



HAL
open science

Neutrophil activation by MNCF lectin results in gene transcription and secretion of cytokines, even in anti-inflammatory conditions

Karina Alves de Toledo

► **To cite this version:**

Karina Alves de Toledo. Neutrophil activation by MNCF lectin results in gene transcription and secretion of cytokines, even in anti-inflammatory conditions. Immunology. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2007. Portuguese. NNT : 2007PA066554 . tel-00809242

HAL Id: tel-00809242

<https://theses.hal.science/tel-00809242>

Submitted on 8 Apr 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ
PIERRE & MARIE CURIE
LA SCIENCE A PARIS

**DA ATIVAÇÃO DE NEUTRÓFILOS PELA LECTINA MNC^F DECORREM TRANSCRIÇÃO GÊNICA
E SECREÇÃO DE MEDIADORES SUSTENTADAS EM AMBIENTE ANTI-INFLAMATÓRIO**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto para obtenção do título de Doutor em
Ciências, área de concentração Imunologia Básica e Aplicada

Aluna: Karina Alves de Toledo

Orientadora: Maria Cristina Roque Barreira

Co-orientadora: Lise Halbwachs-Mecarelli

RIIBEIRÃO PRETO

2007



UNIVERSITÉ
PIERRE & MARIE CURIE
LA SCIENCE A PARIS

THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité
Immunologie

Présentée par
Mlle. Karina Alves de Toledo

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR de les UNIVERSITÉS de SÃO PAULO et PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

L'activation des neutrophiles par le MNCF a pour conséquence la transcription des gènes et la sécrétion de cytokines, et cela même dans des conditions anti-inflammatoires

Soutenue le 21-decembre-2007

Devant le jury composé de :

Mme. ROQUE-BARREIRA Maria Cristina
Mme. MECARELLI Lise Halbwachs
Mme. MORENO Andréa Novais
Mme. BISSON Gabriela Silva
M. LESAVRE Philippe
M. DONADI Eduardo Antonio

Directeur de thèse
Directeur de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

Dedico...

... a Deus por toda força que me destes durante esta longa caminhada.

Ofereço...

... ao meu marido Carlos, a quem eu não conseguiria, nem que a mim fossem dadas muitas páginas, expressar por inteiro todo o meu carinho, amor e gratidão. Esta tese também é sua.

Agradecimentos

Às Dras. Maria Cristina Roque Barreira e Lise Halbwachs-Mecarelli pela pronta acolhida em seus respectivos laboratórios e por todos os ensinamentos que muito contribuíram para a minha formação.

Aos professores Drs. Marcelo Dias Baruffi, Maria Célia Jamur e Constance Oliver pela disponibilidade em me atender sempre que necessário. Acrescento ainda a este time o Dr. Philippe Lesavre e as Dras. Gabriela Pereira Bisson, Andréa Novais Moreno e Veronique Witko-Sarsat que, todos juntos, tanto contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Às queridas secretárias Ana Cristine, Rosângela e Silvia (CPG) que moram no meu coração.

Às técnicas Patrícia E. Vendruscolo, Sandra Maria de Oliveira Thomaz e Érica Vendruscolo pela preciosa ajuda e competente apoio técnico.

Às queridas amigas Camilinha, Luciana Ruas, Aline, Cláudia Polli, Vânia e Dani Carlos por toda a amizade, lealdade e profissionalismo, além é claro dos infinitos momentos de alegria juntas.

Ao amiguinho Trança por estar sempre disponível e ser sempre solícito a solucionar nossas intermináveis dúvidas.

Às “copines” Agnès, Soumeya, Chehrazade, Dikra, Magali, Sandra, Julie e Sandra pelos ótimos momentos que passamos juntas e por toda a paciência que tiveram comigo.

À Inês e Lúcia, pela amizade, respeito e todo o carinho com o qual tanto nos ajudam em nossos trabalhos.

Aos colegas de laboratório, cada um tem sua parcela particular de ajuda neste trabalho.

À FAPESP, CAPES e FAEPA pelo auxílio financeiro para realização deste trabalho.

Enfim, a todos aqueles que de forma direta ou indireta estiveram presentes nesta etapa da minha vida.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	16
Resposta inflamatória aguda.....	16
Desgranulação neutrofílica.....	21
Morte celular.....	29
Glicocorticóides e inflamação.....	34
MNCF.....	36
OBJETIVOS	38
MATERIAL E MÉTODOS	39
Obtenção da lectina MNCF.....	39
PARTE I	
Separação de neutrófilos.....	40
Biotinilação da lectina MNCF.....	41
Interação de MNCF-biotinilado e neutrófilos pré-tratados ou não com dexametasona ...	41
Migração de neutrófilos <i>in vitro</i>	42
Atividade mieloperoxidase (MPO).....	43
Expressão de CD62L.....	43
Avaliação dos filamentos de F-actina.....	44
Western blot para NF-kB p50.....	45
Real Time PCR para citocinas e quimiocinas.....	46
Quantificação de CXCL8.....	48

PARTE II

Purificação de neutrófilos humanos do sangue periférico.....	50
Apoptose em neutrófilos incubados com MNCF.....	50
Estudo da desgranulação neutrofílica através da expressão de CD11b, CD35, CD63 e CD66.....	51
Análise de fosforilação de proteínas tirosino-quinase e p38 MAP quinase.....	52

RESULTADOS.....	54
------------------------	-----------

PARTE I

MNCF interage na superfície de neutrófilos pré-tratados ou não com dexametasona.....	54
Migração neutrofílica <i>in vitro</i> , induzida por MNCF, não inibida por dexametasona.....	55
MNCF regula a expressão de CD62L em neutrófilos humanos.....	57
Efeito de MNCF sobre o aumento de expressão de F-actina e a polarização de neutrófilos pré-tratados, ou não, com dexametasona	59
Pré-tratamento com dexametasona não inibe a translocação do fator de transcrição NF- κ B induzido por MNCF.....	64
MNCF ativa a expressão gênica de TNF- α , IL-1 β , CCL4 e CXCL8 por neutrófilos humanos estimulados pela lectina MNCF, mesmo quando pré-tratados com dexametasona.....	66
Neutrófilos pré-tratados com dexametasona sob o estímulo de MNCF secretam CXCL8	67

PARTE II

Efeito anti-apoptótico de MNCF sobre neutrófilos humanos.....	69
---	----

MNCF induz desgranulação neutrofílica.....	72
MNCF induz fosforilação de tirosino-quinases e p38 MAPK em neutrófilos.....	75
Avaliação das possíveis vias de sinalização envolvidas na desgranulação induzida por MNCF.....	77
DISCUSSÃO.....	79
CONCLUSÕES.....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

