et al. Enhanced phagocytosis of CD47-deficient red blood cells by splenic macrophages requires SHPS-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;343(4):1197-200.
53. Latour S, Tanaka H, Demeure C, Mateo V, Rubio M, Brown EJ, et al. Bidirectional negative regulation of human T and dendritic cells by CD47 and its cognate receptor signal-regulator protein-alpha: down-regulation of IL-12 responsiveness and inhibition of dendritic cell activation. *J Immunol* 2001;167(5):2547-54.
54. Seiffert M, Brossart P, Cant C, Cella M, Colonna M, Brugger W, et al. Signal-regulatory protein alpha (SIRPalpha) but not SIRPbeta is involved in T-cell activation, binds to CD47 with high affinity, and is expressed on immature CD34(+)CD38(-) hematopoietic cells. *Blood* 2001;97(9):2741-9.

55. Armant M, Avice MN, Hermann P, Rubio M, Kiniwa M, Delespesse G, et al. CD47 ligation selectively downregulates human interleukin 12 production. *J Exp Med* 1999;190(8):1175-82.
56. Head DJ, Lee ZE, Swallah MM, Avent ND. Ligation of CD47 mediates phosphatidylserine expression on erythrocytes and a concomitant loss of viability in vitro. *Br J Haematol* 2005;130(5):788-90.
57. Olsson MH, S.; Hedelius, D.U.R.; Oldenborg, P.A. Madame Curie Bioscience Database: Hematologic Diseases: Autoimmune Hemolytic Anemia and Immune Thrombocytopenic Purpura. In: Landers Bioscience.
58. Poole AW, Jones ML. A SHPing tale: perspectives on the regulation of SHP-1 and SHP-2 tyrosine phosphatases by the C-terminal tail. *Cell Signal* 2005;17(11):1323-32.
59. Jones ML, Craik JD, Gibbins JM, Poole AW. Regulation of SHP-1 tyrosine phosphatase in human platelets by serine phosphorylation at its C terminus. *J Biol Chem* 2004;279(39):40475-83.
60. Fawcett VC, Lorenz U. Localization of Src homology 2 domain-containing phosphatase 1 (SHP-1) to lipid rafts in T lymphocytes: functional implications and a role for the SHP-1 carboxyl terminus. *J Immunol* 2005;174(5):2849-59.
61. Valentino L, Pierre J. JAK/STAT signal transduction: regulators and implication in hematological malignancies. *Biochem Pharmacol* 2006;71(6):713-21.
62. Khaled AR, Butfiloski EJ, Sobel ES, Schiffenbauer J. Functional consequences of the SHP-1 defect in motheaten viable mice: role of NF-kappa B. *Cell Immunol* 1998;185(1):49-58.

63. Yu WM, Wang S, Keegan AD, Williams MS, Qu CK. Abnormal Th1 cell differentiation and IFN-gamma production in T lymphocytes from motheaten viable mice mutant for Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase-1. *J Immunol* 2005;174(2):1013-9.
64. Klingmuller U, Lorenz U, Cantley LC, Neel BG, Lodish HF. Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell* 1995;80(5):729-38.
65. Zhang J, Somani AK, Yuen D, Yang Y, Love PE, Siminovitch KA. Involvement of the SHP-1 tyrosine phosphatase in regulation of T cell selection. *J Immunol* 1999;163(6):3012-21.
66. Mok SC, Kwok TT, Berkowitz RS, Barrett AJ, Tsui FW. Overexpression of the protein tyrosine phosphatase, nonreceptor type 6 (PTPN6), in human epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1995;57(3):299-303.
67. Ottinger EA, Botfield MC, Shoelson SE. Tandem SH2 domains confer high specificity in tyrosine kinase signaling. *J Biol Chem* 1998;273(2):729-35.
68. Gehrs BC, Friedberg RC. Autoimmune hemolytic anemia. *Am J Hematol* 2002;69(4):258-71.
69. Oliveira MC, Oliveira BM, Murao M, Vieira ZM, Gresta LT, Viana MB. Clinical course of autoimmune hemolytic anemia: an observational study. *J Pediatr (Rio J)* 2006;82(1):58-62.
70. Valent P, Lechner K. Diagnosis and treatment of autoimmune haemolytic anaemias in adults: a clinical review. *Wien Klin Wochenschr* 2008;120(5-6):136-51.

