

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E PATOLOGIA

MATHEUS VICTOR DE SOUZA LAURENTINO

**PADRONIZAÇÃO DE ENSAIOS DE APOPTOSE E EFEROCITOSE *IN VITRO* NO
LABORATÓRIO DE IMUNOFARMACOLOGIA - UFPB**

JOÃO PESSOA

2024

MATHEUS VICTOR DE SOUZA LAURENTINO

**PADRONIZAÇÃO DE ENSAIOS DE APOPTOSE E EFEROCITOSE *IN VITRO* NO
LABORATÓRIO DE IMUNOFARMACOLOGIA - UFPB**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Biomedicina do
Departamento de Fisiologia e Patologia da
Universidade Federal da Paraíba como
requisito obrigatório para obtenção de
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora Profa. Dra. NAIARA NAIANA DEJANI

JOÃO PESSOA

2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

L383p Laurentino, Matheus Victor de Souza.

Padronização de ensaios de apoptose e eferocitose in vitro no Laboratório de Imunofarmacologia - UFPB / Matheus Victor de Souza Laurentino. - João Pessoa, 2024.

52 f. : il.

Orientadora : Naiara Naiana Dejani.
TCC (Graduação) - UFPB/CCS.

1. Apoptose. 2. Eferocitose. 3. Macrófagos. 4. HL-60. 5. Raw264.7. I. Dejani, Naiara Naiana. II. Título.

UFPB/CCS

CDU 612.67

MATHEUS VICTOR DE SOUZA LAURENTINO

**PADRONIZAÇÃO DE ENSAIOS DE APOPTOSE E EFEROCITOSE *IN VITRO* NO
LABORATÓRIO DE IMUNOFARMACOLOGIA - UFPB**

DATA DE APROVAÇÃO 18/04/2024

BANCA EXAMINADORA

NAIARA NAIANA DEJANI

Documento assinado digitalmente



NAIARA NAIANA DEJANI

Data: 07/05/2024 18:50:54-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

DOUTORADO
UFPB

RENATO ANTONIO DOS SANTOS OIVEIRA

Documento assinado digitalmente



RENATO ANTONIO DOS SANTOS OLIVEIRA

Data: 07/05/2024 19:52:17-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

DOUTORADO
UFPB

FRANCISCO ALLYSSON ASSIS FERREIRA GADELHA

Documento assinado digitalmente



FRANCISCO ALLYSSON ASSIS FERREIRA GADELHA

Data: 07/05/2024 17:26:55-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

DOUTORADO

UFPB

*Dedico esse trabalho ao meu avô,
Elias Laurentino, que ficou mais
feliz que eu quando entrei na
universidade.*

AGRADECIMENTOS

A conclusão desse curso assim como o desenvolvimento deste trabalho contou com o apoio de diversas pessoas, aqui meus agradecimentos.

A minha família que me incentivaram a sempre estudar e buscar novos caminhos, os meus caminhos. A meus amigos, que são minha segunda família, e tornaram a caminhada mais leve.

A minha orientadora, Profa. Dra. Naiara Naiana Dejani, por toda a paciência, dedicação e carinho para me ensinar muito desde 2020, por todas as oportunidades de crescimento profissional e pessoal.

A toda a equipe do Laboratório de Imunofarmacologia (LYMFA), especialmente a nossa coordenadora Dra. Marcia Regina Piuvezam e nosso técnico Dr. Francisco Allysson Gadelha.

A toda equipe do Laboratório de Imunologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP Araraquara por todo auxílio no estudo da eferocitose, em especial a profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros, Letícia de Aquino Penteado, Breno Vilas Boas e Ludmilla Silva.

A equipe toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular (LABIMOL), especialmente as técnicas Fabrine Hilário e Sandrelli Meridiana por toda ajuda.

Aos professores da graduação em Biomedicina da Universidade Federal da Paraíba. Dentre os quais se destacam os que incentivaram a minha curiosidade e foram essenciais para minha formação como biomédico, cito os professores Augusto Freitas Junior, Gisely Abilio, Vinicius Perez, Fabio Marcel, Temilce Simões, Nadja Correia, Wallace Bolhem, Renato Oliveira e Joelma Rodrigues.

As minhas amigas Maria Caroline e Helena Alves que estão comigo desde o primeiro período de curso. Obrigado pela amizade, parceria, todos as horas estudando e surtando para provas.

Agradeço as agências de fomento à pesquisa e de promoção estudantil CNPq, MCTI, FAPESP, FAPESQ, PROPESQ/UFPB, PRAPE/UFPB.

Amar e mudar as coisas me interessa mais...

Alucinação, Belchior.

RESUMO

Organismos multicelulares necessitam eliminar células disfuncionais, senescentes, infectadas ou danificadas, para isso existem diversas formas de morte celular programada. A apoptose é uma dessas formas de morte, o processo de apoptose se inicia por duas vias que convergem para ativação de caspases efetoras. A caspase-3 efetora levará a clivagem de diversas proteínas que promovem a morte por apoptose. As células apoptóticas (ACs) são rapidamente removidas por fagócitos em um processo chamado de eferocitose. Esse processo é essencial para manutenção da homeostasia tecidual, e defeitos na eferocitose foram associados ao desenvolvimento de diversas doenças inflamatórias e autoimunes. Desta forma, nesse trabalho padronizamos a geração de células apoptóticas por irradiação ultravioleta C (UVC) e ensaio de eferocitose por macrófagos. As células da linhagem HL-60 foram irradiadas com UVC por cinco minutos e incubadas por duas ou quatro horas antes das análises da viabilidade celular e da taxa de apoptose. A redução da viabilidade celular, o aumento da exposição da fosfatidilserina, avaliada pela marcação com Anexina-V, e a ativação da caspase-3 foram mais expressivas no tempo de 4h após a irradiação, sendo este o tempo utilizado para a geração de células HL-60 apoptóticas para os ensaios de eferocitose. Ao co-cultivar as células HL-60 apoptóticas (AC) com macrófagos da linhagem Raw 264.7 (Mac), observamos que os macrófagos foram capazes de eferocitar as ACs, apresentando média de 61% de eferocitose na proporção de 3 ACs: 1 Mac, e 90% na proporção de 5 ACs: 1 Mac. Assim, padronizamos com êxito a geração de células HL-60 apoptóticas e demonstramos que os macrófagos da linhagem Raw 264.7 são capazes de realizar a eferocitose. Portanto, a partir deste trabalho será possível desenvolver projetos acerca do processo de eferocitose *in vitro* permitindo que o laboratório de imunofarmacologia avalie o potencial imunomodulador de diversos compostos com ação promissora em modelos de inflamação, eferocitose e reparo tecidual.

PALAVRAS-CHAVE: apoptose; eferocitose; macrófagos. HL-60. Raw 264.7.

ABSTRACT

Multicellular organisms require the elimination of dysfunctional, senescent, infected, or damaged cells, and various forms of programmed cell death facilitate this process. Apoptosis represents one of these mechanisms, initiating through two converging pathways that activate effector caspases. Effector caspase-3 initiates the cleavage of several proteins that promote death by apoptosis. Apoptotic cells (ACs) are promptly cleared by phagocytes in a process called efferocytosis, which is crucial for maintaining tissue homeostasis. Deficiencies in efferocytosis have been associated with the development of inflammatory and autoimmune diseases. In this study, we standardized the generation of apoptotic cells through ultraviolet C (UVC) irradiation and assessed the efferocytosis by macrophages. HL-60 cells were exposed to UVC for five minutes and then incubated for two or four hours before evaluating cell viability and apoptosis. Reduced cell viability, increased phosphatidylserine exposure (detected by Annexin-V labeling), and caspase-3 activation were prominent at 4 hours post-irradiation, indicating an optimal time for generating apoptotic HL-60 cells for efferocytosis assays. When co-culturing apoptotic HL-60 cells (ACs) with Raw 264.7 cells (Mac), we noted that macrophages effectively efferocytosed the ACs, with an average efferocytosis of 61% in the 3 ACs:1 Mac condition, and 90% in the 5 ACs:1Mac condition. Herein, we demonstrate a successful protocol for HL-60 apoptosis and efferocytosis by Raw 264.7 cells. Therefore, from this work it will be possible to develop projects about the in vitro efferocytosis process, allowing the immunopharmacology laboratory to evaluate the immunomodulatory potential of several compounds with promising action in mode of inflammation, efferocytosis and tissue repair.

Keywords: apoptosis; efferocytosis; macrophages; HL-60; Raw 264.7.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais tipos de morte celular programada.

Figura 2. Ilustração do processo de apoptose, mostrando a via intrínseca e a extrínseca resultando na ativação de caspases efetoras 3/6/7.

Figura 3. Ilustração do processo de reconhecimento e remoção de células apoptóticas por fagócitos.

Figura 4. Irradiação UVC reduz a viabilidade celular nas linhagens HL-60 e RAW

Figura 5. Estratégia de seleção da população de interesse e análise da citometria da apoptose

Figura 6. Porcentagem de marcação com Anexina-V e FVS450 em células HL-60 irradiadas e incubadas por 2h.

Figura 7. Porcentagem de marcação com Anexina-V e FVS450 em células HL-60 irradiadas e incubadas por 4h.

Figura 8. Histogramas representativos da avaliação de caspase-3 após a indução da apoptose por citometria de fluxo.

Figura 9. Irradiação UVC promove ativação da caspase-3 após a irradiação UVC nos tempos de incubação de 2h e 4h.

Figura 10. Irradiação UVC favorece a apoptose precoce em neutrófilos-*like*.

Figura 11. Irradiação UVC induz a ativação da caspase-3 em neutrófilos-*like*.

Figura 12. Fotos representativas de microscopia ótica após 18h de eferocitose.

Figura 13. Estratégia de seleção da população para análise da eferocitose por citometria de fluxo.

Figura 14. Porcentagem de eferocitose de ACs-CFSE⁺ por macrófagos CD18⁺ co-cultura contendo 3 ACs: 1 macrófago.

Figura 15. Porcentagem de eferocitose de ACs-CFSE⁺ por macrófagos CD18⁺ co-cultura contendo 5 ACs: 1 macrófago.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACs - Células apoptóticas

APAF1 - Fator ativador de protease apoptótica 1

ATP - adenosina trifosfato

BB - *Binding Buffer*

BSA – Albumina do soro bovino

CFSE - Carboxifluoresceína succinimidil éster

DAMPS - Padrões moleculares associados a danos

DCs - Células dendríticas

DISC – Complexo de sinalização indutor de morte

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

FASL – FAS ligante

FVS450 – *Fixable Viability Stain 450*

IL - Interleucina

LES – Lúpus eritematoso sistêmico

M1 – Macrófago classicamente ativados

M2 - Macrófagos alternativamente ativados

Mac – Macrófago

MFGE8 - Fator 8 do glóbulo de gordura do leite

MHC I – Complexo maior de histocompatibilidade classe I

MHC II – Complexo maior de histocompatibilidade classe II

PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos

PFA - Paraformaldeído

PGE2 - Prostaglandina E2

PGs – Prostaglandinas

PI – Iodeto de propídio

RAW - Macrófago murino Raw 264.7

SMAC – Segundo ativador mitocondrial de caspase

TGF- β - Fator transformador de crescimento β

TNF- α - Fator de necrose tumoral α

TNFR - Receptor do fator de necrose tumoral

UV – Ultravioleta

UVC – Ultravioleta C

VEFG – Fator do crescimento do endotélio vascular

OBS: as abreviaturas e os símbolos utilizados neste trabalho que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são de convenções adotadas universalmente.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1 Morte celular por apoptose.....	16
2.2 Depuração de células mortas por eferocitose.....	19
2.3 Papel dos macrófagos na depuração de células mortas e em outros processos imunológicos.....	22
3 OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivos gerais.....	24
3.2 Objetivos específicos.....	24
4 METODOLOGIA.....	25
4.1 Cultivo das células.....	25
4.2 Indução da apoptose em células HL-60 e Neutrófilos-like.....	25
4.3 Avaliações da viabilidade celular após indução da apoptose.....	25
4.4 Avaliação da apoptose por citometria de fluxo.....	26
4.5 Avaliação da apoptose de células Neutrófilo-like.....	26
4.6 Marcação das células apoptóticas para os ensaios de eferocitose..	27
4.7 Ensaio de eferocitose.....	27
4.8 Citometria de fluxo.....	27
4.9 Análise estatística.....	28
5 RESULTADOS.....	29
5.1 Viabilidade celular após irradiação UVC.....	29
5.2 Avaliação da taxa de apoptose em células HL-60 irradiadas com UVC.....	30

5.3 Avaliação da ativação de caspase-3 em células HL-60 irradiadas com UVC.....	34
5.4 Avaliação da indução da apoptose em neutrófilos- <i>like</i>	36
5.5 Ativação de caspase-3 em neutrófilos- <i>like</i> após indução da apoptose por UVC.....	37
5.6 Eferocitose de células HL-60 apoptóticas por macrófagos Raw 264.7.....	38
6 DISCUSSÃO.....	43
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48
REFERÊNCIAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

A morte celular programada é fundamental durante o desenvolvimento de organismos multicelulares. A remoção de células funcionalmente dispensáveis, senescentes, infectadas ou danificadas, é indispensável para homeostasia, defesa contra infecções, defesa contra o desenvolvimento de câncer e diversas doenças (Arya, et al., 2015; Bedoui, et al., 2020; Pilátová, et al., 2023; Shkarina, et al., 2024). Os principais tipos de morte celular programada podem ser divididos em dois grupos: a morte lítica, como necroptose e piroptose, e a morte não lítica, como a apoptose (Newton et al., 2024).

A apoptose é uma morte celular programada mais comum durante o desenvolvimento embrionário e processos fisiológicos dentro da homeostase que requer morte de células, por exemplo, durante a maturação e seleção de linfócitos T e B (Bertheloot, et al., 2021). Considerada uma morte celular silenciosa e não inflamatória com danos mínimos aos tecidos, pois durante o processo de apoptose ocorre a desintegração coordenada e formação de detritos celulares, os corpos apoptóticos, e não ocorre a liberação de componentes celulares que induziriam a uma resposta inflamatória, como os padrões moleculares associados a danos (DAMPs). Além de não liberar os DAMPs, as células e corpos apoptóticos são rapidamente removidas por fagócitos (Behar et al., 2019; Bedoui, et al., 2020; Boada-Romero et al., 2020).

A remoção fagocítica de células mortas ou morrendo é um processo chamado de eferocitose, a palavra eferocitose deriva do Latim onde “*Effere*” significa levar à tumba (Boada-Romero et al., 2020; Ge, et al., 2022; Kumar, et al., 2016;). A eferocitose é fundamental para manutenção da homeostasia em condições fisiológicas e para o reparo de danos teciduais causados por processos patológicos (Doran, et al., 2020). Esse processo tem papel crucial na finalização da inflamação, além da remoção de células em processo de morte celular programada, que impede uma eventual necrose secundária com liberação de DAMPs.