ABREVIATURAS

7AAD	<i>7-amino-actinomycin D</i>
AP-1	Fator de transcrição AP-1
Apaf-1	<i>Apoptosis-activating factor 1</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
BPI	<i>Bactericidal/permeability-increasing protein</i>
C5a	Componente 5a do sistema complemento
CRD	<i>Carbohydrate recognition domain</i>
DAB	<i>3,3'-Diaminobenzidine</i>
DX	Dexametasona
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FAAD	<i>Fas-associated death domain</i>
Fas	Receptor de morte celular (CD95 ou APO-1)
FasL	Ligante do receptor de morte celular
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GR	<i>Glucocorticoid receptor</i>
HBSS	<i>Hank's buffered saline solution</i>
hCAP-18	<i>Human cathelicidin antimicrobial protein</i>
HPA	<i>Hypothalamic-pituitary-adrenal</i>
IgY	Imunoglobulina de galinha
JAM	<i>Junctional adhesion molecule</i>
LAMP	<i>Lysosome-associated membrane protein</i>
LTB4	Leucotrieno B4
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MIF	<i>Mean intensity fluorescence</i>
MNCF	<i>Macrophage-derived neutrophil chemotactic factor</i>
MPO	Mieloperoxidase
NF- κ B	<i>Nuclear factor-κB</i>

NGAL	<i>Neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>
P388-D1	Linhagem celular de macrófagos de camundongos
p38 MAPK	Proteína p38 MAP
PAF	<i>Platelet-activating factor</i>
PBS	<i>Phosphated-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PD98059	<i>2'-amino-3'-methoxyflavone</i> (inibidor de ERK MAPK)
PE	<i>Phycoeritrine</i>
PECAM-1	<i>Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31)</i>
PKC	<i>Protein kinase C</i>
PMA	<i>Phorbol myristate acetate</i>
PP2	<i>4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine</i> (inibidor de Src)
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
RBL-2H3	Linhagem celular de mastócitos de rato
RPMI	Meio de cultura
SB203580	<i>(4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)-1H-imidazole)</i> (inibidor de p38 MAPK)
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Src	Família de proteínas tirosino-quinase (Fgr, Hck, Lyn)
SYBR	<i>Synergy Brands</i>
Syk	Proteína tirosino-quinase
TMB	<i>3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine</i>
UNG	Uracil-N-glicosilase

RESUMO

O acúmulo focal de leucócitos, próprio da inflamação, é desencadeado por uma ampla gama de mediadores, de origens variadas. A migração das células ocorre em múltiplas etapas coordenadas e pode ser inibido por glicocorticóide, que exerce efeitos reguladores negativos –sobre a síntese/ou liberação de moléculas pró-inflamatórias e de adesão– e positivos –sobre a expressão de anexina-1, proteína de ação anti-inflamatória. Temos estudado o efeito indutor de migração de neutrófilos exercido por MNCF (macrophage derived neutrophil chemotactic factor), que é uma lectina ligante de galactosídeos, dotada da propriedade de recrutar neutrófilos mesmo em condição anti-inflamatória, gerada pelo tratamento com dexametasona. Essa atividade peculiar pode ter repercussões relevantes no desenho de estratégias terapêuticas para frear a inflamação quando ela causa lesão tissular. Isso justifica o especial interesse na compreensão dos mecanismos de ação de MNCF sobre neutrófilos humanos. Nesse contexto, demonstramos anteriormente que a interação de MNCF com componentes da matriz extracelular pode contribuir para que a ação desse agente supere o efeito anti-inflamatório da dexametasona (Toledo et al 2007). Neste trabalho, nosso objetivo é identificar as respostas de ativação dos neutrófilos determinadas por MNCF, de maneira a identificar diferenças entre essas respostas e as desencadeadas por atraentes cujas ações sejam sensíveis ao efeito anti-inflamatório da dexametasona. Ensaio *in vitro* demonstraram que MNCF, a partir de ligação à superfície celular, induz a migração de neutrófilos humanos, tanto normais como pré-incubados com dexametasona. Ao atuar sobre neutrófilos normais, MNCF induziu respostas qualitativamente muito similares às induzidas por outro atraente, quais sejam: (a) fosforilação de tirosino-quinases e de p38 MAP; (b) *shedding* de L-selectina; (c) desgranulação de grânulos secundários e vesículas secretórias, mas não de grânulos azurofílicos; (d) resistência à apoptose espontânea; (e) translocação nuclear do fator de transcrição NF-κB; (f) transcrição gênica e secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias; (g) polarização celular. Os neutrófilos estimulados com MNCF – em

comparação aos estimulados com outro atraente (CXCL-8) – polarizaram mais tardiamente e apresentaram níveis superiores de transcrição de genes de mediadores inflamatórios. Quando neutrófilos pré-tratados com dexametasona foram estimulados, os níveis de transcrição gênica de mediadores inflamatórios foram mantidos frente a MNCF e inibidos frente a CXCL8. Dentre os mediadores que tiveram o gene transcrito em níveis altos inclui-se a própria CXCL8, cuja expressão protéica foi também avaliada. Neutrófilos –pré-tratados ou não com dexametasona– estimulados com MNCF secretaram altos níveis de CXCL-8 no sobrenadante. Já, frente a outros estímulos, neutrófilos pré-tratados com dexametasona tiveram a secreção de CXCL8 fortemente inibida. Nossos resultados indicam que os mecanismos envolvidos no fato da inflamação aguda desencadeada por MNCF ser resistente ao efeito de glicocorticóide incluem a capacidade dessa lectina de induzir altos níveis de produção de mediadores inflamatórios, manifesta mesmo em neutrófilos pré-tratados com dexametasona. Nosso estudo está em consonância com os avanços feitos nos últimos dez anos no campo de investigações sobre neutrófilos, que atribuem a essas células funções mais complexas do que a ingestão e eliminação de microorganismos, com destaque para a sua capacidade de transcrever genes e expressar produtos que estão intimamente ligados às respostas inflamatória e imunitária.

Palavras chave: MNCF, migração de neutrófilos, dexametasona, transcrição gênica, secreção de citocinas

TITRE: L'activation des neutrophiles par le MNCF a pour conséquence la transcription des gènes et la sécrétion de cytokines, et cela même dans des conditions anti-inflammatoires

RÉSUMÉ

Le recrutement des leucocytes dans les sites inflammatoires est déclenché par des médiateurs d'origines diverses. Il comprend plusieurs étapes coordonnées, susceptibles d'être inhibées par des glucocorticoïdes. Ces derniers diminuent la synthèse et/ou la sécrétion de molécules pro-inflammatoires ou de molécules d'adhérence et augmentent l'expression de l'annexine-1, une protéine anti-inflammatoire. Nous avons étudié le MNCF (Facteur Chimioattractant pour les Neutrophiles et dérivé des Macrophages), une lectine liant le D-galactose et capable de recruter les neutrophiles, y compris dans les conditions anti-inflammatoires représentées par le traitement par la dexaméthasone. Cette propriété particulière pourrait inspirer le montage de nouvelles thérapeutiques anti-inflammatoires et justifie que l'on s'intéresse particulièrement à la compréhension du mécanisme d'action du MNCF sur les neutrophiles humains. C'est dans ce contexte que nous avons démontré que l'interaction du MNCF avec des composants de la matrice extracellulaire permet à ce facteur de surmonter les effets anti-inflammatoires de la dexaméthasone (Toledo et al. 2007). Le but de cette recherche était de caractériser l'activation des neutrophiles humains par le MNCF, en la comparant à celle déclenchée par d'autres agonistes, après traitement par la dexaméthasone.