71. Packman CH. Acquired hemolytic anemia due to warm-reacting autoantibodies. In: McGraw-Hill, editor. McGraw-Hill: Beutler E, Lichtman, M.A., Coller, B.S., Kipps, T.S., Seligsohn, U. Williams; 2001. p. 639-648.
72. Ogose T, Wakata Y, Kaneko M, Shinahara K, Takechi T, Kotani H. A case of recurrent paroxysmal cold hemoglobinuria with the different temperature thresholds of Donath-Landsteiner antibodies. *J Pediatr Hematol Oncol* 2007;29(10):716-9.
73. Sokol RJ, Booker DJ, Stamps R. Erythropoiesis: Paroxysmal Cold Haemoglobinuria: A Clinico-Pathological Study of Patients with a Positive Donath-Landsteiner Test. *Hematology* 1999;4(2):137-164.
74. McCoy L, Tsunoda I, Fujinami RS. Multiple sclerosis and virus induced immune responses: autoimmunity can be primed by molecular mimicry and augmented by bystander activation. *Autoimmunity* 2006;39(1):9-19.
75. Musaji A, Meite M, Detalle L, Franquin S, Cormont F, Preat V, et al. Enhancement of autoantibody pathogenicity by viral infections in mouse models of anemia and thrombocytopenia. *Autoimmun Rev* 2005;4(4):247-52.
76. Meite M, Leonard S, Idrissi ME, Izui S, Masson PL, Coutelier JP. Exacerbation of autoantibody-mediated hemolytic anemia by viral infection. *J Virol* 2000;74(13):6045-9.
77. von Herrath MG, Oldstone MB. Virus-induced autoimmune disease. *Curr Opin Immunol* 1996;8(6):878-85.
78. de Vries HE, Hendriks JJ, Honing H, De Lavalette CR, van der Pol SM, Hooijberg E, et al. Signal-regulatory protein alpha-CD47 interactions are required

for the transmigration of monocytes across cerebral endothelium. *J Immunol* 2002;168(11):5832-9.

79. Fagiolo E, Toriani-Terenzi C. Th1 and Th2 cytokine modulation by IL-10/IL-12 imbalance in autoimmune haemolytic anaemia (AIHA). *Autoimmunity* 2002;35(1):39-44.

80. Meyer O, Stahl D, Beckhove P, Huhn D, Salama A. Pulsed high-dose dexamethasone in chronic autoimmune haemolytic anaemia of warm type. *Br J Haematol* 1997;98(4):860-2.

81. Fries LF, Chaim M. Brickman, Michael M. Frank. Monocyte receptors for the Fc portion of IgG increase in number in autoimmune hemolytic anemia and other hemolytic states and are decreased by glucocorticoid therapy. *The Journal of Immunology* 1983;131(3):1240-1245.

82. Petroni KC, Shen L, Guyre PM. Modulation of human polymorphonuclear leukocyte IgG Fc receptors and Fc receptor-mediated functions by IFN-gamma and glucocorticoids. *J Immunol* 1988;140(10):3467-72.

83. Forslid J, Hed J. In vitro effect of hydrocortisone on the attachment and ingestion phases of immunoglobulin G- and complement component 3b-mediated phagocytosis by human neutrophils. *Infect Immun* 1982;38(3):811-6.