A eferocitose de células apoptóticas induz a liberação de citocinas anti-inflamatórias e reduz a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Elliot et al., 2017; Zhong, et al., 2018). Também, para que ocorra o fim do processo inflamatório e o

retorno a homeostasia, as células pró-inflamatórias que infiltram os tecidos durante a inflamação, como os neutrófilos, são induzidas a apoptose e removidas por macrófagos via eferocitose (Duarte, et al., 2022).

Eferocitose defeituosa ou comprometida foi associada com o desenvolvimento de diversos distúrbios inflamatórios e de autoimunidade como aterosclerose e lúpus eritematoso sistêmico (Boada-Romero et al.; 2020; Tajbakhsh, et al., 2019; Tajbakhsh, et al., 2020). Também, estudos emergentes relatam a participação do processo de eferocitose em processos infecciosos (Dejani, et al., 2018; Martin, et al., 2014; Karaji, et al., 2017; Salina, et al., 2022; Salina, et al., 2024). Assim, considerando o papel dos processos de apoptose e eferocitose das células apoptóticas para o desenvolvimento, e manutenção da homeostasia do organismo, e que sua desregulação está relacionada com diversas doenças, é de grande interesse estudar esse processo e desenvolver formas de melhorar respostas defeituosas para enfrentamento de diversas doenças.

Desta forma, nesse trabalho o objetivo foi de padronizar as técnicas de indução de apoptose e ensaios de eferocitose no Laboratório de Imunofarmacologia do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (LYMFA - IPeFarM) da Universidade Federal da Paraíba. A partir desse trabalho, será possível reproduzir os protocolos para a geração de células apoptóticas e ensaios para estudo da eferocitose, no contexto do laboratório de imunofarmacologia, onde avaliamos o efeito de diversas moléculas sobre processos imunológicos poderemos explorar o efeito dessas moléculas sobre os processos de apoptose e eferocitose, e sua na ativação no reparo tecidual e na atividade anti-inflamatória.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Morte celular por apoptose

A apoptose é um tipo de morte celular programada (figura 1) que ocorre durante o desenvolvimento e para manutenção da homeostasia tecidual. Esse tipo de morte celular, participa de muitos processos fisiológicos como na seleção imune de células B e T (Nagata et al., 2017).

Figura 1. Principais tipos de morte celular programada.

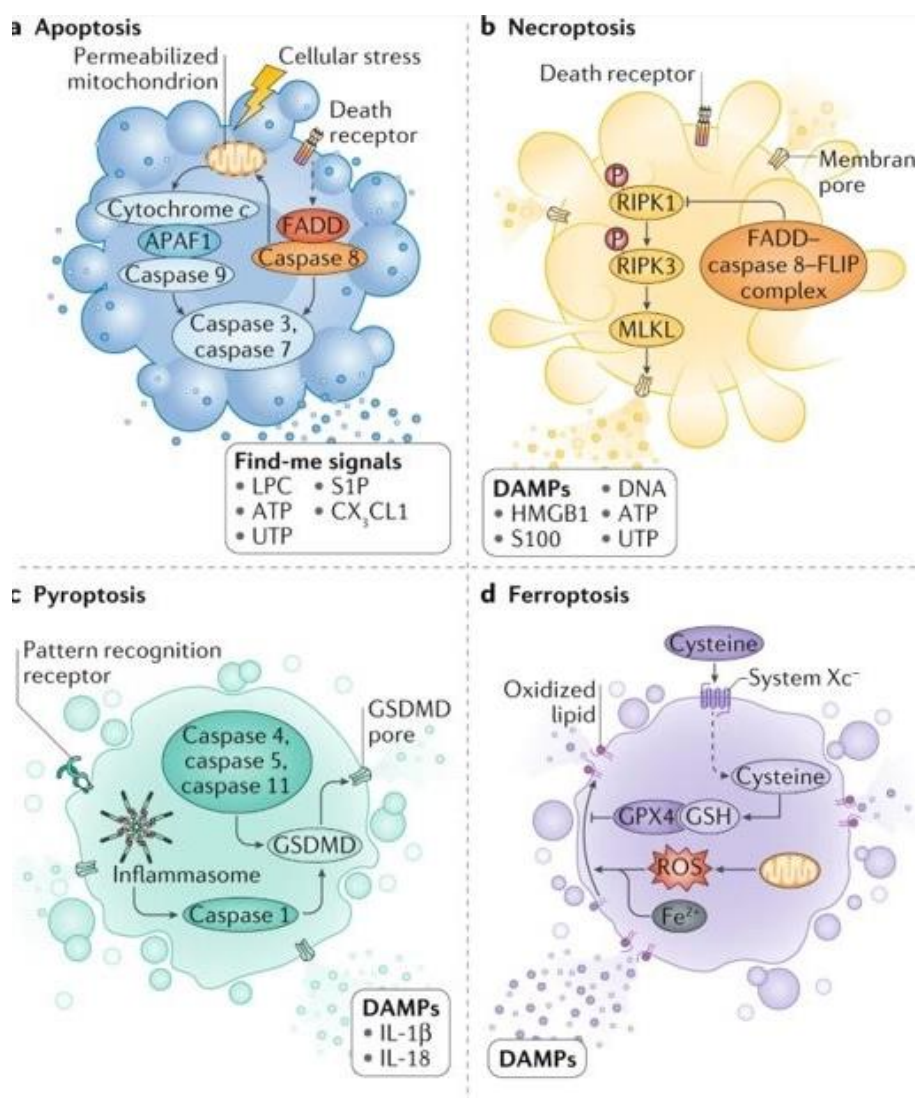


Ilustração dos principais tipos de morte celular programada, destacando apoptose (A), necroptose (B), piroptose (C) ferroptose (D). Fonte: Doran, et al., 2020.

Na apoptose, ocorre uma demolição coordenada da estrutura celular, com a condensação da cromatina, fragmentação do DNA, e formação de corpos apoptóticos (Bedoui, et al., 2020). Como ilustrado na figura 2, o processo de apoptose é mediado por caspases, que são cisteíno proteases, produzidas como zimogênios inativos e são altamente conservadas ao longo da evolução, essas proteases estão envolvidas em diversos processos de morte celular programada e respostas inflamatórias (Van Opdenbosch, et al., 2019). O processo de apoptose pode ser iniciado por duas vias, intrínseca e extrínseca. Primeiro ocorre ativação de caspases iniciadoras, caspases 8 ou 9, e ambas as vias convergem para a ativação de caspases efetoras, como as caspases 3, 6 ou 7 (Bedoui, et al., 2020; Van Opdenbosch, et al., 2019; Singh, et al., 2019).

A via intrínseca é ativada com a redução dos fatores de crescimento, retirada de nutrientes, hormônios esteroides, agentes citotóxicos e acúmulo de estresse celular (Bedoui, et al., 2020; Singh, et al., 2019). Nessa via, ocorre um aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas BH3, que incluem a proteína moduladora da apoptose regulada por p53 (PUMA), que se ligam e inibem as proteínas pró-sobrevivência da família BCL-2, quando todas essas proteínas pró-sobrevivência estão inibidas, a proteína X associada a BCL-2 (BAX) e/ou antagonista BCL-2 (BAK) (Singh, et al., 2019). A ativação de BAX/BAK permite sua migração e oligomerização na membrana mitocondrial, formando poros de violação na membrana mitocondrial chamados de MOMP, esses poros permitem a liberação de proteínas mitocondriais pró-apoptóticas como o citocromo C e Segundo ativador mitocondrial de caspase (SMAC) codificado em humanos pelo gene DIABLO (O'Neill, et al., 2016). O citocromo C liga-se ao fator ativador de protease apoptótica 1 (APAF1) e a pró-caspase 9 no citosol formando o apoptossomo, uma plataforma de ativação da pró-caspase 9 em caspase 9 ativada que irá ativar as caspases efetoras 3/7 (Boatright, et al., 2003; Tummers, et al., 2022).

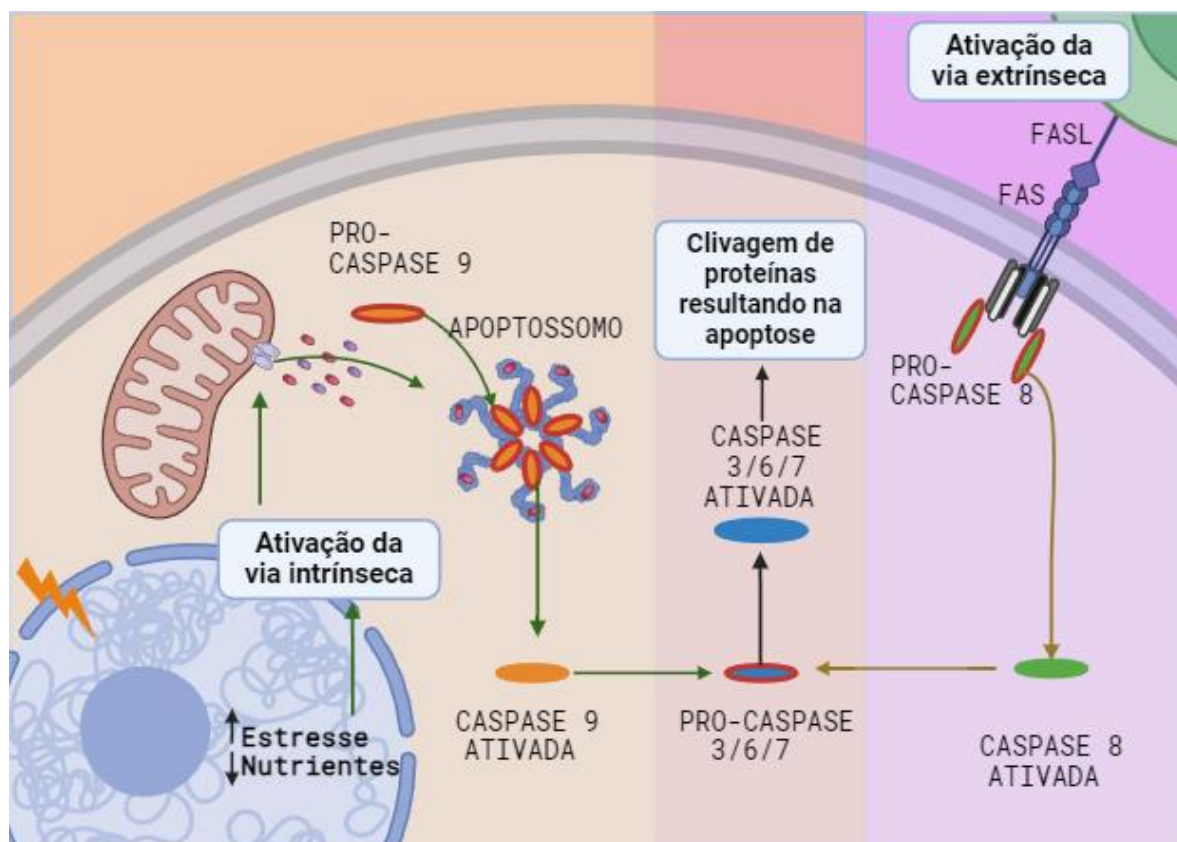
A via extrínseca é iniciada pela ativação do receptor de morte celular, como o receptor tipo FAS ou receptor do fator de necrose tumoral (TNFR), esses receptores apresentam domínio intracelular que recruta a proteína adaptadora FADD, proteína da morte associada ao FAS, ou a proteína adaptadora TRADD, proteína da morte associada ao TNFR (Bertheloot, et al., 2021). Na ativação do receptor FAS pela ligação do FASL, ocorre o recrutamento da proteína adaptadora FADD, a adaptadora

permite ligação da a pró-caspase 8 formando o complexo de sinalização indutor de morte (DISC) (Ang, et al., 2018; Bertheloot, et al., 2021). Esse complexo DISC permite a ativação da caspase 8, essa caspase ativa diretamente as caspases efetoras 3/7. Também a caspase 8, ativa a proteína da família BH3 pró-apoptótica BID em tBID essa proteína ativada é capaz de levar a apoptose por via mitocondrial, como ocorre na via intrínseca (Billen, et al., 2009).

A ativação das caspases efetoras, como as caspases 3/7, levam a clivagem de diversas proteínas causando as mudanças na estrutura celular resultando por fim na formação dos corpos apoptóticos (Bedoui, et al., 2020). Entre as mudanças que ocorrem durante o processo de apoptose está a externalização de um glicerofosfolípídeo de membrana, a fosfatidilserina. A fosfatidilserina em células vivas fica restrita a camada interna da membrana plasmática, essa distribuição assimétrica é mantida por ação de proteínas transmembranas, as flipases dependentes de ATP (ATP11A e ATP11C) (Kawano, et al., 2018). Durante o processo de apoptose a caspase 3 efetora é responsável por clivar a flipase, a inativando e permitindo que a fosfatidilserina fique na camada externa da membrana, além disso, a caspase 3 faz a clivagem da porção N-terminal de *scramblases* dependentes de caspase, levando a sua ativação, essas proteínas embaralham os fosfolípidos de membrana aumentando a externalização da fosfatidilserina (Bedoui, et al., 2020; Kawano, et al., 2018).

A apoptose é uma das principais formas de morte celular e está envolvida em diversos processos biológicos. Contudo, quando se analisa tecidos dificilmente se encontra células apoptóticas, pois essas são rapidamente removidas por fagócitos em um processo chamado de eferocitose (Doran, et al., 2020).

Figura 1. Ilustração do processo de apoptose, mostrando a via intrínseca e a extrínseca resultando na ativação de caspases efetoras 3/6/7.



Fonte: Autoria própria, 2024.

A apoptose pode ocorrer por duas vias, intrínseca e extrínseca, que convergem para ativação das caspases efetoras 3, 6 e 7, essas efetoras clivaram outras proteínas resultando na apoptose celular. A via extrínseca é ativada pela ligação do FAS ligante ao receptor de morte celular FAS, que ativa uma cascata intracelular que resulta na ativação da caspase 8, essa caspase ativa as caspase efetoras. Na via intrínseca, o aumento do estresse celular, como danos ao DNA, acúmulo de espécies reativas de oxigênio, proteínas mal dobradas entre outros, e a redução de fatores de crescimento e nutrientes levam a célula a induzir a ativação da via, em que ocorre a permeabilização de mitocôndrias, liberação de fatores apoptóticos mitocondriais como o citocromo C, que participa da formação do apoptossomo e ativação da pró-caspase 9, a caspase 9 ativa cliva as caspases efetoras. Ilustração criada com recursos da plataforma BioRender (Biorender.com).