Des tests in vitro ont montré que le MNCF se lie à la surface des neutrophiles et provoque la migration de ces cellules, qu'elles soient ou non pré-traitées par la dexaméthasone. Les effets du MNCF étaient très semblables à ceux d'autres agonistes du

neutrophiles, à savoir : (a) l'inhibition de l'apoptose spontanée ; (b) le relargage de CD62L ; (c) la phosphorylation de tyrosine-kinases et de la p38MAPkinase ; (e) la dégranulation des vésicules de sécrétion et des granules spécifiques mais pas des granules azurophiles ; (f) la translocation du facteur de transcription NF- κ B et (g) la transcription des gènes et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines. Cependant, les effets du MNCF étaient spécifiques et non dus à des agonistes des neutrophiles contaminants, comme le LPS, le TNF- α ou des chimiokines. En effet, ces effets du MNCF n'étaient pas modifiés par la déplétion en LPS sur detoxigel, ni par le récepteur soluble du TNF, ethanercept et ils persistaient après pré-traitement des neutrophiles par la dexaméthasone, ce qui supprimait les effets de chimiokines comme CXCL8. Enfin, la pré-activation des neutrophiles par le LPS n'était pas nécessaire pour que soient observés les effets du MNCF, qui se distinguaient en cela des effets de la galectine 3. Nos résultats indiquent que l'inflammation aïgue induite par le MNCF in vivo, même chez les animaux traités avec de la dexaméthasone, s'explique par la capacité de ce facteur à produire des taux élevés de médiateurs pro-inflammatoires par un mécanisme insensible aux glucocorticoïdes. Nos données sont en accord avec différentes études rapportées ces derniers dix ans, qui montrent que l'action des neutrophiles ne se limite pas à l'élimination des microbes mais comprend la transcription de gènes et une participation active aux réponses inflammatoire et immunitaire.

Mots clés: MNCF, migration des neutrophiles, dexaméthasone, transcription des gènes, sécrétion de cytokines

TITLE: Neutrophil activation by MNCF lectin results in gene transcription and secretion of cytokines, even in anti-inflammatory conditions

ABSTRACT

Leukocytes are accumulated, in the inflammatory process, because to action of the wide array of stimuli. This event involved several and coordinated steps whose inhibited by glucocorticoids, such as dexamethasone. Dexamethasone affects human neutrophils in different ways. It shows negative effects (on synthesis and secretion of pro-inflammatory mediators) and positive effects (for example, on annexin I). Among the inducers of leukocyte migration, MNCF, a galactose-binding lectin, has been described as an agonist and chemoattractant for neutrophils, both *in vivo* and *in vitro*. MNCF shows as peculiar activity the migration of neutrophils resistant to dexamethasone actions which awakes great interest in understanding the mechanism of action on polymorphonuclears by this lectin. Our first step was study human MNCF-stimulated neutrophils pre-incubated with dexamethasone. In these conditions, MNCF, in the absence of F-actin polymerization: (a) protects neutrophils from spontaneous apoptosis, (b) induces tyrosine and p38 MAP kinases phosphorylation, (c) induces CD62L shedding, (d) degranulates secretory vesicles and secondary granules, but not azurophilic granules, in the dependent manner of tyrosine and MAP kinases and Src family, (e) translocates the transcription factor NF- κ B and, (f) induces transcription and secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines. In parallel, human neutrophils pre-incubated with dexamethasone and stimulated with MNCF did not show CD62L shedding and F-actin polarization, but the *in vitro* migration was maintained. Besides, we already observe translocation of NF- κ B from cytoplasm to nucleus which it activates the genic transcription

and secretion of inflammatory mediators, such as CXCL8. The results, showed here, strengthens previous results, demonstrating that MNCF as a agonist to neutrophils, beyond increase the half life them. Although, dexamethasone modifies some effects of MNCF on neutrophils, this glucocorticoid does not inhibit the cellular response to the studied lectin. Thus, the maintenance of inflammatory mediators, depends to NF- κ B, during the inflammatory process, could explain, even partially, the break in the resistance to glucocorticoids actions by MNCF in the neutrophil migration.

Keywords: MNCF, neutrophil migration, dexamethasone, gene transcription, secretion of cytokines

INTRODUÇÃO

RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA

As respostas inflamatórias são operacionalmente caracterizadas por dor, rubor, calor e edema no sítio de infecção, refletindo três tipos de mudanças nos vasos sanguíneos locais. A primeira é o aumento do diâmetro vascular, levando a um aumento no fluxo sanguíneo, especialmente nos pequenos vasos sanguíneos locais. A segunda mudança é que as células endoteliais, que formam os vasos sanguíneos, são ativadas para expressar moléculas de adesão que promovem a interação com leucócitos circulantes. A combinação da taxa do fluxo sanguíneo diminuída e da expressão das moléculas de adesão permite aos leucócitos aderirem ao endotélio e migrarem em direção aos tecidos perivasculares, em um processo denominado extravasamento. Todas essas mudanças são produzidas, em grande parte, pela atividade de fatores quimiotáticos liberados pelos macrófagos ativados presentes no tecido inflamado (Deuel et al., 1981; Doherty et al., 1987; Brandes et al., 1991; Worthen et al., 1992). No início de um processo inflamatório, as primeiras células atraídas ao local são os neutrófilos, seguidos pelos monócitos, que se diferenciam em macrófagos nos tecidos. Nas etapas posteriores, outros leucócitos, como eosinófilos e linfócitos, chegam ao foco inflamatório (Kay, 1970; Bienenstock et al., 1986). A terceira maior mudança nos vasos sanguíneos locais é o aumento da permeabilidade vascular. Em vez de permanecerem firmemente próximas entre si, as células endoteliais que limitam a parede dos pequenos vasos sanguíneos se separam, permitindo a saída de fluido e proteínas do sangue, que se acumulam. De tais eventos decorrem o edema, a dor e o rubor localizados, que correspondem à clássica tríade de manifestações da inflamação.

Os neutrófilos, como já mencionado, constituem a primeira população celular que atravessa as paredes dos vasos em direção ao sítio inflamatório. A migração de neutrófilos é finamente regulada, ocorre através de uma sequência de ativação de proteínas adesivas e de seus ligantes, expresso nos neutrófilos e nas células endoteliais (Lawrence & Springer, 1991; Von Andrian et al., 1991; Konstantopoulos & McIntire, 1996), como esquematizado de maneira resumida na **figura 1**.