84. Leung DYM. Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:3-22.

85. Katzung BG. *Farmacologia Básica e Clínica*. 5° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1994.

86. Boumpas DT, Chrousos GP, Wilder RL, Cupps TR, Balow JE. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Intern Med* 1993;119(12):1198-208.
87. Genty I, Michel M, Hermine O, Schaeffer A, Godeau B, Rochant H. [Characteristics of autoimmune hemolytic anemia in adults: retrospective analysis of 83 cases]. *Rev Med Interne* 2002;23(11):901-9.
88. Lowenberg M, Stahn C, Hommes DW, Buttgereit F. Novel insights into mechanisms of glucocorticoid action and the development of new glucocorticoid receptor ligands. *Steroids* 2008;73(9-10):1025-9.
89. Buckbinder L, Robinson RP. The glucocorticoid receptor: molecular mechanism and new therapeutic opportunities. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2002;1(2):127-36.
90. Montgomery DC. Design and Analysis of Experiments. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons; 1991.
91. Milliken GA, Johnson, D.E. Analysis of Messy Data. New York: Van Nostrand Reinhold Company; 1984.
92. Ravetch JV, Lanier LL. Immune inhibitory receptors. *Science* 2000;290(5489):84-9.
93. Long EO. Negative signaling by inhibitory receptors: the NK cell paradigm. *Immunol Rev* 2008;224:70-84.
94. Terpigorev SA, Il'chenko VA, Vasilenko IA, Slinchenko OI, Stotskaya TV, Markina TR, et al. Correlation between the results of glucocorticoid therapy and in vitro effect of glucocorticoids on monocytes in asthma. *Bull Exp Biol Med* 2003;135(6):582-5.

95. Vecchiarelli A, Siracusa A, Cenci E, Puliti M, Abbritti G. Effect of corticosteroid treatment on interleukin-1 and tumour necrosis factor secretion by monocytes from subjects with asthma. *Clin Exp Allergy* 1992;22(3):365-70.
96. Gemsa C, Woo CH, Fudenberg HH, Schmid R. Erythrocyte catabolism by macrophages in vitro. The effect of hydrocortisone on erythrophagocytosis and on the induction of heme oxygenase. *J Clin Invest* 1973;52(4):812-22.
97. Greendyke RM, Bradley EM, Swisher SN. Studies of the Effects of Administration of Acth and Adrenal Corticosteroids on Erythrophagocytosis. *J Clin Invest* 1965;44:746-53.
98. Deshmukh CT. Minimizing side effects of systemic corticosteroids in children. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2007;73(4):218-21.
99. Gordon PV. Postnatal dexamethasone for lung disease of prematurity. *N Engl J Med* 2004;350(26):2715-8; author reply 2715-8.
100. Turck J, Oberdorfer C, Vogel T, Mackenzie CR, Daubener W. Enhancement of antimicrobial effects by glucocorticoids. *Med Microbiol Immunol* 2005;194(1-2):47-53.
101. MacPherson A, Dinkel K, Sapolsky R. Glucocorticoids worsen excitotoxin-induced expression of pro-inflammatory cytokines in hippocampal cultures. *Exp Neurol* 2005;194(2):376-83.
102. Zhang N, Truong-Tran QA, Tancowny B, Harris KE, Schleimer RP. Glucocorticoids enhance or spare innate immunity: effects in airway epithelium are mediated by CCAAT/enhancer binding proteins. *J Immunol* 2007;179(1):578-89.

103. Ray JC, Wang J, Chan J, Kirschner DE. The timing of TNF and IFN-gamma signaling affects macrophage activation strategies during Mycobacterium tuberculosis infection. *J Theor Biol* 2008;252(1):24-38.
104. Zhang A, Yang H, Yang Y, Qian Z. Correlation between the dose and the anti-Toxoplasma effect of activated mouse macrophages induced by IFN-gamma and the synergism between IFN-gamma and TNF-alpha. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* 1998;16(6):436-40.
105. Mauel J, Ransijn A, Corradin SB, Buchmuller-Rouiller Y. Effect of PGE2 and of agents that raise cAMP levels on macrophage activation induced by IFN-gamma and TNF-alpha. *J Leukoc Biol* 1995;58(2):217-24.
106. Tomioka H, Sato K, Maw WW, Saito H. The role of tumor necrosis factor, interferon-gamma, transforming growth factor-beta, and nitric oxide in the expression of immunosuppressive functions of splenic macrophages induced by Mycobacterium avium complex infection. *J Leukoc Biol* 1995;58(6):704-12.
107. Leenen PJ, Canono BP, Drevets DA, Voerman JS, Campbell PA. TNF-alpha and IFN-gamma stimulate a macrophage precursor cell line to kill Listeria monocytogenes in a nitric oxide-independent manner. *J Immunol* 1994;153(11):5141-7.
108. Sorio C, Melotti P, Dusi S, Berton G. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha enhance p60src expression in human macrophages and myelomonocytic cell lines. *FEBS Lett* 1993;327(3):315-20.
109. Newburger PE, Ezekowitz RA, Whitney C, Wright J, Orkin SH. Induction of phagocyte cytochrome b heavy chain gene expression by interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(14):5215-9.