2.2 Depuração de células mortas por eferocitose

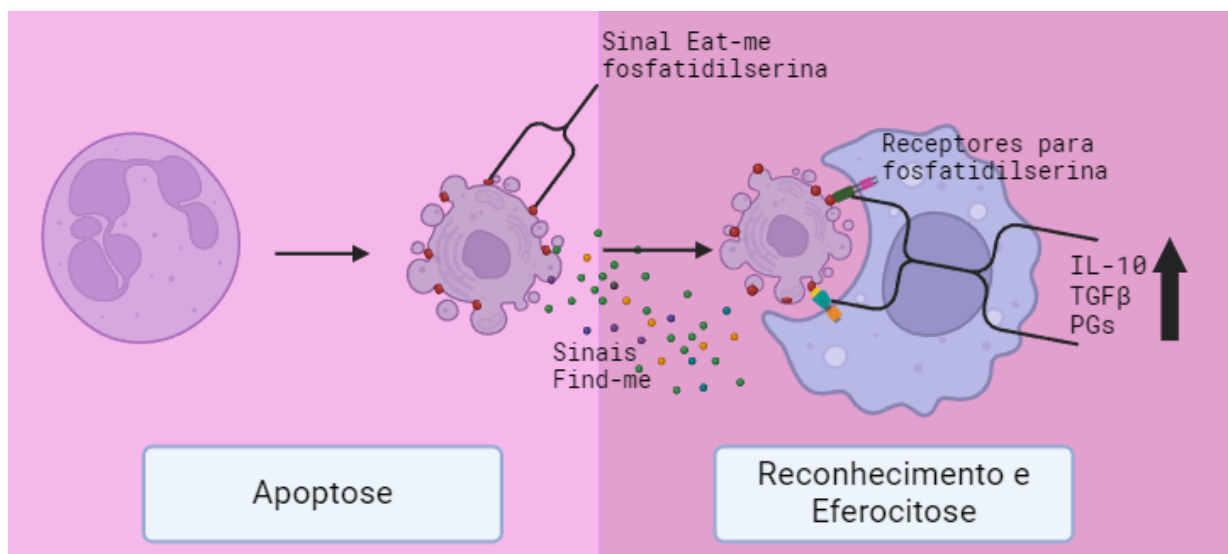
Estima-se que um humano adulto tenha cerca de 37,2 trilhões de células (Bianconi, et al., 2013). Dessas, aproximadamente 300 bilhões de células morrem

todos os dias em processos homeostáticos, e esse montante de células mortas pode aumentar em processos patológicos (Marioka, et al., 2019). Essas células mortas são removidas dos tecidos por eferocitose, acredita-se que esse processo é extraordinariamente rápido e eficiente, pois a detecção de células apoptóticas nos tecidos é muito rara (Doran, et al., 2020; Elliot et al., 2016; Marioka, et al., 2019).

Durante o processo de apoptose, as células liberam sinais *Find-me*, que são moléculas como quimiocinas, mediadores lipídicos, nucleotídeos e fosfolipídeos, que atraem quimiotaticamente fagócitos para a eliminação dessas células apoptóticas (Mao, 2021). Entre as moléculas liberadas está a adenosina trifosfato (ATP), esfingosina-1-fosfato, lisofosfatidilcolina e quimiocinas como CXCL3 (fractacina) (Tajbakhsh, et al., 2020). Os fagócitos reconhecem sinais *Eat-me* na membrana das células apoptóticas, sendo o principal a fosfatidilserina. Diversos receptores presentes nos fagócitos fazem o reconhecimento direto ou indireto da fosfatidilserina das células mortas. Os receptores TIM 1, 3 e 4, CD300f, estabilina 1 e 2 fazem o reconhecimento direto da fosfatidilserina, os receptores MERTK e integrina $\alpha\text{v}\beta 5$ reconhecem a fosfatidilserina pela ligação de moléculas ponte como a proteína S e fator 8 do glóbulo de gordura do leite (MFGE8) (Boada-Romero, et al., 2020). Após o reconhecimento da célula apoptótica ocorre a internalização, ou seja, sua eferocitose, esse processo de internalização envolve a via de sinalização da família RHO de GTPases, incluído a RAC1 (Mao, 2021). Após a internalização a célula apoptótica será degradada dentro do fagossomo, ocorre a acidificação do fagossomo e fusão com lisossomos contendo diversas lipases, nucleases e proteases para a digestão das células apoptóticas (Ge, et al., 2022). As principais células responsáveis pelo processo de eferocitose são os fagócitos profissionais como macrófagos e células dendríticas, também fagócitos não profissionais como células epiteliais, células endoteliais entre outras, são capazes de realizar a eferocitose (Arandjelovic, et al., 2015).

O reconhecimento por macrófagos via sinal *Eat-me* e a eferocitose, de células apoptóticas induz a liberação de mediadores anti-inflamatórios como prostaglandinas e citocinas anti-inflamatórias como interleucina-10 (IL-10) e fator transformador de crescimento β (TGF- β) (Figura 3), além de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e fator de necrose tumoral α (TNF- α) (Boada-Romero, et al., 2020; Bedoui, et al., 2020; Szondy, et al., 2017).

Figura 3. Ilustração do processo de reconhecimento e remoção de células apoptóticas por fagócitos.



Fonte: Autoria própria, 2024.

Após a apoptose, as células mortas liberam sinais *Find-me* que são moléculas que atraem quimiotaticamente os fagócitos para realizar sua eliminação. Os fagócitos reconhecem nas células apoptóticas os sinais *Eat-me* como a fosfatidilserina, que é reconhecida por diversos receptores, diretamente e indiretamente com auxílio de moléculas ponte. O reconhecimento da fosfatidilserina e consequentemente a eferocitose da célula apoptótica leva ao aumento de mediadores anti-inflamatórios como as citocinas IL-10, TGF-β e prostaglandinas (PGs). Ilustração criada com recursos da plataforma BioRender (Biorender.com).

Defeitos no processo de eliminação de células mortas por eferocitose está associado com o desenvolvimento de muitas doenças autoimunes e inflamatórias. Os corpos apoptóticos que não são devidamente eferocitados podem levar a inflamação, causar danos aos tecidos e disfunção de órgãos (Boada-Romero, et al., 2020). O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é o principal distúrbio de autoimunidade associado com defeitos na eferocitose, foi relatado que pacientes com LES apresentaram o acúmulo de células mortas no sangue, na pele e gânglios linfáticos (Liu, et al., 2012). A aterosclerose é uma doença crônica e progressiva arterial, promovida pelo acúmulo de lipídeos na camada interna das artérias, foi reportado que a depuração defeituosa de células mortas permite a sua necrose secundária e consequentemente a estimulação de resposta pró-inflamatória, que beneficia a progressão da doença (Tajbakhsh, et al., 2020). Também, foi demonstraram que a eferocitose de células infectadas modulam a resposta imune do patógeno, a eferocitose de células

infectadas com *Citrobacter rodentium* por células dendríticas resulta na ativação de linfócitos T CD4⁺ induzindo a diferenciação para perfil Th17 (Dejani, et al., 2018; Torchinsky, et al., 2009).

2.3 Papel dos macrófagos na depuração de células mortas e em outros processos imunológicos

Os macrófagos são células do sistema imune que desempenham funções cruciais nas respostas imunes inata e adaptativa. Macrófagos teciduais são células essenciais na detecção de sinais nocivos, PAMPs e DAMPs, e liberação de diversos mediadores pró-inflamatórios fundamentais para a resposta inflamatória, como o TNF- α e IL-1 β liberados por macrófagos e que agem em células endoteliais aumentando a expressão de ligantes de moléculas de adesão (Shapouri-Moghaddam, et al., 2018). Além da detecção de danos e liberação de citocinas, os macrófagos desempenham funções importantes para a imunidade inata e adaptativa como a fagocitose e destruição de microrganismos, eferocitose de células apoptóticas e apresentação de antígenos para linfócitos T CD4⁺ através de molécula de histocompatibilidade principal de classe II e coestimuladores fundamentais para ativação dos linfócitos T CD4⁺, como CD80 e CD86 (Shapouri-Moghaddam, et al., 2018; Liebold, et al., 2021; Yunna, et al., 2020).

Os macrófagos residentes nos tecidos se originam durante o desenvolvimento embrionário ou podem ser derivados de monócitos que migraram do sangue para o tecido e se diferenciam em macrófagos, ocorrendo em condições fisiológicas ou inflamatórias (Honold, et al., 2018). Macrófagos residentes possuem características e funções especiais, recebendo nomenclatura diferente dependendo do tecido especializado, por exemplo, no sistema nervoso central são chamados de micróglia, nos pulmões de macrófagos alveolares, na pele de célula de Langherans, no tecido ósseo de osteoclastos, no fígado de células de Kupffer (Davies, et al., 2013). Ainda, os macrófagos apresentam alta plasticidade, com espectro de polarização entre dois extremos, os macrófagos classicamente ativados (M1) e os macrófagos alternativamente ativados (M2) (Chen, et al., 2021; Davies, et al., 2013; Italiani, et al.,

2014; Liebold, et al., 2021; Orecchioni, et al., 2019; Shapouri-Moghaddam, et al., 2018; Yunna, et al., 2020).

Os macrófagos M1 são considerados pró-inflamatórios atuando no combate a microrganismos e indução da inflamação, esses liberam diversos mediadores inflamatórios como IL-1, TNF- α , IL-6 e espécies reativas de oxigênio (Chen, et al., 2021; Feng, et al., 2014; Murray, et al., 2011). Os macrófagos M2 possuem alta capacidade de eferocitose, e liberam mediadores anti-inflamatórios e de pró-resolução como a IL-10, fator transformador de crescimento- β , prostaglandina E₂ (PGE₂) e fator de crescimento do endotélio vascular (VEFG), esses ainda apresentam supressão do fator de transcrição NF- κ B e consequentemente a redução da liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, TNF- α e IL-6 (Chen, et al., 2021; Elliot, et al., 2017; Feng, et al., 2014; Xu, et al., 2019).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Padronizar técnicas de indução de apoptose células HL-60 por irradiação ultravioleta e ensaios de eferocitose em co-cultura de células HL-60 apoptótica com macrófagos murinos RAW 264.7.

3.2 Objetivos Específicos:

- Verificar o efeito da irradiação UVC na viabilidade de células de linhagem HL-60 e RAW 264.7.
- Analisar a taxa de marcação de Anexina-V e corante de viabilidade em células HL-60 apoptóticas geradas por irradiação UVC;
- Determinar a taxa de apoptose por ativação de Caspase-3 em células HL-60 após irradiação UVC;
- Avaliar a taxa de apoptose de neutrófilos-*like* após indução por irradiação UVC.
- Investigar a taxa de eferocitose de macrófagos Raw 264.7 após co-cultivo com células HL-60 apoptóticas.

4 METODOLOGIA

4.1. Cultivo das células

Nesse estudo, foram utilizadas as células da linhagem Raw 264.7 (ATCC® No. TIB-71™) e da linhagem prómielocítica humana HL-60 (ATCC® No. CCL-240™). Células Raw 264.7 são leucócitos monócitos/macrófagos murinos e foram cultivados em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Invitrogen) suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de antibiótico, estreptomicina e penicilina. As células da linhagem humana prómielocítica (HL-60) foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Invitrogen) suplementados com 20% de soro bovino feral e 1% de gentamicina. O cultivo foi feito em garrafas estéreis para cultivo celular (75cm²), mantidos à temperatura de 37°C e atmosfera de 5% CO₂.

4.2. Indução da apoptose em células HL-60 e Neutrófilos-like

Com o objetivo de gerar células apoptóticas em número suficiente para os ensaios de eferocitose, padronizamos a indução da apoptose em células HL-60 por irradiação com ultravioleta C (UVC), as células foram plaqueadas na concentração de 1x10⁶ células/ml em placa de petri com volume total de 5ml, ou seja 5x 10⁶ células. As placas foram posicionadas sem tampa abaixo da lâmpada UVC germicida de 254nm (30w, GL, China) a 12cm de distância da lâmpada, a irradiação foi feita por 5 minutos, em seguida foi adicionado 5ml, as células foram incubadas por 2 ou 4 horas em estufa e depois avaliadas, de acordo com protocolo adaptado de Ampomah, et al., 2022; Gerlach, et al., 2021; Yurdagul, et al., 2020; Proto, et al., 2018; Subramanian et al., 2014.

4.3. Avaliação da viabilidade celular após indução da apoptose

Avaliamos o efeito da irradiação na viabilidade celular por ensaio colorimétrico de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), de acordo com o que foi descrito anteriormente por Mosmann (1983) e com modificações sugeridas por

Denizot e Lang (1986). As células da linhagem Raw 264.7 e HL-60 foram plaqueadas em placa de 96 poços com 5×10^4 células por poço em volume final de 100 μ L, as células foram irradiadas por 5 minutos, após a irradiação as células foram mantidas por 4h em estufa à temperatura de 37°C e atmosfera de 5% CO₂, após a incubação de apoptose foi feita a avaliação da viabilidade por ensaio de MTT.

4.4. Avaliação da apoptose por citometria de fluxo

Para avaliar a apoptose por citometria, após a irradiação as células foram mantidas por 2 e 4h em estufa de CO₂ à temperatura de 37°C, a porcentagem de morte celular (apoptose/necrose) foi avaliada por marcação com Anexina-V e marcador de viabilidade celular FVS450 (Thermo Fisher Scientific). A detecção da caspase-3 ativa (BD Biosciences) nas células irradiadas também foi avaliada por citometria de fluxo.

4.5. Avaliação da apoptose de células Neutrófilos-*like*

Adicionalmente, avaliamos a indução da apoptose por radiação ultravioleta em células HL-60 diferenciadas em neutrófilos-*like*. Para a diferenciação, as células HL-60 foram tratadas durante 72h com meio DMEM com 1,2% de dimetilsulfóxido (DMSO) para estimular sua maturação para mielócito, metamielócito, bastonete e por fim em segmentados (Collins, et al., 1978; Martin, et al., 1990). Após o tratamento de diferenciação, as células foram induzidas à apoptose por irradiação UVC seguidas de incubação por 4, e em seguida a porcentagem de apoptose foi avaliada por marcação de Anexina-V, e marcador de viabilidade celular FVS450, de acordo com instruções do fabricante. A porcentagem e mediana da intensidade de fluorescência (MFI) de detecção da caspase-3 ativa nas células irradiadas também foi avaliada por citometria de fluxo.

4.6. Marcação das células apoptóticas para os ensaios de eferocitose

Para os ensaios de co-cultura para eferocitose, após a indução da apoptose por irradiação as células HL-60 foram marcadas com carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE) (CellTrace CFSE, Kit, Life). Primeiro, as células foram expostas ao CFSE na concentração de 2 μ M e incubadas em estufa a 37°C e atmosfera de 5% CO₂, por 20 minutos. Após a incubação, as células foram coletadas, lavadas uma vez com tampão salina-fosfato (PBS), em seguida, foram fixadas com formaldeído (PFA) 4% em PBS por 15 minutos. Por fim, as células foram lavadas uma vez e mantidas em PBS até os experimentos de co-cultivo.

4.7. Ensaio de eferocitose

Para avaliar a porcentagem de eferocitose, os macrófagos murinos da linhagem Raw 264.7, foram co-cultivadas com células apoptóticas (ACs) por 18h, com a proporção de 3 ou 5 células apoptóticas para cada macrófago, as células HL-60 apoptóticas foram previamente marcadas com CFSE. Após o tempo de co-cultura (1 macrófago: 3 ou 5 ACs-CFSE), o meio foi retirado, para posteriores avaliações e os poços foram lavados com PBS, para remover as ACs não eferocitadas. Em seguida, os macrófagos foram coletados com *cell scraper*, lavados e marcados com anticorpos anti-CD16/CD32 (Fc-Block) e anti-CD18-PerCP-Cy5.5, e em seguida foram avaliados por citometria de fluxo. As células eferocíticas que fagocitaram ACs adquirem a marcação CFSE e desta forma, a porcentagem de eferocitose foi determinada pela análise da população de macrófagos duplo positiva CD18⁺CFSE⁺.