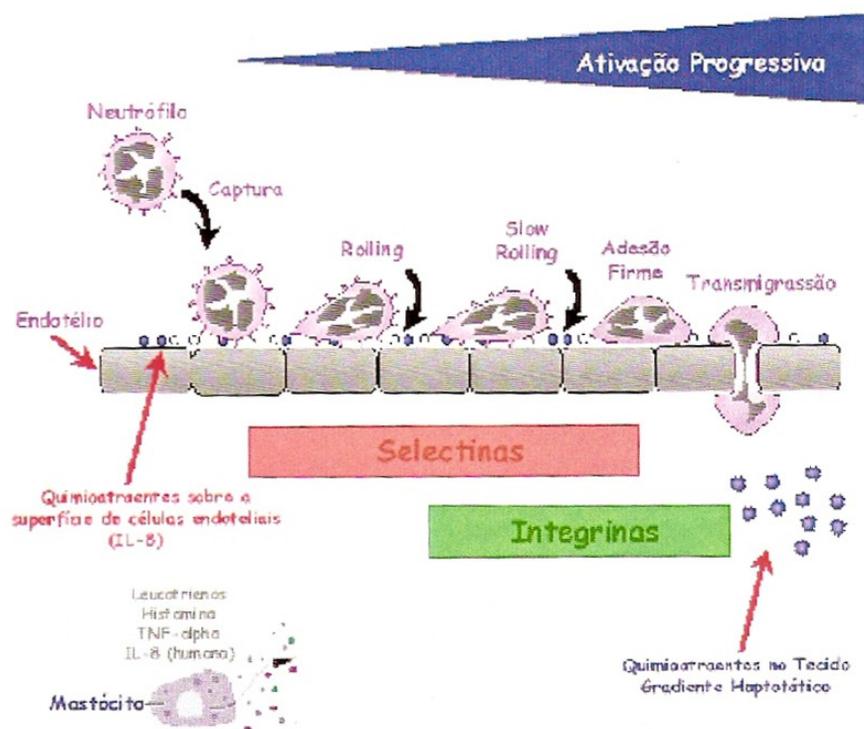


Figura 1. Recrutamento de neutrófilos é dissecável em passos distintos envolvendo interações seqüenciais de diferentes famílias de moléculas de adesão em leucócitos e células endoteliais. O rolling envolve interações entre membros da família das selectinas (L-, P- e E-selectina) e seus respectivos ligantes que apresentam o resíduo Lewis^x. A ativação de integrinas da família $\beta 2$ e moléculas de adesão da família das imunoglobulinas (ICAMs) por uma variedade de estímulos proporciona firme adesão do neutrófilos ao endotélio inflamado, evento que irá proporcionar a transmigração celular, por muitas vezes citada como diapedese. A molécula PECAM-1 presente tanto na superfície de neutrófilos como células endoteliais possui papel primordial neste processo.

A participação de interações do tipo proteína-carboidrato na resposta inflamatória começou a ser evidenciada no início da década de 1980, por Stoolman & Rosen (1983). Tais interações, reversíveis, determinam ligações de baixa afinidade, que fazem o leucócito rolar, em velocidade menor do que a do fluxo sanguíneo, ao longo da superfície do endotélio vascular, adjacente ao local de inflamação. As selectinas, glicoproteínas transmembrânicas expressas no endotélio vascular - P-selectina, E-selectina - e nos leucócitos - L-selectina - medeiam esse fenômeno, ao reconhecerem açúcares ligantes cognatos, geralmente imobilizados em estruturas do tipo mucina. O neutrófilo expressa L-selectina constitutivamente, molécula que interage com oligossacarídeos do tipo mucina (Varki, 1997), induzidos por mediadores inflamatórios (Spertini et al., 1991). A L-selectina é despreendida da superfície celular por clivagem proteolítica (*shedding*), 5 a 10 minutos após a ativação do neutrófilo (Kishimoto et al., 1989; Griffin et al., 1990; Smith et al., 1991; Bazil & Strominger, 1994), mecanismo que, aparentemente, limita o recrutamento dessas células durante processos inflamatórios (Hafezi-Moghadam et al., 2001). As selectinas-P e -E são expressas em resposta a estímulos inflamatórios apropriados. Segundos após o estímulo do endotélio, a P-selectina, constitutivamente sintetizada e estocada nos corpúsculos de Weibel-Palade, é transportada para a superfície do endotélio e rapidamente distribuída na membrana. A P-selectina interage com uma sialoglicoproteína (P-selectin glycoprotein ligand-1, PSGL-1) (Moore et al., 1992), uniformemente distribuída em neutrófilos quiescentes. Na presença de estímulos inflamatórios, a ligação da P-selectina é acompanhada por uma rápida distribuição de PSGL-1 no uropódio dos neutrófilos ativados e pode sinalizar a transição do *rolling* para a fase de captura dessas células (Bruehl et al., 1997). A expressão da P-selectina é de curta duração, e a adesão tem continuidade pela E-selectina, molécula que também se liga a sialoglicoproteínas da superfície do neutrófilo (revisto por Wagner & Roth, 2000).

O sinal que dispara a etapa seguinte do processo de migração é oriundo das selectinas ativadas. Os domínios citoplasmáticos, das selectinas-L e PSGL-1 ativadas estão implicados em mecanismos de transdução de sinais, que levam a ativação das integrinas nos neutrófilos (Simon et al., 1995, 1999; Macever & Cummings, 1997; Williams & Solomkin, 1999). Dessa forma, as selectinas promovem transição ordenada do processo de adesão, induzindo a expressão temporal e sequencialmente adequada das integrinas. As integrinas são glicoproteínas transmembrânicas heterodiméricas, expressas na superfície de leucócitos como heterodímeros de CD11/CD18. Estabelecem interações do tipo proteína-proteína, com seus ligantes expressos na superfície das células endoteliais, que correspondam a moléculas da superfamília das imunoglobulinas - ICAM-1 e ICAM-2. Essas interações determinam a adesão firme do leucócito ao endotélio (revisto por Wagner & Roth, 2000).