110. Fluhr H, Krenzer S, Stein GM, Stork B, Deperschmidt M, Wallwiener D, et al. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha sensitize primarily resistant human endometrial stromal cells to Fas-mediated apoptosis. *J Cell Sci* 2007;120(Pt 23):4126-33.
111. Patrick DM, Leone AK, Shellenberger JJ, Dudowicz KA, King JM. Proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma modulate epithelial barrier function in Madin-Darby canine kidney cells through mitogen activated protein kinase signaling. *BMC Physiol* 2006;6:2.
112. Kim KA, Kim S, Chang I, Kim GS, Min YK, Lee MK, et al. IFN gamma/TNF alpha synergism in MHC class II induction: effect of nicotinamide on MHC class II expression but not on islet-cell apoptosis. *Diabetologia* 2002;45(3):385-93.
113. Suk K, Kim S, Kim YH, Kim KA, Chang I, Yagita H, et al. IFN-gamma/TNF-alpha synergism as the final effector in autoimmune diabetes: a key role for STAT1/IFN regulatory factor-1 pathway in pancreatic beta cell death. *J Immunol* 2001;166(7):4481-9.
114. Willenborg DO, Staykova MA, Cowden WB. Our shifting understanding of the role of nitric oxide in autoimmune encephalomyelitis: a review. *J Neuroimmunol* 1999;100(1-2):21-35.
115. Willenborg DO, Fordham SA, Staykova MA, Ramshaw IA, Cowden WB. IFN-gamma is critical to the control of murine autoimmune encephalomyelitis and regulates both in the periphery and in the target tissue: a possible role for nitric oxide. *J Immunol* 1999;163(10):5278-86.

116. Fenyk-Melody JE, Garrison AE, Brunnert SR, Weidner JR, Shen F, Shelton BA, et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis is exacerbated in mice lacking the NOS2 gene. *J Immunol* 1998;160(6):2940-6.
117. Ruuls SR, Van Der Linden S, Sontrop K, Huitinga I, Dijkstra CD. Aggravation of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) by administration of nitric oxide (NO) synthase inhibitors. *Clin Exp Immunol* 1996;103(3):467-74.
118. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2005;201(2):233-40.
119. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005;6(11):1133-41.
120. Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2003;198(12):1951-7.
121. Zakharova M, Ziegler HK. Paradoxical anti-inflammatory actions of TNF- α : inhibition of IL-12 and IL-23 via TNF receptor 1 in macrophages and dendritic cells. *J Immunol* 2005;175(8):5024-33.
122. Isomaki P, Panesar M, Annenkov A, Clark JM, Foxwell BM, Chernajovsky Y, et al. Prolonged exposure of T cells to TNF down-regulates TCR zeta and expression of the TCR/CD3 complex at the cell surface. *J Immunol* 2001;166(9):5495-507.
123. Kassiotis G, Kollias G. Uncoupling the proinflammatory from the immunosuppressive properties of tumor necrosis factor (TNF) at the p55 TNF

receptor level: implications for pathogenesis and therapy of autoimmune demyelination. *J Exp Med* 2001;193(4):427-34.

124. Liu J, Marino MW, Wong G, Grail D, Dunn A, Bettadapura J, et al. TNF is a potent anti-inflammatory cytokine in autoimmune-mediated demyelination. *Nat Med* 1998;4(1):78-83.

125. Speiser DE, Sebzda E, Ohteki T, Bachmann MF, Pfeffer K, Mak TW, et al. Tumor necrosis factor receptor p55 mediates deletion of peripheral cytotoxic T lymphocytes in vivo. *Eur J Immunol* 1996;26(12):3055-60.

126. Zganiacz A, Santosuosso M, Wang J, Yang T, Chen L, Anzulovic M, et al. TNF-alpha is a critical negative regulator of type 1 immune activation during intracellular bacterial infection. *J Clin Invest* 2004;113(3):401-13.

127. Jungi TW, Brcic M, Leutwyler C, Pfister H, Spycher MO. Interferon-gamma treatment impairs Fc receptor type II-mediated phagocytosis of human macrophages by a post-receptor-binding mechanism. *Immunology* 1991;74(3):439-45.