4.9. Citometria de fluxo

Para a marcação com Anexina-V-PE (Thermo Fisher Scientific) e marcador de viabilidade-FVS450 (Thermo Fisher Scientific), após o protocolo de irradiação UVC, as células foram coletadas, ressuspensas em *Binding Buffer* (BB) - tampão de ligação da Anexina-V que serve para aumentar sua afinidade pela fosfatidilserina, marcadas com FVS450 por 5 minutos, lavadas uma vez com PBS, ressuspensas

novamente em BB, marcadas com Anexina-V por 15 minutos, lavadas uma vez com BB, e fixadas com BB com PFA 4% por 15 minutos, lavadas e mantidas em BB refrigerado, até a aquisição no citômetro, podendo ser mantidas por até 5 dias a temperatura de 2-8°C.

Na marcação de caspase-3 ativa/clivada, as células foram fixadas e permeabilizadas por *Cytofix/Cytoperm* (BD Biosciences) seguindo recomendações do fabricante, foram bloqueadas com PBS com 2% de BSA por 1 hora, lavadas uma vez, e marcadas com anti-caspase-3 clivada- APC (BD Biosciences), seguindo recomendações do fabricante.

Para a avaliação da porcentagem de eferocitose, os macrófagos foram fixados com PBS com PFA 4% por 15 minutos a 4°C e posteriormente foi feito o bloqueio (anti-CD16/CD32, Fc-Block) com 10% de soro bovino fetal por 15 minutos a 4°C. Em seguida, as células foram marcadas com anticorpos anti-CD18-PerCP-Cy5.5 (BD Biosciences)

A aquisição foi feita em citometro de fluxo FACS CANTO II (BD Biosciences, EUA) ou CytoFLEX S (Beckman Coulter's, EUA). No mínimo 10.000 eventos por condição foram registrados.

4.10. Análise estatística

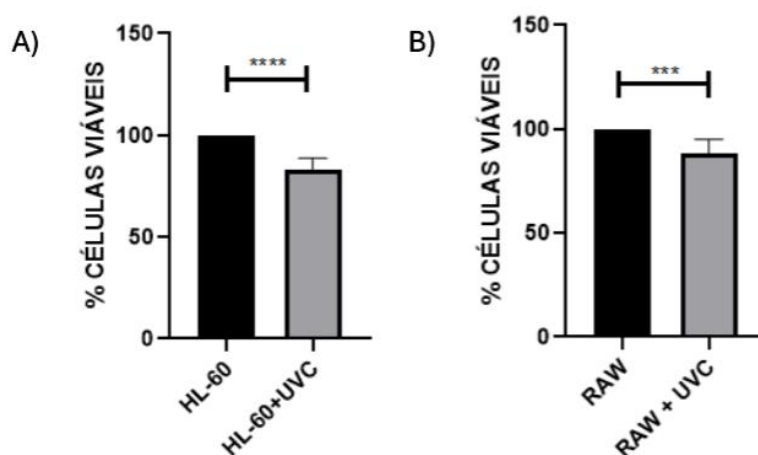
A análise dos dados de citometria de fluxo foi realizada no software FCS Express 5 (De Novo, EUA) e CytoExpert (Beckman Coulter's, EUA). Os dados apresentados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão. Os dados foram submetidos a teste de normalidade de Shapiro-Wilk, em seguida foi realizado o teste t de comparação entre os grupos, os resultados foram considerados significantes com $p < 0,05$. Para as análises foi utilizado o programa estatístico Prism versão 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

5 RESULTADOS

5.1. Viabilidade celular após irradiação UVC

A viabilidade celular foi avaliada após irradiação UVC em duas linhagens celulares diferentes, HL-60 e RAW 264.7, e após o protocolo de irradiação UVC houve redução significativa na viabilidade das células irradiadas quando comparado com células não irradiadas (Figura 4). Como a irradiação foi capaz de reduzir a viabilidade das duas linhagens, escolhemos a HL-60 para continuar os experimentos, pois trata-se de uma linhagem de células não aderentes, que são mais adequadas para a marcação de Anexina-V.

Figura 4. Irradiação UVC reduz a viabilidade celular nas linhagens HL-60 e RAW 264.7.



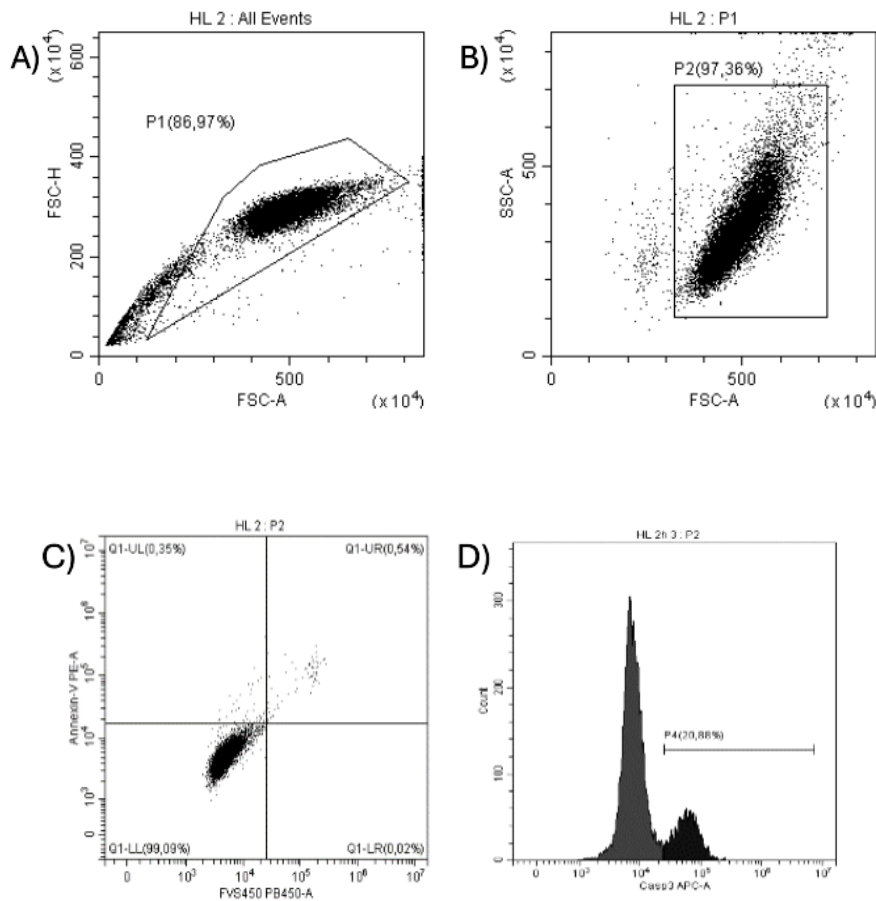
Fonte: Autoria própria, 2024.

As células HL-60 e RAW 264.7 foram irradiadas por UVC por 5 minutos, depois mantidas em estufa a 37°C por 4h, em seguida foi feito o ensaio de viabilidade celular por MTT. **A)** gráfico mostrando a redução porcentagem da viabilidade das celular da HL-60 após UVC (HL-60+UVC) em relação a células não irradiadas (HL-60). **B)** gráfico mostrando a redução porcentagem da viabilidade das células RAW 264.7 após UVC (RAW+UVC) em relação a células não irradiadas (RAW). Os grupos controle (HL-60 e RAW) não foram irradiados. Experimento realizado em triplicata. ***p<0,0001, ****p<0,00001.

5.2 Avaliação da taxa de apoptose em células HL-60 irradiadas com UVC

Para avaliar a apoptose, as células da linhagem HL-60 foram expostas a luz ultravioleta por 5 minutos, e em seguida incubadas em estufa a 37°C e atmosfera de 5% CO₂, por 2 ou 4 horas. Após o período de incubação, as células foram coletadas e incubadas com Anexina-V-PE para a marcação da fosfatidilserina, um fosfolípido de membrana que é externalizado durante a apoptose, e com o marcador de viabilidade celular FVS450 e analisadas por citometria (Figura 5). No período de 2 horas após a exposição ao UVC observa-se um aumento na porcentagem de células Anexina-V⁺, FVS450⁺ e Anexina-V⁺FVS450⁺ quando comparado as células não irradiadas (Figura 6). No entanto, após 4 horas de exposição ao UVC a porcentagem de células Anexina-V⁺, FVS450⁺ e Anexina-V⁺FVS450⁺ se torna mais expressiva quando comparado as células não irradiadas (Figura 7). Embora em ambos os períodos (2 ou 4h) após a irradiação observa-se aumento da taxa de apoptose celular, escolhemos o período de 4h para continuar os próximos experimentos, pois após esse período de incubação há uma maior porcentagem de células Anexina-V⁺ ou seja uma maior taxa de células apoptóticas.

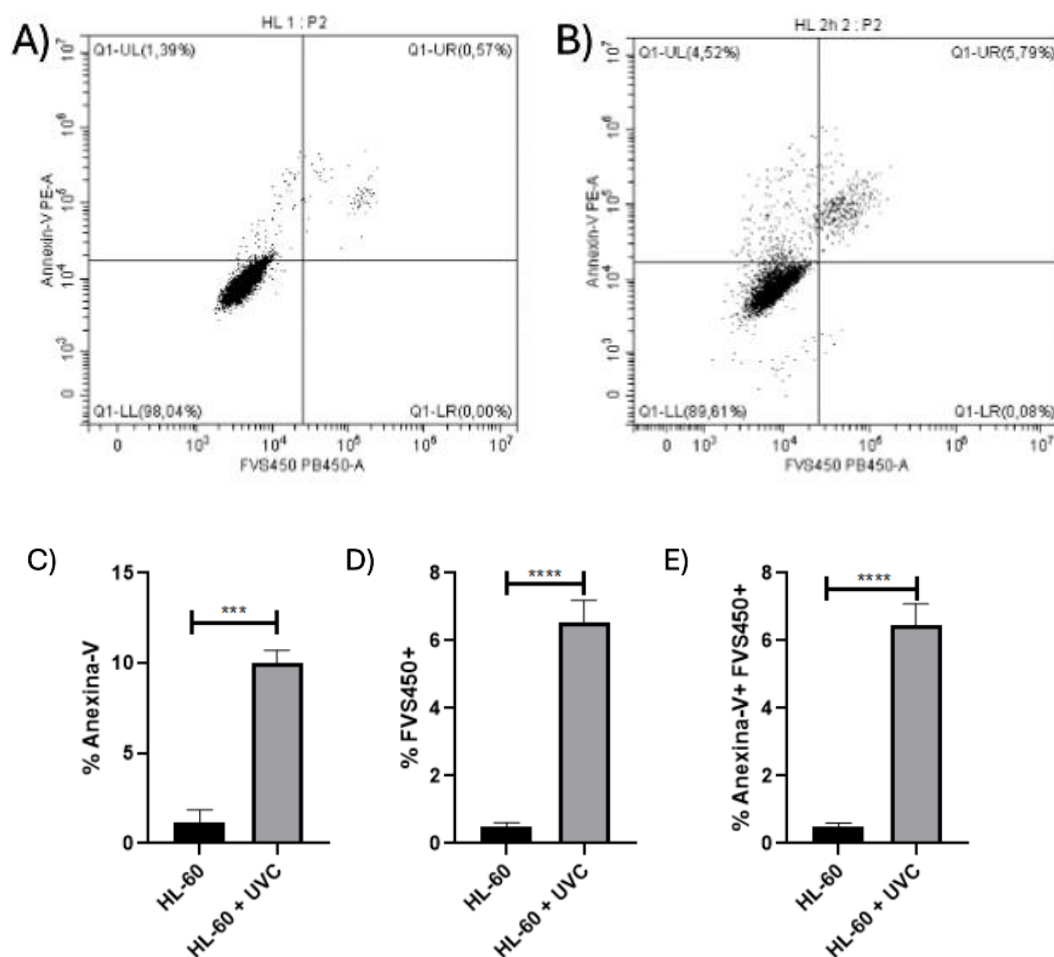
Figura 5. Estratégia de seleção da população de interesse e análise da apoptose por citometria de fluxo.



Fonte: Autoria própria, 2024.

Na análise de apoptose, foi feita a exclusão de *doublets* **(A)** e a população de estudo foi inicialmente definida de acordo com o tamanho e a complexidade celular **(B)**. Em seguida, a população de interesse foi avaliada quanto a marcação de Anexina-V-PE e marcador de viabilidade FVS450 por meio de *dotplot* **(C)**. A porcentagem e a mediana da intensidade da fluorescência (MFI) da expressão de caspase-3 ativa na população de interesse foi avaliada por histograma **(D)**.

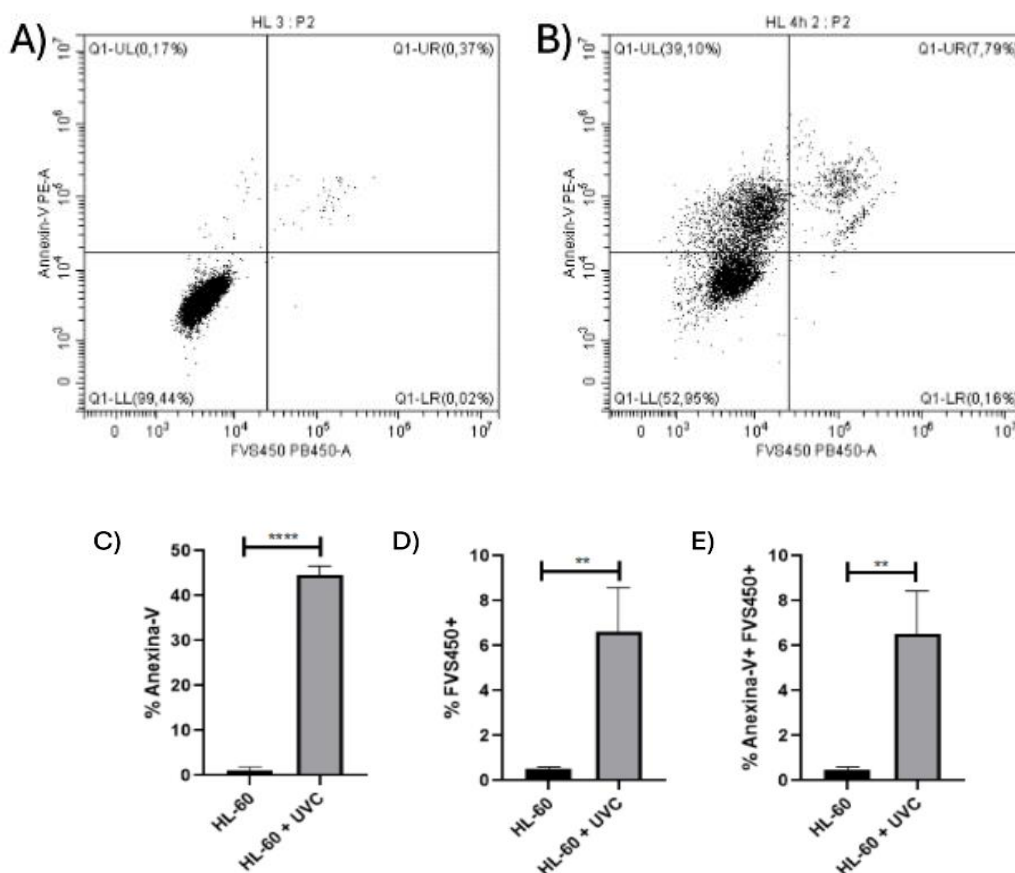
Figura 6. Porcentagem de marcação com Anexina-V e FVS450 em células HL-60 irradiadas e incubadas por 2h.