Nessa etapa da cascata de adesão, além dos sinais induzidos pelas selectinas ativadas, moléculas atraentes de leucócitos passam a atuar. O endotélio dos microvasos, em condições de inflamação, produz atraentes, como o fator ativador de plaquetas (PAF), leucotrieno B4 (LTB4) e várias quimiocinas. Esses atraentes são imobilizados por ligação a proteoglicanos, na superfície luminal das células endoteliais (revisto por Witko-Sarsat et al., 2000). Dentre as quimiocinas, a interleucina-8 (CXCL-8) é considerada o principal atraente de neutrófilos, uma vez que sua neutralização por anticorpos monoclonais inibe o recrutamento de neutrófilos para o sítio de inflamação (Folkesson et al., 1995; Matsumoto et al., 1997; Sekido et al., 1993). A CXCL8 é derivada do tecido e internalizada pelas células endoteliais das vênulas pós-capilares. Através de vesículas de plasmalema, CXCL-8 é transportada abluminalmente até a superfície dessas células, onde se associa aos microvilos e é apresentada aos leucócitos aderidos (Middleton et al., 1997). De uma maneira geral, as moléculas atraentes induzem a translocação e a ativação de CD11/CD18, do *pool* de

estocagem intracelular, para a superfície do leucócito. A expressão de integrinas na superfície celular é aumentada três a dez vezes, minutos após o estímulo por mediadores inflamatórios como TNF- α , C5a, LTB₄, fMLP e quimiocinas (Huber et al., 1991; Sengelov, 1996; Borregaard & Cowland, 1997). As próprias moléculas de integrinas estão envolvidas em eventos de sinalização intracelulares, uma vez que suas caudas citoplasmáticas constituem sítios para fosforilação e atuam na ligação a proteínas do citoesqueleto (Alpin et al., 1998). Os neutrófilos integram os sinais induzidos simultaneamente pelo engajamento de integrinas e pelas citocinas inflamatórias ou atraentes, de maneira a ativar uma série de eventos intracelulares que resultam no *spreading* celular e na sua locomoção (revisto por Witko-Sarsat et al., 2000). Os neutrófilos adquirem morfologia polarizada, o que permite que se locomovam vetorialmente para o tecido perivascular (Snyderman & Goetzl, 1981; Clark & Brudgge, 1995; Lauffenburger & Howitz, 1996), num processo de transmigração.

A transmigração de neutrófilos ocorre em etapas que são coordenadas tanto por moléculas de adesão, como por mediadores solúveis derivados do microambiente local (Bruyninckx et al., 2001). Esse processo envolve interações homotípicas estabelecidas por CD31 (PECAM-1) que é uma molécula de adesão de expressão constitutiva, membro da superfamília das imunoglobulinas. Moléculas de CD31 têm distribuição juncional em células endoteliais e são também expressas na superfície do leucócito, o que viabiliza a interação homotípica e a passagem do leucócito pela junção endotelial (revisto por Bianchi et al., 1997). Recentemente, demonstrou-se que CD31 desencadeia sinalização intracelular em neutrófilos, regulando a “rede” de actina, o que afeta, em última instância, a forma das células que migram através da junção entre duas células endoteliais (Dimitrijevic et al., 2002). CD31 promove a migração haptotática dos leucócitos, entendendo-se tal fenômeno

como a migração ao longo de um gradiente de moléculas atraentes ligadas a um substrato fixo (Muller et al., 1993; Vaporcyan et al., 1993; Muller, 1995). Além de CD31, atribuiu-se à molécula de adesão juncional (JAM - membro da superfamília das imunoglobulinas), concentrada seletivamente nas junções inter-endoteliais, um papel no processo de transmigração de leucócitos em modelos murinos (Marín-Padura et al., 1998).

Vencida a barreira endotelial, o leucócito passa a se mover em direção ao gradiente de atraente, estabelecido no espaço sub-endotelial. O atraente pode dirigir o movimento do leucócito, ainda localizado na junção endotelial, desde que se difunda, a partir do sub-endotélio, e estabeleça um gradiente juncional (Zocchi et al., 1996). A migração dos neutrófilos através da matriz extracelular é mediada pelas integrinas $\beta 2$, conjuntamente com $\beta 1$ e $\beta 3$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$, receptores para laminina, fibronectina e vitronectina. Essas moléculas, que se encontram estocadas nos grânulos dos neutrófilos, durante a transmigração, sob o estímulo de atraentes, são rapidamente expressas na membrana plasmática (Bohnsack et al., 1995; Hendey et al., 1996; Loike et al., 1999; Roussel & Gingras, 1997). A locomoção leucocitária requer a formação contínua de novos contatos adesivos na região frontal da célula, enquanto a região posterior desliga-se do substrato adesivo (Lauffenburger & Horwitz, 1996).

DESGRANULAÇÃO NEUTROFÍLICA

Leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) exercem papel crucial na primeira linha de defesa contra bactérias, fungos e protozoários invasores. A resposta inflamatória mediada, como já mencionado, é processo em múltiplas etapas, envolvendo a adesão inicial dos

neutrófilos circulantes ao endotélio vascular ativado, o subsequente extravasamento e migração de neutrófilos para o sítio inflamatório e, por último, a eliminação do microorganismo estranho, através de fagocitose, geração de metabólitos reativos do oxigênio e liberação de substâncias microbidas. Muitas dessas etapas são dependentes da mobilização de grânulos citoplasmáticos e vesículas secretórias. Os vários subtipos de grânulos contidos nos neutrófilos constituem um importante reservatório não somente de proteínas antimicrobianas, proteases e componentes do *burst oxidativo* - mas também de uma ampla gama de receptores de membrana para moléculas de adesão - expressas na matriz extracelular do endotélio - e de mediadores inflamatórios solúveis, como demonstra a **Tabela 1**. A mobilização controlada dessas organelas citoplasmáticas é que permite a transformação dos neutrófilos de células circulantes passivas em potentes efetoras da imunidade inata. Além disso, a exocitose regulada dos grânulos dos neutrófilos faz com que o arsenal de proteínas citotóxicas neles contido seja liberado de maneira direcionada, evitando na maioria das vezes, dano maior para o hospedeiro (revisado por Faurschou Borregard, 2003).

Tabela 1. Constituintes dos grânulos neutrofílicos

Classe de constituintes	Exemplo	Compartimento
Enzimas microbicidas	Mieloperoxidase	Grânulos azurofílicos
	Lisozima	Grânulos azurofílicos e específicos
	Fosfolipase A2	Grânulos específicos
Hidrolases ácidas	Catepsinas	Grânulos azurofílicos
	β -glucuronidase	
	N-acetil- β -glucosaminidase	
	Fosfatases	
Proteínases neutras	Serprocidinas (elastase, proteinase-3, catepsina-G, azurocidina (CAP-37))	Grânulos azurofílicos
	Gelatinase	Grânulos específicos
	Colagenase	Grânulos específicos
Peptídeos antimicrobianos	Defensinas	Grânulos azurofílicos
	Lactoferrina	Grânulos específicos
	Catelicidinas	Grânulos específicos
Receptores	Transmembrana (CR1 ou CD35, TNF-R, fMLP-R, IL8-R)	Grânulos específicos e/ou vesículas secretórias
	Linkados a GPI (Fc γ -RIII, uPAR, CD14)	Grânulos específicos e/ou vesículas secretórias
Receptores de adesão	CR3 (CD11b), CR4 (CD11c)	Grânulos específicos e/ou vesículas secretórias
Moléculas efetoras	Componentes da NADPH oxidase (gp91-phox, p22-phox)	Grânulos específicos e/ou vesículas secretórias
Proteínas citoplasmáticas	iNOS	Grânulos azurofílicos
	Fgr (tirosino quinase da família Src)	Grânulos específicos
	Hck (tirosino quinase da família Src)	Grânulos azurofílicos