128. Fratti RA, Ghannoum MA, Edwards JE, Jr., Filler SG. Gamma interferon protects endothelial cells from damage by *Candida albicans* by inhibiting endothelial cell phagocytosis. *Infect Immun* 1996;64(11):4714-8.

129. Ahrens N, Pagenkopf C, Kiesewetter H, Salama A. CD47 is expressed at normal levels in patients with autoimmune haemolytic anaemia and/or immune thrombocytopenia. *Transfus Med* 2006;16(6):397-402.

130. Barros MM, Yamamoto M, Figueiredo MS, Cancado R, Kimura EY, Langhi DM, Jr., et al. Expression levels of CD47, CD35, CD55, and CD59 on red blood

cells and signal-regulatory protein- α , β on monocytes from patients with warm autoimmune hemolytic anemia. *Transfusion* 2008.

131. Toriani-Terenzi C, Fagiolo E. IL-10 and the cytokine network in the pathogenesis of human autoimmune hemolytic anemia. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1051:29-44.

132. Filippi CM, von Herrath MG. IL-10 and the resolution of infections. *J Pathol* 2008;214(2):224-30.

133. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol* 2008;180(9):5771-7.

134. Ji XH, Yao T, Qin JC, Wang SK, Wang HJ, Yao K. Interaction between M-CSF and IL-10 on productions of IL-12 and IL-18 and expressions of CD14, CD23, and CD64 by human monocytes. *Acta Pharmacol Sin* 2004;25(10):1361-5.

135. Hirano T, Yonekubo I, Shimo K, Mizuguchi J. CD27 synergizes with CD40 to induce IgM, IgG, and IgA antibody responses of peripheral blood B cells in the presence of IL-2 and IL-10. *Immunol Lett* 2003;89(2-3):251-7.

136. Ling NR, Brown B, Hardie D. Production of immunoglobulins by human sIgD⁺ and sIgD⁻ human blood B lymphocytes in response to stimulation with activated T cells and agonistic antibodies; effect of IL-10, IL-2 and mode of activation of T cells. *Clin Exp Immunol* 1995;101(2):369-75.

137. Spittler A, Schiller C, Willheim M, Tempfer C, Winkler S, Boltz-Nitulescu G. IL-10 augments CD23 expression on U937 cells and down-regulates IL-4-driven CD23 expression on cultured human blood monocytes: effects of IL-10 and other cytokines on cell phenotype and phagocytosis. *Immunology* 1995;85(2):311-7.

138. Kirkby KA, Adin CA. Products of heme oxygenase and their potential therapeutic applications. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;290(3):F563-71.
139. Furuyama K, Kaneko K, Vargas PD. Heme as a magnificent molecule with multiple missions: heme determines its own fate and governs cellular homeostasis. *Tohoku J Exp Med* 2007;213(1):1-16.
140. Bach FH. Heme oxygenase-1 and transplantation tolerance. *Hum Immunol* 2006;67(6):430-2.
141. Dijkstra G, Blokzijl H, Bok L, Homan M, van Goor H, Faber KN, et al. Opposite effect of oxidative stress on inducible nitric oxide synthase and haem oxygenase-1 expression in intestinal inflammation: anti-inflammatory effect of carbon monoxide. *J Pathol* 2004;204(3):296-303.
142. Deramaudt TB, da Silva JL, Remy P, Kappas A, Abraham NG. Negative regulation of human heme oxygenase in microvessel endothelial cells by dexamethasone. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999;222(2):185-93.
143. Janka GE. Hemophagocytic syndromes. *Blood Rev* 2007;21(5):245-53.
144. Liu SQ, Alkema PK, Tieche C, Tefft BJ, Liu DZ, Li YC, et al. Negative regulation of monocyte adhesion to arterial elastic laminae by signal regulatory protein alpha and Src homology 2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase-1. *J Biol Chem* 2005;280(47):39294-301.
145. Ide K, Wang H, Tahara H, Liu J, Wang X, Asahara T, et al. Role for CD47-SIRPalpha signaling in xenograft rejection by macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(12):5062-6.

146. Takenaka K, Prasolava TK, Wang JC, Mortin-Toth SM, Khalouei S, Gan OI, et al. Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells. *Nat Immunol* 2007;8(12):1313-23.