Fonte: Autoria própria, 2024.

As células HL-60 foram irradiadas com UVC por 5 minutos, mantidas em estufa a 37°C por 2h, e em seguida marcadas com Anexina-V-PE e FVS450, e avaliadas por citometria de fluxo. **A)** *Dotplot* representativo da avaliação da apoptose nas células HL-60 não irradiada. **B)** *Dotplot* representativo da avaliação da apoptose nas células HL-60+UVC, irradiadas e incubadas por 2h. **C)** Gráfico mostrando o aumento na porcentagem da marcação de Anexina-V (HL-60+UVC) comparado com células não irradiadas (HL-60). **D)** Gráfico mostrando o aumento na porcentagem da marcação de FVS450 (HL-60+UVC) comparado com células não irradiadas (HL-60). **E)** Gráfico mostrando o aumento na porcentagem da dupla marcação de Anexina-V-PE e FVS450 (HL-60+UVC) comparado com células não irradiadas (HL-60). Experimento realizado em triplicata. Foi realizado o teste t para comparação dos grupos. *** $p < 0,0001$, **** $p < 0,00001$.

Figura 7. Porcentagem de marcação com Anexina-V e FVS450 em células HL-60 irradiadas e incubadas por 4h.



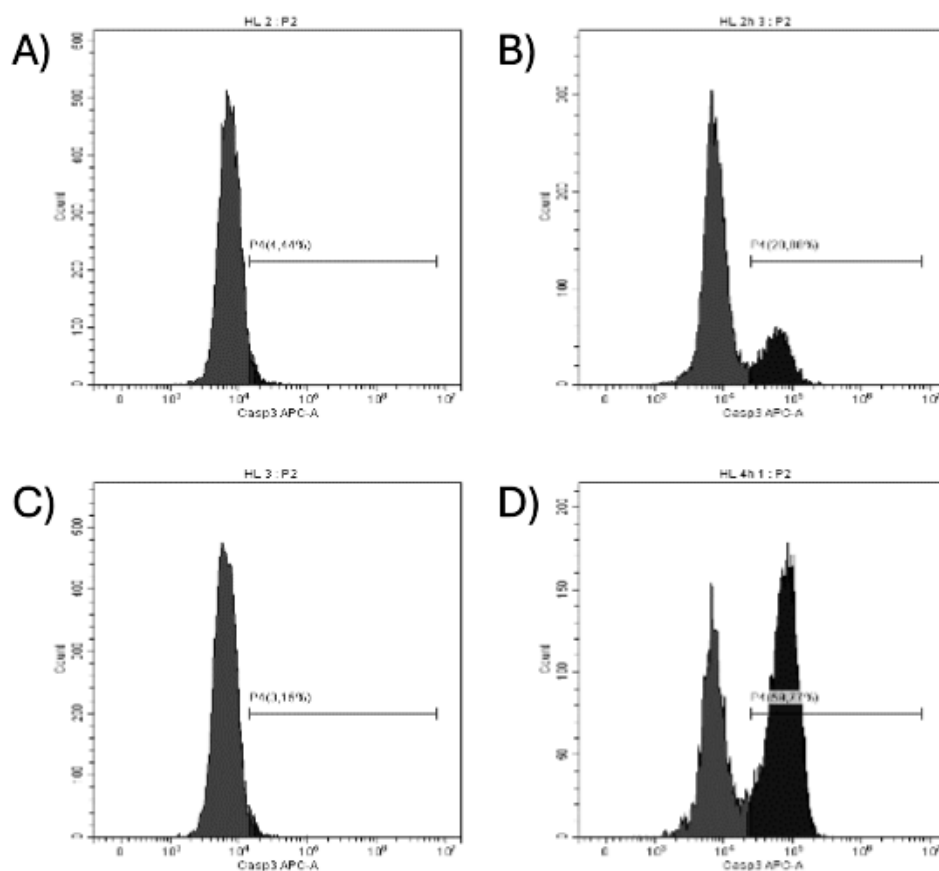
Fonte: Autoria própria, 2024.

As células HL-60 foram irradiadas com UVC por 5 minutos, mantidas em estufa a 37°C por 4h, e em seguida foram marcadas com Anexina-V-PE e FVS450, e avaliadas por citometria de fluxo. **A)** *Dotplot* representativo da avaliação da apoptose nas células HL-60 não irradiada. **B)** *Dotplot* representativo da avaliação da apoptose nas células HL-60+UVC, irradiadas e incubadas por 4h. **C)** Gráfico mostrando o aumento na porcentagem da marcação de Anexina-V-PE (HL-60+UVC) comparado com células não irradiadas (HL-60). **D)** Gráfico mostrando o aumento na porcentagem da marcação de FVS450 (HL-60+UVC) comparado com células não irradiadas (HL-60). **E)** Gráfico mostrando o aumento na porcentagem da dupla marcação de Anexina-V-PE e FVS450 (HL-60+UVC) comparado com células não irradiadas (HL-60). Experimento realizado em triplicata. Para comparação entre os grupos foi realizado o teste t. **p<0,001, ***p<0,0001.

5.3 Avaliação da ativação de caspase-3 em células HL-60 irradiadas com UVC

A expressão de caspase-3 clivada/ativa também foi avaliada, 2 e 4 horas após a irradiação (Figura 8). A porcentagem e a mediana da intensidade da fluorescência (MFI) de caspase-3 ativa foi significativamente elevada nas células irradiadas e incubadas por 2h (Figura 9A) ou 4h (Figura 9C) quando comparado a células não irradiadas. Ainda, no tempo de 4h após a irradiação, houve um aumento expressivo na porcentagem e MFI de caspase-3 ativa nas células irradiadas quando comparado com as células não irradiadas (Figura 9B e D). Dessa forma, o protocolo de indução da apoptose por UVC foi capaz de ativar a apoptose resultando na ativação da caspase-3 efetora.

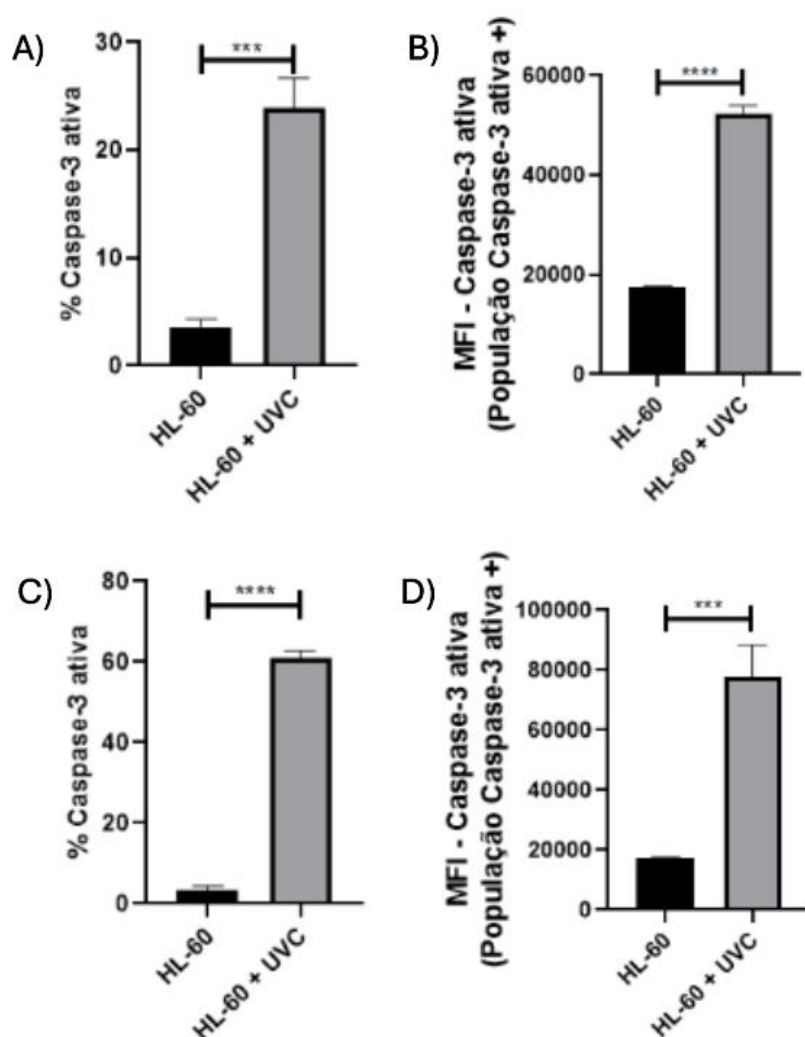
Figura 8. Histogramas representativos da avaliação de caspase-3 após a indução da apoptose por citometria de fluxo.



Fonte: Autoria própria, 2024.

Histogramas representativos da análise de caspase-3 ativa após a irradiação das células com UVC e incubação de 2h e 4h. **A, C)** Histogramas representativos das células HL-60 dos grupos controles, HL-60 não irradiadas e incubadas por 2 (A) ou 4 (C) horas. **B)** Histograma representativo das células HL-60 irradiadas (HL-60+UVC) e incubadas por 2h. **D)** Histograma representativo das células HL-60 irradiadas (HL-60+UVC) e incubadas por 4h.

Figura 9. Irradiação UVC promove ativação da caspase-3 após a irradiação UVC e tempos de incubação de 2h e 4h.



Fonte: Autoria própria, 2024.

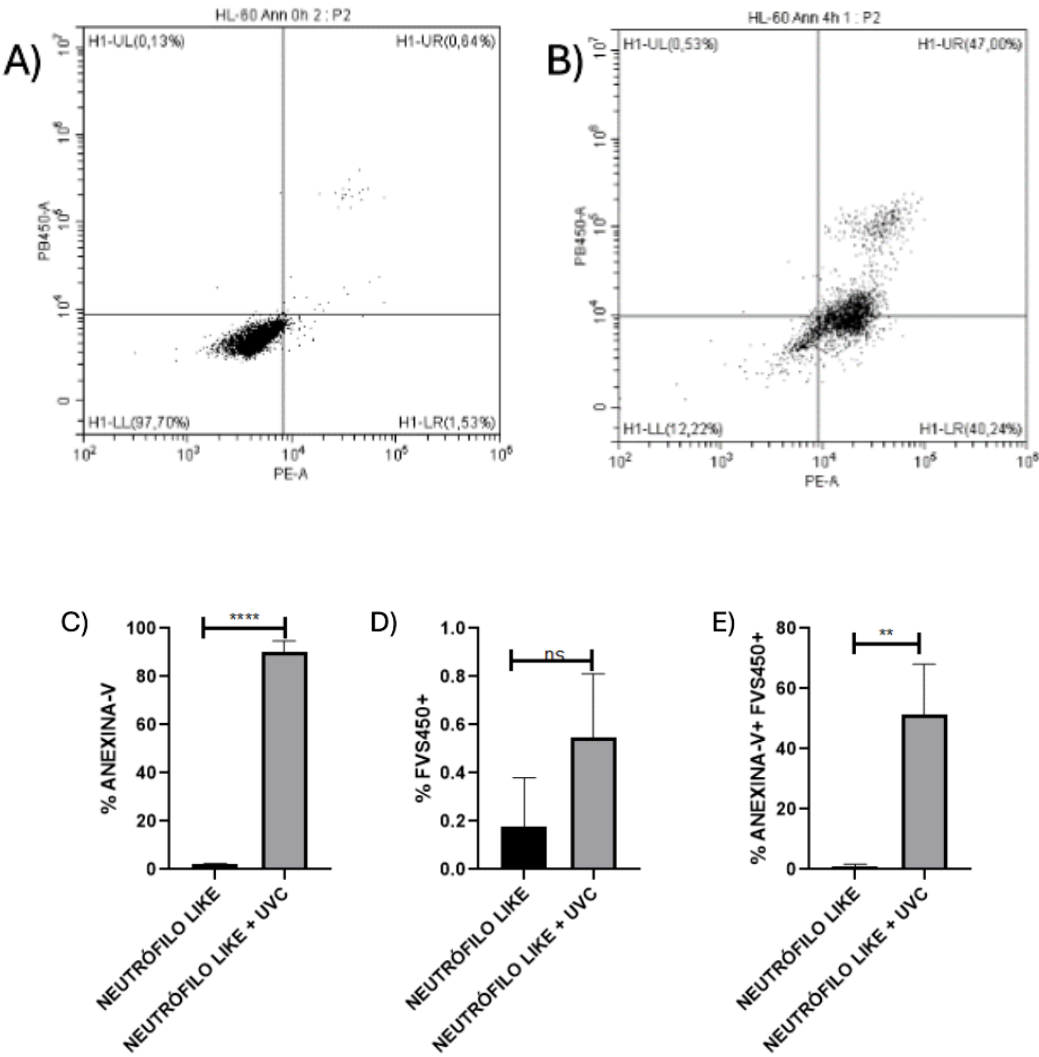
Células HL-60 foram irradiadas por UVC por 5 minutos, mantidas em estufa a 37°C por 2 ou 4h, e em seguida foram marcadas com anti-Caspase-3-clivada e avaliadas por citometria de fluxo. **A, B)** Gráficos mostrando a porcentagem e a MFI da expressão de caspase-3-ativa nas células irradiadas (HL-60+UVC) e não irradiadas (HL-60), incubadas por 2h após a irradiação. **C, D)** Gráficos mostrando a porcentagem e a MFI da expressão de caspase-3-ativa nas células irradiadas (HL-60+UVC) e não

irradiadas (HL-60), incubadas por 4h após a irradiação. Experimento realizado em triplicata. Foi realizado o teste t para comparação dos grupos. *** $p < 0,0001$, **** $p < 0,00001$.

5.4 Avaliação da indução da apoptose em neutrófilos-like

Células HL-60 foram induzidas a diferenciação em neutrófilos-like por exposição ao DMSO por 72h, em seguida foi realizado o protocolo de indução de apoptose por irradiação UVC. Como apresentado na figura 10, a irradiação UVC favoreceu a apoptose nos neutrófilos-like, como observado pela elevada porcentagem de células Anexina-V-PE positivas.