Grânulos azurofílicos

Os grânulos azurofílicos são empacotados com proteínas hidrolases ácidas e antimicrobianas e, por muitos anos, foram vistos como lisossomos primários. Como os lisossomos, os grânulos azurofílicos contêm granulofisina (CD63) em sua membrana (Cham et al., 1994). No entanto, diferentemente dos lisossomos, eles não expressam LAMP-1 e LAMP-2 (lysosome-associated membrane protein) (Cieutat et al., 1998) e nem o receptor manose-6 fosfato, essenciais para as enzimas lisossomais (Dahms et al., 1989; Michaelson et al., 1992; Nauseef et al., 1992). Consequentemente, os grânulos azurofílicos são melhor vistos como grânulos secretórios regulados e não como lisossomos especializados (Cieutat et al., 1998). Ao lado de CD63, as seguintes proteínas de membrana foram identificadas nos grânulos azurofílicos: CD68 (Saito et al., 1991), presenilina (Mirinics et al., 2002), estomatina (Feuk-Lagerstedt et al., 2002) e ATP-ase H⁺ do tipo vacular (Nanda et al., 1996).

Os grânulos azurofílicos são muito heterogêneos, em tamanho e forma. Já foram descritas várias subpopulações que diferem quanto a características físicas, citoquímicas e morfológicas (Bainton et al., 1971; Parmley et al., 1987; Rice et al., 1987; Egesten et al., 1994). Com base na ordem de formação durante a mielopoiese, os grânulos azurofílicos podem ser divididos em dois grupos principais: os pobres em defensina, formados no início do estágio promielocítico e os ricos em defensina, formados na transição promielocítico/mielócito (Arnljots et al., 1998).

Os grânulos azurofílicos sofrem exocitose limitada em resposta à estimulação (Sengelov et al., 1993; Faurshou et al., 2002) e contribuem primariamente para a morte e degradação de microorganismos fagocitados, localizados no interior dos fagolisossomos (Joiner et al., 1989).

Grânulos peroxidase-negativos

Grânulos peroxidase-negativos podem ser específicos (ou secundários) e de gelatinase (ou terciários) (Kjeldsen et al., 1992). Grânulos específicos e de gelatinase diferem significativamente entre si quanto ao conteúdo protéico e propriedades secretórias. Grânulos específicos são grandes e ricos em substâncias antibióticas, o mesmo não acontecendo com os pequenos grânulos de gelatinase. Por outro lado, os grânulos de gelatinase são mais facilmente excitados do que os específicos (Sengelov et al., 1995). Essas características refletem a importância dos grânulos de gelatinase como um reservatório de enzimas que degradam a matriz extracelular e de receptores de membrana, implicados no extravasamento e diapedese dos neutrófilos. Os grânulos específicos participam de atividades antimicrobianas dos neutrófilos, através da mobilização de um arsenal de substâncias antimicrobianas tanto para os fagossomos quanto para o exterior celular (Joiner et al., 1989; Jesaitis et al., 1990; Mollinedo et al., 1997).

Vesículas secretórias

São vesículas endocíticas (Borregard et al., 1987) que estocam receptores associados à membrana, necessários para que ocorram as primeiras fases da resposta inflamatória mediada por neutrófilos. A mobilização das vesículas secretórias ocorre em resposta a uma ampla variedade de estímulos inflamatórios (Sengelov et al., 1993a e 1993b). Essas vesículas são ricas em β 2-integrina CD11b/CD18 (Mac-1, CR3) (Sengelov et al., 1993b), receptor de complemento 1 (CR1) (Sengelov et al., 1994), receptores para peptídeos bacterianos formilados (formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP)-receptors) (Sengelov et al., 1994b), receptor ácido de LPS CD14 (Detmers et al., 1995), receptor Fc γ III CD16 (Detmers

et al., 1995) e metaloprotease leucolisina (Kang et al., 2001). Em seguida a exocitose, as substâncias que estavam contidas nos grânulos são incorporadas à membrana plasmática. A decorrente mudança de superfície celular permite ao neutrófilo estabelecer firme contato com o endotélio vascular ativado.

Importância da desgranulação na resposta inflamatória aguda mediada por neutrófilos

Os compartimentos intracelulares mobilizáveis dos neutrófilos diferem quanto à hierarquia exocítica. Vesículas secretórias têm maior capacidade de liberação extracelular, seguida pelos grânulos de gelatinase, grânulos específicos e azurofílicos (Sengelov et al., 1993 e 1995). Assim, *in vitro*, o estímulo com concentrações nanomolares de mediadores inflamatórios, como fMLP, leva a uma rápida e quase completa descarga das vesículas secretórias, sem afetar significativamente a liberação dos diversos grânulos (Sengelov et al., 1993c). A estimulação mais intensa com um agonista como PMA, induz ampla liberação dos grânulos de gelatinase, moderada liberação dos grânulos específicos e baixa exocitose dos grânulos azurofílicos (Kjeldsen et al., 1992; Faurschou et al., 2002). Hierarquia semelhante de exocitose tem sido demonstrada na migração de neutrófilos *in vivo* (Sengelov et al., 1995), podendo ser reproduzidas pela elevação gradual nos níveis de Ca^{+2} intracelular (Sengelov et al., 1993). Vários estímulos são capazes de induzir aumento na concentração citosólica do Ca^{+2} , incluindo ativação de L-selectina, CD11b/CD18 e o receptor de fMLP (Laudanna et al., 1994; Ng-Sikorski et al., 1991). As vias de sinalização envolvidas no processo de desgranulação neutrofílica são complexas e foram, até o momento, apenas parcialmente mapeadas e resumidamente esquematizada na **Figura 2**.