Figura 10. Irradiação UVC favorece a apoptose precoce em neutrófilos-like.



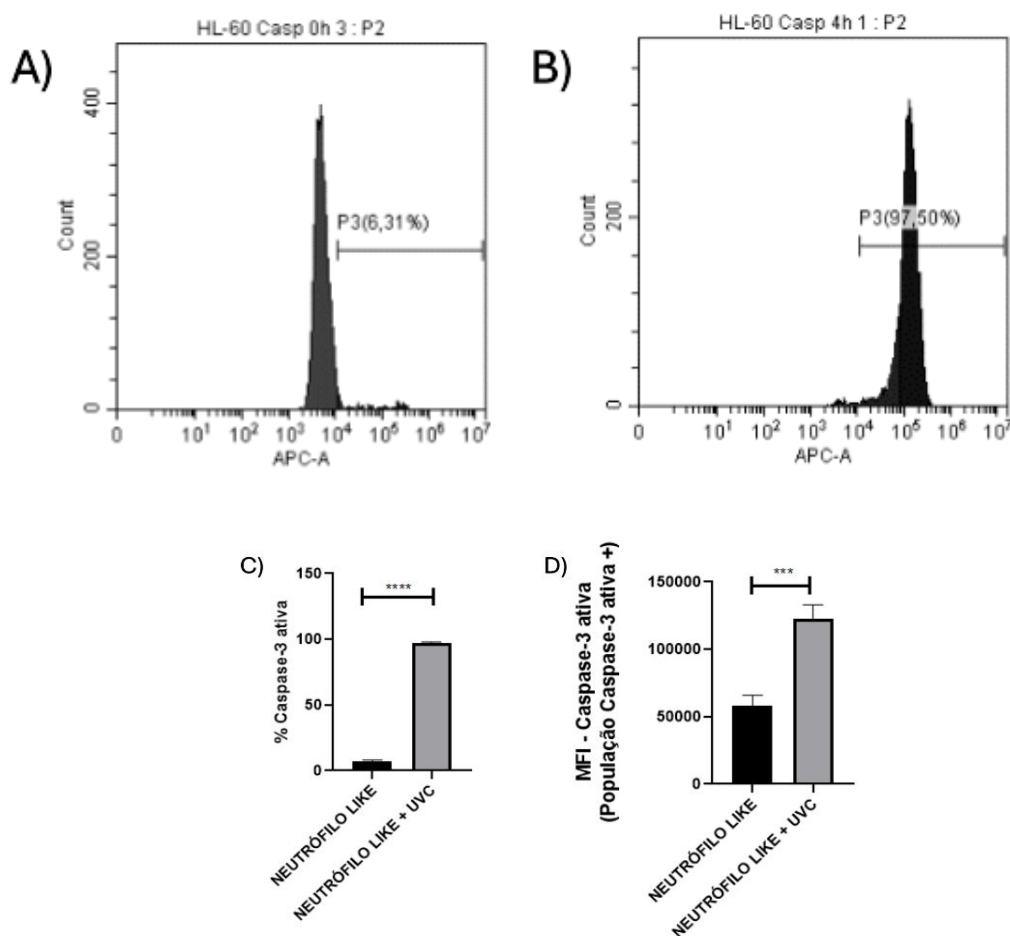
Fonte: Autoria própria, 2024.

Os neutrófilos-*like* foram irradiados com UVC por 5 minutos, mantidos em estufa a 37°C por 4h, e em seguida marcados com Anexina-V-PE e FVS450, e avaliados por citometria de fluxo. **A)** *Dotplot* representativo das células não irradiadas (neutrófilo-*like*). **B)** *Dotplot* representativo das células irradiadas (neutrófilo-*like*+UVC). Após a irradiação as células foram incubadas por 4h..**C)** Gráfico mostrando o aumento significativo da porcentagem de células positivas para Anexina-V-PE (neutrófilo-*like*+UVC) comparado com as células não irradiadas (neutrófilo-*like*). **D)** Gráfico mostrando que não houve diferença significativa na população FVS450⁺ (neutrófilo-*like*+UVC) comparado com células não irradiadas (neutrófilo-*like*). **E)** Gráfico mostrando o aumento na porcentagem da dupla marcação de Anexina-V e FVS450 em neutrófilo-*like*+UVC comparado aos neutrófilo-*like*. Experimento realizado em triplicata. Foi realizado o teste t para comparação dos grupos. **p<0,001, ***p<0,0001, e ns = não significativo.

5.5 Ativação de caspase-3 em neutrófilos-*like* após indução da apoptose por UVC

Na análise da caspase-3 em neutrófilos-*like* (Figura 11), observamos que a irradiação levou a uma intensa ativação da caspase-3, confirmando que a irradiação promoveu a morte dessas células por apoptose. Ainda observamos aumento na MFI da caspase-3 ativa nas células irradiadas quando comparado a neutrófilos-*like* não irradiados.

Figura 11. Irradiação UVC induz a ativação da caspase-3 em neutrófilos-*like*.



Fonte: Autoria própria, 2024.

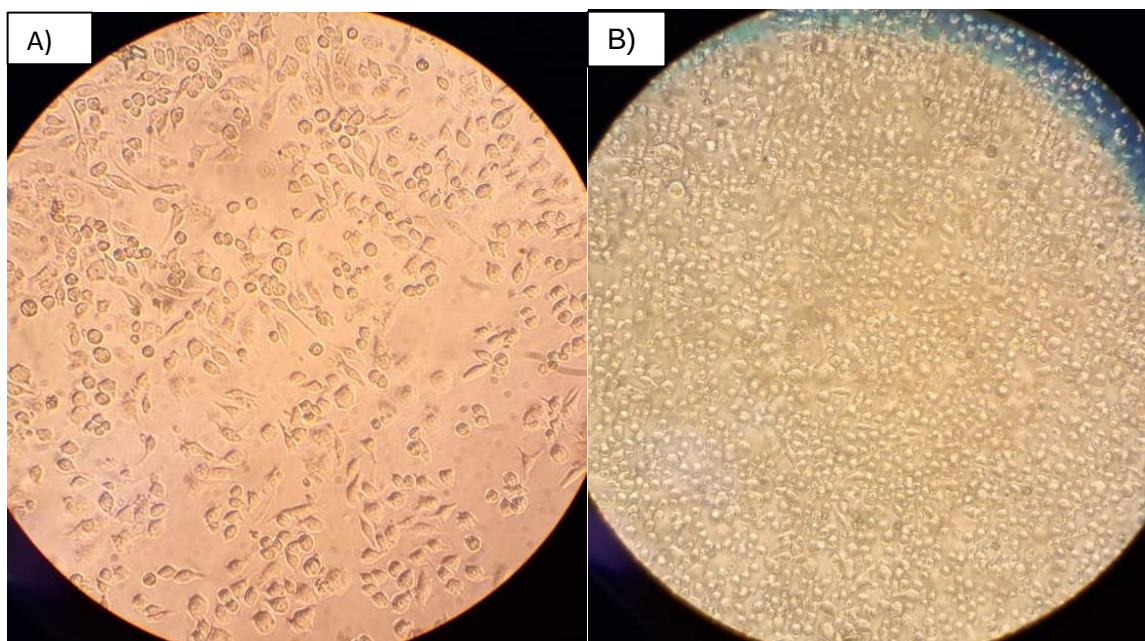
Neutrófilos-*like* foram irradiados por UVC por 5 minutos, mantidos em estufa a 37°C por 4h, e em seguida marcados com anti-Caspase-3-clivada/ativa e avaliados por citometria de fluxo. **A)** Histograma representativo da análise da caspase-3 ativa nos neutrófilos-*like*, não irradiados. **B)** Histograma representativo da análise da caspase-3 ativa nos Neutrófilos-*like*+UVC, irradiados e incubados por 4h. **C)** Gráfico mostrando o aumento na expressão da caspase-3-ativa nas células irradiadas (Neutrófilo-*like*+UVC) comparado com as células não irradiadas (Neutrófilo-*like*). **D)** Gráfico mostrando o aumento na MFI de caspase-3 ativa nas células irradiadas (Neutrófilo-*like*+UVC) comparado com as células não irradiadas (Neutrófilo-*like*). Experimento realizado em triplicata. Foi realizado o teste t para comparação dos grupos. *** $p < 0,0001$, **** $p < 0,00001$.

5.6 Eferocitose de células HL-60 apoptóticas por macrófagos Raw 264.7

Após gerar HL-60 apoptóticas (ACs), marcamos essas células com CFSE e as co-cultivamos com macrófagos murinos da linhagem Raw 264.7 (Mac) para o

ensaio de eferocitose. Após 18h de co-cultivo, observamos por microscopia óptica que o poço com co-cultura apresentou aparente modificação no número e morfologia dos macrófagos (Figura 12B) quando comparado a macrófagos que não foram co-cultivados com células apoptóticas (Figura 12A).

Figura 12. Fotos representativas de microscopia óptica após 18h de eferocitose.

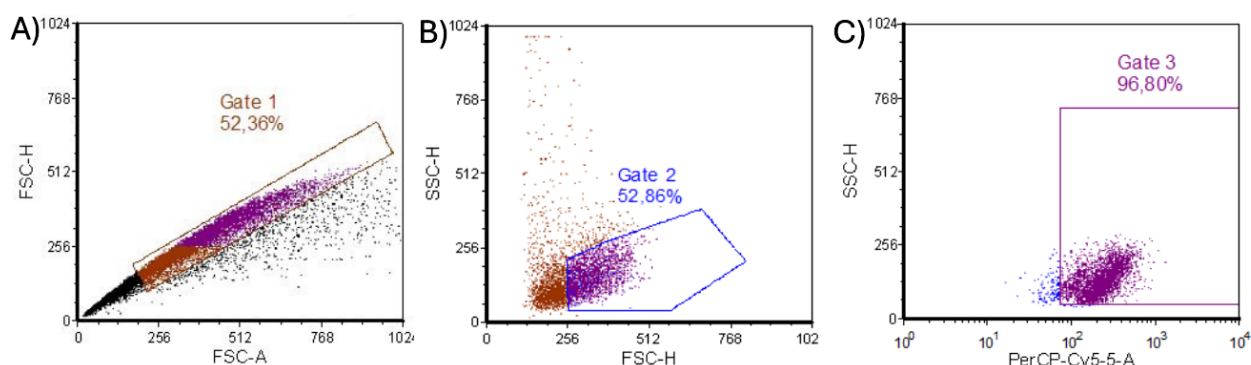


Fonte: Autoria própria, 2024.

Fotos representativas de macrófagos Raw 264.7 após 18h da co-cultura. A) Foto representativa das células do grupo controle, que não foram co-cultivadas com ACs. B) foto representativa das células na co-cultura com ACs. Imagens obtidas com aumento de 400x, em microscópio óptico invertido.

Na análise da eferocitose por citometria de fluxo (Figura 13) os experimentos foram realizados em duplicatas, nos experimentos com a proporção de 3 células apoptóticas-CFSE para cada macrófago-CD18, a taxa de eferocitose (macrófago CD18⁺CFSE⁺) foi 65,26% e 56,97% (Figura 14), enquanto nos experimentos com 5 células apoptóticas por macrófago, a taxa de apoptose foi 87,17% e 92,83% (Figura 15). Assim, podemos verificar que os macrófagos co-cultivados com HL-60 apoptóticas são capazes de eferocitar, e que a proporção de 5 ACs para cada macrófago impacta positivamente na porcentagem da eferocitose.

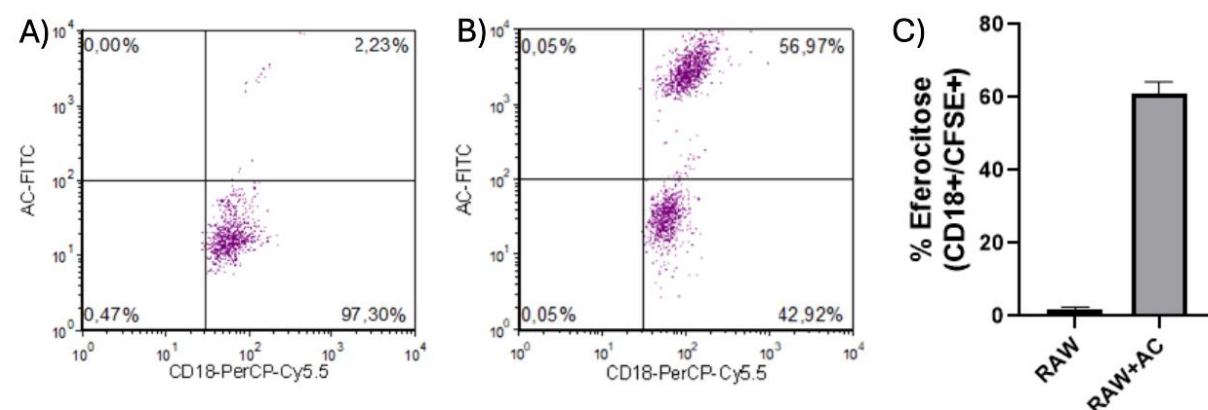
Figura 13. Estratégia de seleção da população para análise da eferocitose por citometria de fluxo.



Fonte: Autoria própria, 2024.

A análise da citometria da co-cultura para eferocitose foi feita da seguinte forma: primeiro, os *doublets* foram excluídos (A), e em seguida foi selecionada a população de interesse (B), a população CD18-PerCP-Cy5-5 positiva foi selecionada (gate 3) para posterior análise da dupla marcação CD18⁺CFSE⁺ (Figura 12 e 13) indicando a porcentagem de eferocitose (macrófagos-CD18 contendo AC-CFSE).

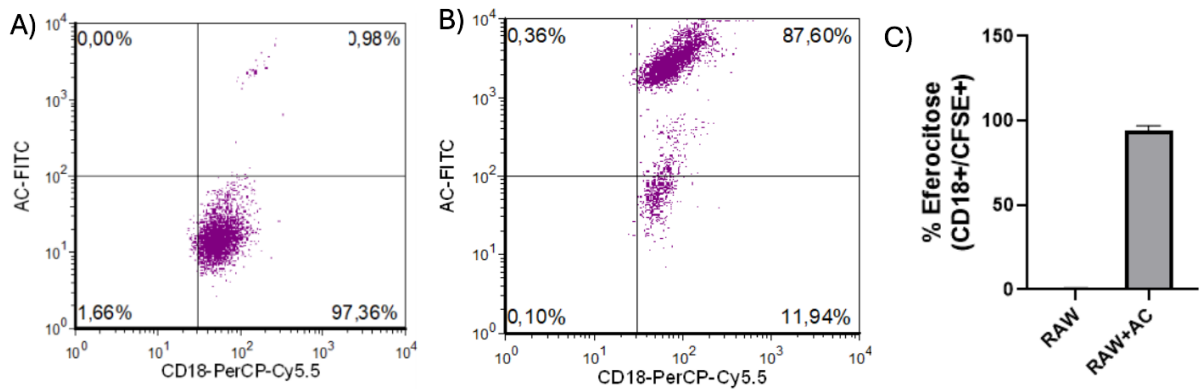
Figura 14. Porcentagem de eferocitose de AC-CFSE⁺ por macrófagos CD18⁺ (3 ACs: 1 macrófago).