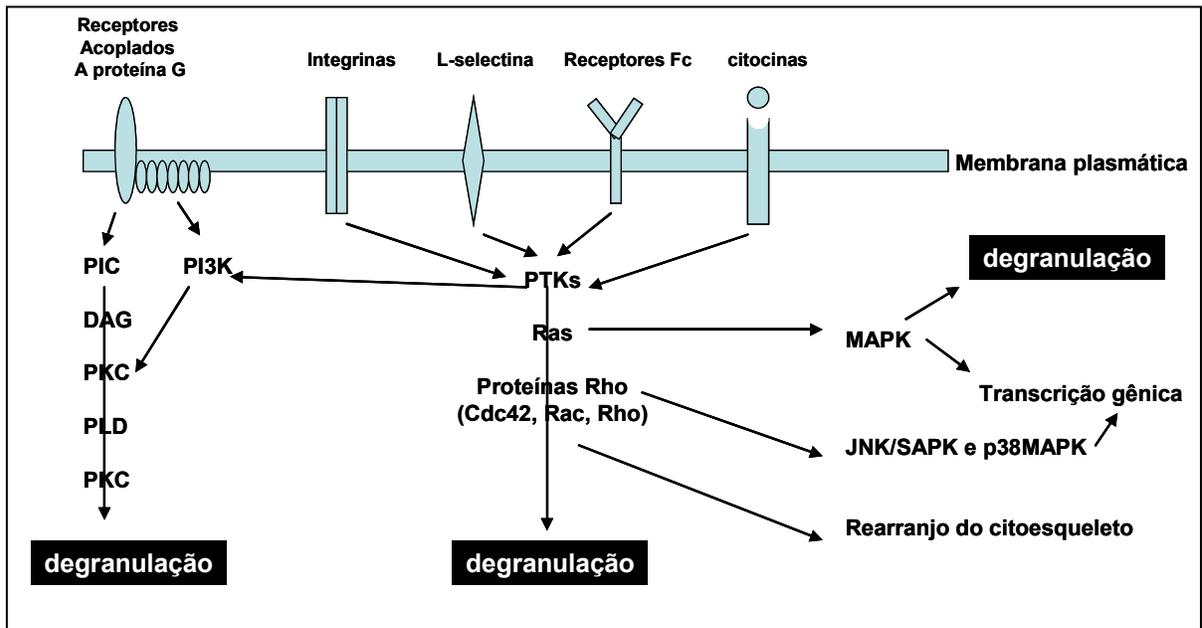


Figura 2. Mecanismos de transdução de sinal por receptores que ativam a degranulação. A figura ilustra as principais vias de sinalização transmembrânicas ativadas por receptores expressos em fagócitos e implicadas no processo de degranulação celular.

Resumidamente, o recrutamento de neutrófilos para o foco inflamatório ocorre num intervalo de minutos a horas e constitui um evento essencial na resposta aguda do hospedeiro contra patógenos invasores. Esse recrutamento envolve uma série de eventos de excitose regulados, que mudam gradualmente o estado funcional do neutrófilo. A interação neutrófilo-endotélio ativa a mobilização das vesículas secretórias (Borregaard et al., 1994), mobilização esta que enriquece a superfície dos neutrófilos com β 2-integrina CD11b/CD18 e é acompanhada pelo *shedding* de L-selectina (Sengelov et al., 1993; Borregaard et al., 1994). β 2-integrinas translocadas interagem com moléculas de adesão endoteliais da família ICAM, mediando adesão firme e iniciando a transmigração neutrofílica (Carlos e Harlan, 1994).

A exocitose dos grânulos de gelatinase libera metaloproteases colagenolíticas, as quais desempenham papel significativo na degradação da membrana basal vascular durante o extravasamento de neutrófilos (Delclaux et al., 1996). Na seqüência do processo de migração através do tecido intersticial, grânulos específicos e azurofílicos são parcialmente excitados (Sengelov et al., 1995), mobilizando receptores para componentes da matriz extracelular (Singer et al., 1989), bem como enzimas que degradam a matriz, incluindo colagenase e serina proteases, que facilitam a migração.

Frente à agressão bacteriana, o neutrófilo ativa seus sistemas antimicrobianos, dependentes ou não de oxigênio, pela liberação dos grânulos azurofílicos e específicos para o fagossomo ou para o exterior celular (Joiner et al., 1989). A diversidade funcional das substâncias contidas nos grânulos permite ao neutrófilo atacar a bactéria por diferentes vias. Alguns constituintes dos grânulos - como defensinas (Wimley et al., 1994), BPI (Ooi et al., 1987), hCAP-18 (Turner et al., 1998), lactoferrina (Chapple et al., 1998), lisosima (Tanida et al., 1992) - exercem atividade antimicrobiana através da ruptura da membrana bacteriana. Outras - como NGAL (Goetz et al., 2002), lactoferrina (Oram e Reiter, 1968) Nramp-1 (Jabado et al., 2000) - interferem nas vias metabólicas dependentes de ferro. Outras ainda - como citocromo b558 e MPO (Klebanoff, 1999) - participam da geração de espécies tóxicas do oxigênio. Uma característica interessante dos constituintes granulares, como defensinas, azurocidina e hCAP-18, é a capacidade de induzir quimiotaxia de células T CD4⁺ e CD8⁺ (Yang et al., 2000a e 2000b; Chertov et al., 1996), que amplifica a resposta inflamatória e estabelece um elo entre os mecanismos da imunidade inata e adaptativa.

MORTE CELULAR

A morte celular, definida como perda irreversível da estrutura e funções vitais da célula, ocorre por dois processos morfologicamente distintos: necrose e apoptose.

A necrose se caracteriza pela perda da integridade da membrana plasmática. Diferentes agressões, como isquemia, hipoxia, hipertermia, irradiação e metabólitos tóxicos, podem levar à perda abrupta da integridade da membrana plasmática (citólise) e à alteração de seus gradientes eletroquímicos. A liberação dos constituintes intracelulares para o meio extracelular estimula a resposta inflamatória e amplia a lesão tecidual.

A apoptose é processo ativo cuja marca registrada é a autodigestão controlada dos constituintes celulares, decorrente da ativação de proteases endógenas; tem sido comparada, metaforicamente, a um "suicídio celular". A ativação dessas proteases compromete a integridade do citoesqueleto, provocando um verdadeiro colapso da estrutura celular. Em resposta à contração do volume citoplasmático, a membrana celular forma bolhas e altera o posicionamento de seus lipídios constituintes. Em células quiescentes, a distribuição de fosfatidilserina se faz primariamente no folheto interno da membrana plasmática. No processo de apoptose a fosfatidilserina é exposta no folheto externo da membrana. O novo posicionamento da fosfatidilserina serve como sinalizador para que células fagocíticas das proximidades englobem os fragmentos celulares e completem o processo de degradação. Durante a apoptose ocorrem alterações características no núcleo celular, atribuídas à ativação de endonucleases que degradam o DNA. Como resultado, o núcleo torna-se picnótico e a cromatina se condensa nas porções adjacentes à membrana nuclear. Finalmente, o núcleo entra em colapso e se fragmenta. Simultaneamente, as bolhas que se formam no citoplasma separam a célula em fragmentos circundados por membrana, contendo partes do núcleo e organelas

intactas (corpos apoptóticos). Como já salientado, o processo de degradação dos restos celulares são fagocitados pelos macrófagos teciduais ou células adjacentes (revisto por Thompson, 1999 e Kerr et al., 1972) é completado.