Fonte: Autoria própria, 2024.

Dotplots e gráfico de barras apresentando os resultados da porcentagem de eferocitose em co-cultura contendo 3 ACs: 1 macrófago (Mac=Raw 264.7). Após 18h de co-cultivo os poços foram lavados para a remoção das ACs-CFSE não eferocitadas, e os macrófagos aderidos foram coletados, fixados e marcados com anti-CD18-PerCP-Cy5.5. A) *Dotplot* representativo das células Raw 264.7 no grupo controle sem ACs-CFSE⁺ (FITC). B) *Dotplot* representativo das células Raw 264.7 co-cultivadas com ACs-CFSE⁺ (FITC). C) Gráfico da média da porcentagem de eferocitose na proporção 3 ACs:1 Mac. (N=2).

Figura 15. Porcentagem de eferocitose de ACs-CFSE⁺ por macrófagos CD18⁺ (5 ACs: 1 macrófago).



Fonte: Autoria própria, 2024.

Dotplots e gráfico de barras apresentando os resultados da porcentagem de eferocitose em co-cultura contendo 5 ACs: 1 macrófago (Mac=Raw 264.7). Após 18h de co-cultivo os poços foram lavados para a remoção das ACs-CFSE não eferocitadas, e os macrófagos aderidos foram coletados, fixados e marcados com anti-CD18-PerCP-Cy5.5. A) *Dotplot* representativo das células Raw 264.7 no grupo controle sem ACs-CFSE⁺ (FITC). B) *Dotplot* representativo das células Raw 264.7 co-cultivadas com ACs-CFSE⁺ (FITC). C) Gráfico da média da porcentagem de eferocitose na proporção 5 ACs:1 Mac. (N=2).

6 DISCUSSÃO

A apoptose é uma morte celular programada que ocorre em diversos processos fisiológicos, durante o desenvolvimento e renovação tecidual (Bedoui, et al., 2020; Bertheloot, et al., 2021). As células apoptóticas são rapidamente removidas por fagócitos mediante o processo de eferocitose, esse processo é rápido e eficiente (Boada-Romero et al.; 2020; Doran, et al., 2020; Kumar, et al., 2016). Nesse trabalho, buscamos reproduzir e padronizar experimentos de indução de apoptose e co-cultivo de células apoptóticas com fagócitos para ensaios de eferocitose, o que permitirá o estudo desse processo imunológico fundamental para manutenção da homeostasia tecidual.

Primeiro, avaliamos o efeito da irradiação UVC sobre a viabilidade celular em dois tipos de linhagens celulares, a HL-60 e a RAW 264.7. Como esperado a irradiação UVC foi capaz de reduzir a viabilidade celular de ambas as linhagens. Assim, escolhemos a linhagem HL-60 para continuar os experimentos, porque essa célula é cultivada em suspensão, que permite a otimização do processo com maior rendimento de células e um menor uso de recursos, uma vez que não são necessários os usos de enzimas ou *cell scrapers* para desgrudar as células das garrafas de cultivo, entre outros materiais.

A radiação ultravioleta tem amplo potencial para causar dano ao material genético, resultando em mutações e morte celular (Batista, et al., 2009; Lee, et al., 2013; Shihab, et al., 2018;). Existem três tipos de radiação ultravioleta, UVA com comprimento onda entre 315-400nm, UVB com comprimento de onda de 280-315nm e UVC com comprimento de 100-289nm, dentre esses tipos de ultravioleta a UVC possui maior potencial prejudicial para a integridade do material genético (Lee, et al., 2013).

A radiação ultravioleta causa danos ao DNA de duas formas diferentes formando dímeros de pirimidina ciclobutano e fotopordutos pirimidina-pirimidina (Batista, et al., 2009). Caso o dano celular não seja reparado a célula entrará em morte celular programada por apoptose (Chan, et al., 2003). Embora o dano ao DNA favoreça a ativação da p53 e por consequência a via intrínseca de indução da apoptose seja a principal forma da UVC induzir a morte celular, sabe-se também que a exposição a UVC pode promover a multimerização de receptores de morte celular

FAS que permite a ligação da proteína adaptadora e resulta na ativação da via extrínseca da apoptose (Bang, et al., 2003; Begovic, et al., 2016; Rehemtulla, et al., 1997).

Nesse trabalho, avaliamos a geração de células apoptóticas pela marcação, da fosfatidilserina externalizada, com Anexina-V e pela ativação de caspase-3, ambas as avaliações independem da via de ativação da apoptose, pois esses eventos são comuns as duas vias, extrínseca e intrínseca.

Gerlach e colaboradores (2021), também para gerar células apoptóticas, utilizaram células da linhagem Jurkat irradiadas por 15 minutos com lâmpada UVC, e após a irradiação mantiveram as células incubadas por 2 a 3h em estufa, gerando em média 85% de células Anexina-V⁺. Outro trabalho, utilizou células HL-60 irradiadas com lâmpada UVC por 15 minutos e incubação por 3h para geração de células apoptóticas para o estudo da eferocitose, entretanto o trabalho não descreve a porcentagem de apoptose encontrada (Flak et al, 2019).

Para estudar a eferocitose de células neoplásicas, Kim e colegas (2019), irradiaram células de linhagem de câncer epitelial com lâmpada UVC por 10 minutos, seguido de incubação de 2h, nesse protocolo eles obtiveram uma marcação Anexina-V de aproximadamente 87%, entretanto, cerca de 30% dessas apresentavam fluorescência de marcador de viabilidade celular, demonstrando também um aumento na apoptose tardia. Esses e outros trabalhos (Ampomah, et al., 2022; Kasikara, et al., 2021; Yurdagul, et al., 2020) fizeram protocolos de irradiação mais longos e apresentaram altas taxas de marcação de Anexina-V, contudo, eles também obtiveram uma alta marcação de conteúdo intracelular/nuclear, ao utilizar iodeto de propídio (PI) ou 7-ADD. O aumento desses marcadores sugere um aumento da apoptose tardia/necrose secundária, pois essas células perderam a integridade da membrana permitindo que marcadores como o PI intercalem com os ácidos nucleicos (Rieger, et al., 2011).

Alternativamente, protocolos que fizeram a irradiação das células por 5 minutos, obtiveram uma taxa de marcação para Anexina-V semelhante, mas com menor taxa de marcação para os de viabilidade celular. Subramanian et al., (2014), gerando células apoptóticas para estudo do papel da eferocitose na ativação de células dendríticas, irradiou com lâmpada UVC células Jukart por 5 minutos para

indução do apoptose, incubou por até 3 horas e obteve aproximadamente 80% de células apoptóticas Anexina-V⁺PI⁻. Proto, et al., (2018) reproduzindo o protocolo de Subramanian e colaboradores, gerou células Jukart apoptóticas para estudo do impacto da eferocitose na resolução da inflamação e indução de linfócitos T reguladores por macrófagos após a eferocitose.

Para gerar células apoptóticas e estudar a regulação de receptores de quimiocinas e a polarização de macrófagos após a eferocitose, Angsana et al., (2016), irradiou células Raw 264-7, por 5 minutos e manteve as células incubadas por 2h, obteve uma marcação de Anexina-V de cerca de 80%, enquanto a marcação de PI ficou abaixo de 1%. Desta forma, realizamos o protocolo de irradiação UVC das células HL-60 por 5 minutos com posterior incubação por 2 ou 4h, observamos que após 4h ocorre uma maior taxa de marcação de Anexina-V⁺. Ainda, foi observado que em média 60% das células já apresentam caspase-3 ativa, ou sejam já iniciaram o processo de apoptose. Assim, foi estabelecido o tempo de 5 minutos de irradiação e incubação de 4h para geração de células HL-60 apoptóticas para os próximos experimentos.

Além da irradiação ultravioleta, estudos que necessitam induzir a apoptose fazem uso de outras formas de estimular esse tipo de morte celular programada, como o uso de moléculas citotóxicas, ligantes de receptores de morte e exposição a componentes granulares produzidos por linfócitos T citotóxicos (Roberts, et al., 2004; Shkarina, et al., 2024). Por outro lado, o uso da UVC se torna uma metodologia fácil e de baixo custo para ser implantada no laboratório.

Adicionalmente, avaliamos a geração de neutrófilos-*like*, derivados de HL-60 tratadas com DMSO, observamos que o protocolo de irradiação foi capaz de induzir alta taxa de apoptose nos neutrófilos-*like*, avaliada pela elevada marcação de Anexina-V e caspase-3 ativa. Os neutrófilos-*like*, apresentam uma maior expressão de grânulos e são capazes de realizar funções de neutrófilos segmentados maduros (Bhakta, et al., 2024). Essas células são utilizadas em diversos estudos *in vitro* sobre a função de neutrófilos humanos, incluindo fagocitose de microrganismos, a quimiotaxia, o potencial oxidativo, a produção de enzimas para degradação de patógenos e a produção de armadilhas extracelulares de neutrófilos (Nets) (Manda-Handzlik, et al., 2018).

Salina e colaboradores (2024) diferenciaram células HL-60 em neutrófilos-*like* e infectaram essas células com bactérias *Klebsiella pneumoniae* e *Streptococcus pneumoniae*, induziram essas células a apoptose utilizando 5mJ de UVC e as co-cultivaram com macrófagos, derivados da medula óssea de camundongos, para avaliação do efeito da eferocitose de células infectadas na polarização de macrófagos M1/M2. As células irradiadas do grupo controle, apenas neutrófilo-*like* sem bactérias, apresentaram uma taxa de apoptose de aproximadamente 63%, aqui observamos um valor médio de 90%, uma diferença importante é a forma de irradiação, em nosso trabalho utilizamos lâmpada germicida para irradiar, enquanto no estudo supracitado a irradiação foi realizada em equipamento *Crosslinker/Bio-Link*.

Após padronizar a geração de células apoptóticas, tentamos reproduzir experimentos de co-cultivo para ensaios da eferocitose. Macrófagos murinos da linhagem celular Raw 264.7 (Mac) foram co-cultivados por 18h com células apoptóticas HL-60 (ACs), previamente marcadas com CFSE. Observamos por microscopia óptica que os Mac cocultivados com ACs, apresentaram modificação no seu número e morfologia, não realizamos análises acerca desses parâmetros. Embora, foi demonstrado que após a eferocitose de células apoptóticas ocorre a indução da proliferação não inflamatória de macrófagos *in vitro* e *in vivo*, e que os mesmos promovem resolução do dano tecidual (Gerlach, et al., 2021).

Na análise da taxa de eferocitose por citometria, foi observada que a eferocitose variou em torno de 61% na proporção 3 ACs: 1 Mac, e 90% na proporção 5 ACs: 1 Mac. Os resultados corroboram com os achados de DeJani (2018) que demonstram que células dendríticas incubadas com células apoptóticas na proporção 1 DC: 3 ACs apresentam uma taxa de eferocitose em torno de 61%.

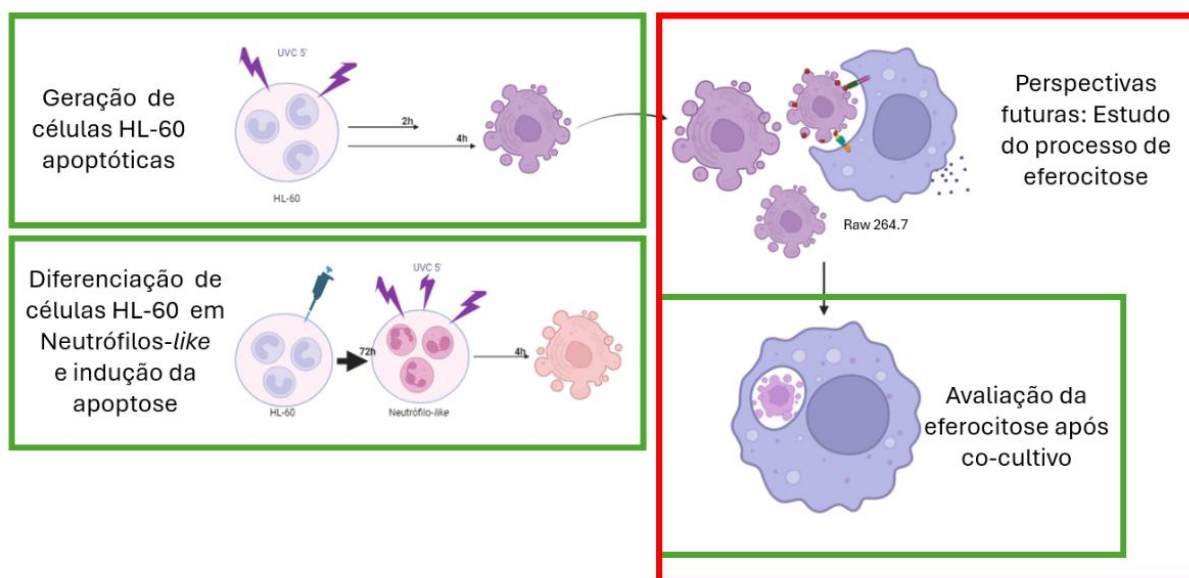
Neste estudo os macrófagos foram co-cultivados com as células apoptóticas por 18h, entretanto outros trabalhos demonstram que esse tempo pode ser reduzido, e ainda obter taxa considerável de eferocitose. Por exemplo, Flak e colaboradores (2020), co-cultivaram células HL-60 apoptóticas com macrófagos derivados de monócitos humanos na proporção 3 ACs: 1 macrófago e obtiveram uma taxa de eferocitose de até 40% após 90 minutos. Salina, et al., 2024 demonstrou cerca de 97% de eferocitose por macrófagos incubados por 2h com ACs, enquanto Kasikara, et al., 2021 observou 35% de eferocitose. Desta forma, ensaios futuros para avaliar

outros períodos de incubação na co-cultura poderão otimizar o protocolo, a porcentagem da eferocitose e a concentração dos mediadores anti-inflamatórios produzidos pela remoção de células apoptóticas por macrófagos.

O estudo da eferocitose é um campo em expansão, que interage com muitas áreas da biologia, incluindo estudos sobre imunologia tumoral, neurociência, autoimunidade, inflamação, reparo tecidual e relação parasita-hospedeiro (Boada-Romero, et al., 2020; Karaji, et al., 2017; Kumar, 2016). A partir desse trabalho novos estudos poderão ser realizados para a investigação do efeito da eferocitose em diferentes cenários, como por exemplo, na investigação de novas moléculas com potencial promissor na remoção de células mortas, reparo tecidual e atividade anti-inflamatória.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse trabalho, realizamos com sucesso a geração de células HL-60 apoptóticas para o co-cultivo com macrófagos em ensaios de eferocitose. Demonstramos que o protocolo testado de irradiação UVC induz a apoptose de células HL-60 e de neutrófilos-like diferenciados a partir de células HL-60. Também foi demonstrado que macrófagos Raw 264.7 eferocitam células HL-60 apoptóticas. A padronização desses ensaios contribui para que estudos futuros sejam realizados no laboratório, com o intuito de investigar substâncias capazes de modular a inflamação a remoção de células mortas e reparo tecidual.



Fonte: Autoria própria, 2024.

REFERÊNCIAS

- AMPOMAH, Patrick B. et al. Macrophages use apoptotic cell-derived methionine and DNMT3A during efferocytosis to promote tissue resolution. **Nature metabolism**, v. 4, n. 4, p. 444-457, 2022.
- ANG, Rosalind L.; TING, Adrian T. Detection of RIPK1 in the FADD-containing death inducing signaling complex (DISC) during necroptosis. **Programmed necrosis: methods and protocols**, p. 101-107, 2018.
- ANGSANA, Julianty et al. Efferocytosis as a regulator of macrophage chemokine receptor expression and polarization. **European journal of immunology**, v. 46, n. 7, p. 1592-1599, 2016.
- ARANDJELOVIC, Sanja; RAVICHANDRAN, Kodi S. Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. **Nature immunology**, v. 16, n. 9, p. 907-917, 2015.
- ARYA, Richa; WHITE, Kristin. Cell death in development: signaling pathways and core mechanisms. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2015. p. 12-19.
- BANG, Bo et al. In vivo UVB irradiation induces clustering of Fas (CD95) on human epidermal cells. **Experimental dermatology**, v. 12, n. 6, p. 791-798, 2003.
- BATISTA, Luís FZ et al. How DNA lesions are turned into powerful killing structures: insights from UV-induced apoptosis. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 681, n. 2-3, p. 197-208, 2009.
- BEDOUI, Sammy; HEROLD, Marco J.; STRASSER, Andreas. Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 21, n. 11, p. 678-695, 2020.
- BEGOVIĆ, Lidija et al. Effect of UVC radiation on mouse fibroblasts deficient for FAS-associated protein with death domain. **International journal of radiation biology**, v. 92, n. 8, p. 475-482, 2016.
- BEHAR, Samuel M.; BRIKEN, Volker. Apoptosis inhibition by intracellular bacteria and its consequence on host immunity. **Current opinion in immunology**, v. 60, p. 103-110, 2019.
- BERTHELOOT, Damien; LATZ, Eicke; FRANKLIN, Bernardo S. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. **Cellular & molecular immunology**, v. 18, n. 5, p. 1106-1121, 2021.
- BHAKTA, Suhani B. et al. Neutrophil-like cells derived from the HL-60 cell-line as a genetically-tractable model for neutrophil degranulation. **Plos one**, v. 19, n. 2, p. e0297758, 2024.
- BIANCONI, Eva et al. An estimation of the number of cells in the human body. **Annals of human biology**, v. 40, n. 6, p. 463-471, 2013.
- BILLEN, L. P.; SHAMAS-DIN, A.; ANDREWS, D. W. Bid: a Bax-like BH3 protein. **Oncogene**, v. 27, n. 1, p. S93-S104, 2008.
- BOADA-ROMERO, Emilio et al. The clearance of dead cells by efferocytosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 7, p. 398-414, 2020.
- BOADA-ROMERO, Emilio et al. The clearance of dead cells by efferocytosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 7, p. 398-414, 2020.
- BOATRRIGHT, Kelly M.; SALVESEN, Guy S. Mechanisms of caspase activation. **Current opinion in cell biology**, v. 15, n. 6, p. 725-731, 2003.

- CHAN, Wen-Hsiung; WU, Chih-Ching; YU, Jau-Song. Curcumin inhibits UV irradiation-induced oxidative stress and apoptotic biochemical changes in human epidermoid carcinoma A431 cells. **Journal of cellular biochemistry**, v. 90, n. 2, p. 327-338, 2003.
- CHEN, Xinsen et al. The roles of macrophage polarization in the host immune response to sepsis. **International immunopharmacology**, v. 96, p. 107791, 2021.
- COLLINS, Steven J. et al. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 75, n. 5, p. 2458-2462, 1978.
- DAVIES, Luke C. et al. Tissue-resident macrophages. **Nature immunology**, v. 14, n. 10, p. 986-995, 2013.
- DEJANI, Naiara Naiana et al. Intestinal host defense outcome is dictated by PGE2 production during efferocytosis of infected cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 36, p. E8469-E8478, 2018.
- DEJANI, Naiara Naiana et al. Intestinal host defense outcome is dictated by PGE2 production during efferocytosis of infected cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 36, p. E8469-E8478, 2018.
- DENIZOT, Francois; LANG, Rita. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of immunological methods**, v. 89, n. 2, p. 271-277, 1986.
- DORAN, Amanda C.; YURDAGUL JR, Arif; TABAS, Ira. Efferocytosis in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 4, p. 254-267, 2020.
- DUARTE, Layara Roberta Ferreira et al. Resolution of inflammation in acute graft-versus-host-disease: advances and perspectives. **Biomolecules**, v. 12, n. 1, p. 75, 2022.
- ELLIOTT, Michael R.; KOSTER, Kyle M.; MURPHY, Patrick S. Efferocytosis signaling in the regulation of macrophage inflammatory responses. **The Journal of Immunology**, v. 198, n. 4, p. 1387-1394, 2017.
- ELLIOTT, Michael R.; KOSTER, Kyle M.; MURPHY, Patrick S. Efferocytosis signaling in the regulation of macrophage inflammatory responses. **The Journal of Immunology**, v. 198, n. 4, p. 1387-1394, 2017.
- ELLIOTT, Michael R.; RAVICHANDRAN, Kodi S. The dynamics of apoptotic cell clearance. **Developmental cell**, v. 38, n. 2, p. 147-160, 2016.
- FENG, Lili et al. Pentamethoxyflavanone regulates macrophage polarization and ameliorates sepsis in mice. **Biochemical pharmacology**, v. 89, n. 1, p. 109-118, 2014.
- FLAK, Magdalena B. et al. GPR101 mediates the pro-resolving actions of RvD5 n-3 DPA in arthritis and infections. **The Journal of clinical investigation**, v. 130, n. 1, p. 359-373, 2022.
- GE, Yun; HUANG, Man; YAO, Yong-ming. Efferocytosis and its role in inflammatory disorders. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 10, p. 839248, 2022.
- GE, Yun; HUANG, Man; YAO, Yong-ming. Efferocytosis and its role in inflammatory disorders. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 10, p. 839248, 2022.
- GERLACH, Brennan D. et al. Efferocytosis induces macrophage proliferation to help resolve tissue injury. **Cell metabolism**, v. 33, n. 12, p. 2445-2463. e8, 2021.
- HONOLD, Lisa; NAHRENDORF, Matthias. Resident and monocyte-derived macrophages in cardiovascular disease. **Circulation research**, v. 122, n. 1, p. 113-127, 2018.

- ITALIANI, Paola; BORASCHI, Diana. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 514, 2014.
- KARAJI, Niloofar; SATTENTAU, Quentin J. Efferocytosis of pathogen-infected cells. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 316661, 2017.
- KASIKARA, Canan et al. Deficiency of macrophage PHACTR1 impairs efferocytosis and promotes atherosclerotic plaque necrosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 131, n. 8, 2021.
- KASIKARA, Canan et al. Deficiency of macrophage PHACTR1 impairs efferocytosis and promotes atherosclerotic plaque necrosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 131, n. 8, 2021.
- KAWANO, Mahiru; NAGATA, Shigekazu. Efferocytosis and autoimmune disease. **International immunology**, v. 30, n. 12, p. 551-558, 2018.
- KIM, Yong-Bae et al. Programming of macrophages by UV-irradiated apoptotic cancer cells inhibits cancer progression and lung metastasis. **Cellular & molecular immunology**, v. 16, n. 11, p. 851-867, 2019.
- KUMAR, Sushil; BIRGE, Raymond B. Efferocytosis. **Current biology**, v. 26, n. 13, p. R558-R559, 2016.
- LEE, Chih-Hung et al. Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis and its effects on skin residential cells: the implication in UV-based phototherapy. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 3, p. 6414-6435, 2013.
- LIEBOLD, Imke et al. Apoptotic cell signals and heterogeneity in macrophage function: Fine-tuning for a healthy liver. In: **Seminars in Cell & Developmental Biology**. Academic Press, 2021. p. 72-81.
- LIU, Zheng; DAVIDSON, Anne. Taming lupus—a new understanding of pathogenesis is leading to clinical advances. **Nature medicine**, v. 18, n. 6, p. 871-882, 2012.
- MANDA-HANDZLIK, Aneta et al. The influence of agents differentiating HL-60 cells toward granulocyte-like cells on their ability to release neutrophil extracellular traps. **Immunology and Cell Biology**, v. 96, n. 4, p. 413-425, 2018.
- MAO, Yiwei. Apoptotic cell-derived metabolites in efferocytosis-mediated resolution of inflammation. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 62, p. 42-53, 2021.
- MARTIN, Constance J.; PETERS, Kristen N.; BEHAR, Samuel M. Macrophages clean up: efferocytosis and microbial control. **Current opinion in microbiology**, v. 17, p. 17-23, 2014.
- MARTIN, S. J.; BRADLEY, J. G.; COTTER, T. G. HL-60 cells induced to differentiate towards neutrophils subsequently die via apoptosis. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 79, n. 3, p. 448-453, 1990.
- MORIOKA, Sho; MAUERÖDER, Christian; RAVICHANDRAN, Kodi S. Living on the edge: efferocytosis at the interface of homeostasis and pathology. **Immunity**, v. 50, n. 5, p. 1149-1162, 2019.
- MURRAY, Peter J.; WYNN, Thomas A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature reviews immunology**, v. 11, n. 11, p. 723-737, 2011.
- NAGATA, Shigekazu. Apoptosis and clearance of apoptotic cells. **Annual review of immunology**, v. 36, p. 489-517, 2018.
- NEWTON, Kim et al. Cell death. **Cell**, v. 187, n. 2, p. 235-256, 2024.
- O'NEILL, Katelyn L. et al. Inactivation of prosurvival Bcl-2 proteins activates Bax/Bak through the outer mitochondrial membrane. **Genes & development**, v. 30, n. 8, p. 973-988, 2016.

- ORECCHIONI, Marco et al. Corrigendum: Macrophage polarization: Different gene signatures in M1 (LPS+) vs. classically and M2 (LPS-) vs. alternatively activated macrophages. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 234, 2020.
- PILÁTOVÁ, Martina Bago et al. Ceramides and their roles in programmed cell death. **Advances in Medical Sciences**, v. 68, n. 2, p. 417-425, 2023.
- PROTO, Jonathan D. et al. Regulatory T cells promote macrophage efferocytosis during inflammation resolution. **Immunity**, v. 49, n. 4, p. 666-677. e6, 2018.
- REHEMTULLA, Alnawaz et al. Ultraviolet radiation-induced apoptosis is mediated by activation of CD-95 (Fas/APO-1). **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 41, p. 25783-25786, 1997.
- RIEGER, Aja M. et al. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 50, p. e2597, 2011.
- Roberts KM, Rosen A, Casciola-Rosen LA. Methods for inducing apoptosis. **Methods Mol Med**. 2004.
- SALINA, Ana Carolina Guerta et al. Different bacterial cargo in apoptotic cells drive distinct macrophage phenotypes. **Apoptosis**, v. 29, n. 3, p. 321-330, 2024.
- SALINA, Ana Carolina Guerta et al. Different bacterial cargo in apoptotic cells drive distinct macrophage phenotypes. **Apoptosis**, v. 29, n. 3, p. 321-330, 2024.
- SALINA, Ana CG et al. Efferocytosis of SARS-CoV-2-infected dying cells impairs macrophage anti-inflammatory functions and clearance of apoptotic cells. **Elife**, v. 11, p. e74443, 2022.
- SALINA, Ana CG et al. Efferocytosis of SARS-CoV-2-infected dying cells impairs macrophage anti-inflammatory functions and clearance of apoptotic cells. **Elife**, v. 11, p. e74443, 2022.
- SHAPOURI-MOGHADDAM, Abbas et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **Journal of cellular physiology**, v. 233, n. 9, p. 6425-6440, 2018.
- SHIHAB, Nahla; LIM, Henry W. Potential cutaneous carcinogenic risk of exposure to UV nail lamp: A review. **Photodermatology, photoimmunology & photomedicine**, v. 34, n. 6, p. 362-365, 2018.
- SHKARINA, Kateryna; BROZ, Petr. Selective induction of programmed cell death using synthetic biology tools. In: **Seminars in Cell & Developmental Biology**. Academic Press, 2023.
- SHKARINA, Kateryna; BROZ, Petr. Selective induction of programmed cell death using synthetic biology tools. In: **Seminars in Cell & Developmental Biology**. Academic Press, 2023.
- SINGH, Rumani; LETAI, Anthony; SAROSIEK, Kristopher. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 20, n. 3, p. 175-193, 2019.
- SUBRAMANIAN, Manikandan et al. An AXL/LRP-1/RANBP9 complex mediates DC efferocytosis and antigen cross-presentation in vivo. **The Journal of clinical investigation**, v. 124, n. 3, p. 1296-1308, 2014.
- SZONDY, Zsuzsa et al. Anti-inflammatory mechanisms triggered by apoptotic cells during their clearance. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 280322, 2017.
- TAJBAKHSH, Amir et al. Effect of soluble cleavage products of important receptors/ligands on efferocytosis: their role in inflammatory, autoimmune and cardiovascular disease. **Ageing Research Reviews**, v. 50, p. 43-57, 2019.
- TAJBAKHSH, Amir et al. Regulation of efferocytosis by caspase-dependent apoptotic cell death in atherosclerosis. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 120, p. 105684, 2020.

TAJBAKHS, Amir et al. The role of nuclear factors as “Find-Me”/alarmin signals and immunostimulation in defective efferocytosis and related disorders. **International Immunopharmacology**, v. 80, p. 106134, 2020.

TORCHINSKY, Miriam Beer et al. Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs TH17 cell differentiation. **Nature**, v. 458, n. 7234, p. 78-82, 2009.

TUMMERS, Bart; GREEN, Douglas R. The evolution of regulated cell death pathways in animals and their evasion by pathogens. **Physiological reviews**, v. 102, n. 1, p. 411-454, 2022.

VAN OPDENBOSCH, Nina; LAMKANFI, Mohamed. Caspases in cell death, inflammation, and disease. **Immunity**, v. 50, n. 6, p. 1352-1364, 2019.

XU, Xiaolong et al. Inhibition of PTP1B promotes M2 polarization via microRNA-26a/MKP1 signaling pathway in murine macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1930, 2019.

YUNNA, Chen et al. Macrophage M1/M2 polarization. **European journal of pharmacology**, v. 877, p. 173090, 2020.

YURDAGUL, Arif et al. Macrophage metabolism of apoptotic cell-derived arginine promotes continual efferocytosis and resolution of injury. **Cell metabolism**, v. 31, n. 3, p. 518-533. e10, 2020.

ZHONG, Xiancai et al. Myc-nick promotes efferocytosis through M2 macrophage polarization during resolution of inflammation. **The FASEB Journal**, v. 32, n. 10, p. 5312-5325, 2018.