A apoptose pode ser deflagrada por estímulos externos através de receptores específicos na superfície celular, chamados receptores da morte, ou por estímulos internos de estresse intracelular, tais como lesão do DNA e perturbações no ciclo celular ou nas vias metabólicas (**Figura 3**). As proteases que são ativadas por esses eventos são as caspases, fundamentais no processo de morte celular (revisto por Thompson, 1999 e Kerr et al., 1972). As caspases estão presentes no citosol sob a forma de pró-enzimas inativas, tornando-se ativas após clivagem proteolítica nos resíduos do ácido aspártico (Thompson, 1999). Pelo menos 14 membros dessa família já foram identificados nos mamíferos e estão envolvidos no processo de inflamação e apoptose. Uma vez ativada, a maioria das caspases é capaz de catalizar a ativação de outros membros da família, resultando em amplificação da cascata proteolítica. Alguns membros, tais como a caspase-8, ocupam posição proximal na cascata proteolítica e agem como reguladores e iniciadores. Outros, como a caspase-3, são mais distais e agem como efetores da fragmentação celular (Patel e Gores, 1998) (**Figura 3**). Contrariamente às proteases armazenadas nos lisossomos ou ativadas no citosol pelo cálcio, que atuam sobre um espectro amplo de substratos inespecíficos, as caspases têm substratos bem restritos, o que lhes assegura seletividade e especificidade no processo de proteólise. Tais substratos incluem proteínas envolvidas no reparo de danos e na replicação do DNA, no ciclo celular, na sinalização de transdução e na manutenção da integridade da estrutura celular. O ataque a todos esses alvos impede o reparo; toda a estrutura do citoesqueleto e do núcleo se rompe e há desestruturação da célula (Kerr et al., 1972; Thompson, 1999).

A apoptose pode ser ativada através de receptores de morte, presente na superfície celular e ativada em resposta ao acoplamento de ligantes específicos. A maioria desses receptores da morte é membro da superfamília de receptores para o fator de necrose tumoral (TNF- α) caracterizada por apresentar um domínio extracelular rico em cisteína e um domínio citoplasmático, chamado domínio da morte (ou *death domain*), essencial para transdução intracelular do sinal de morte. Dentre tais receptores, o mais estudado e melhor caracterizado é o receptor Fas (CD95 ou APO-1) (**Figura 3**) (Faubion e Gores, 1999; Kerr et al., 1972).

Quando o ligante Fas se acopla ao receptor Fas, as moléculas individuais do receptor se trimerizam formando agregados de cadeias da morte. Um vez agregadas, as cadeias da morte se ligam a uma proteína adaptadora, presente no citosol, chamada cadeia da morte associada ao Fas ("Fas-associated death domain", FADD). A ligação desse complexo à pro-caspase-8 resulta na ativação dessa enzima, por clivagem proteolítica. A caspase-8 pode então, diretamente ou pela via mitocondrial, ativar a caspase-3 (caspase efetora) (**Figura 3**).

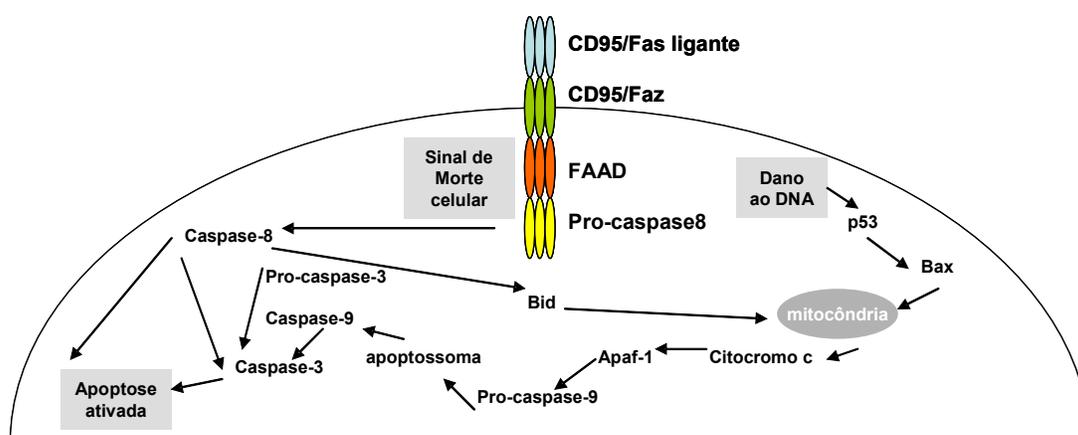


Figura 3. Vias implicadas no processo de apoptose celular.

Além dos receptores de morte, a apoptose pode também ser ativada por sinais de estresse intracelular que resultem em disfunção mitocondrial, tais como lesão do DNA (via gene *p53*), alterações nas vias metabólicas (aumento do cálcio intracelular, redução do pH, estresse oxidativo), drogas, toxinas ou privação dos fatores de crescimento. Na presença de sinais de estresse intracelular ocorre a translocação de proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bid, etc) do citosol para a mitocôndria. Essas proteínas fazem parte da família de proteínas *Bcl-2* cujos membros exercem importante função reguladora da apoptose (**Figura 3**). A translocação das proteínas pró-apoptóticas para a mitocôndria resulta na liberação de citocromo-c, presente entre as membranas mitocondriais externa e interna, para o citosol. Ali o citocromo-c forma um complexo com o fator ativador da apoptose 1 ("apoptosis-activating factor 1, apaf-1"), levando à ativação da caspase-9 que, por sua vez, ativa caspases efetoras. Portanto, a ativação das caspases pode ser desencadeada via receptores de morte ou via disfunção mitocondrial, com liberação do citocromo-c (revisto por Thompson, 1999 e Kerr et al., 1972).

Apoptose na resolução da inflamação

A apoptose de neutrófilos e sua subsequente ingestão por macrófagos é o principal mecanismo para a eliminação de neutrófilos que tenham sido recrutados para o sítio inflamatório, promovendo assim a resolução da inflamação (Cox et al, 1995; Savill, 1997). A apoptose constitutiva de neutrófilos senescentes envolve a cascata proteolítica das caspases – caspases, calpains e o proteassoma – que ativam quinases; por exemplo, caspase-3 ativa PKCd (Pongracz et al, 1999). Mediadores inflamatórios, como LPS ou GM-CSF, retardam a apoptose de neutrófilos por causar: (i) estabilidade mitocondrial; (ii) redução da atividade de caspase-3 (Watson et al, 1999); (iii) diminuição da expressão do gene Bax, um membro pró-apoptótico da família Bcl-2 (Dibbert et al, 1999). Por outro lado, citocinas anti-inflamatórias,

como IL-10, aceleram a apoptose de neutrófilos ativados por LPS (Cox, 1996). O extravasamento e a apoptose de neutrófilos inflamatórios ocorrem normalmente em camundongos que são deficientes em Fas e Fas-ligante, demonstrando que a apoptose mediada pela interação Fas-FasL não é essencial para regular a meia vida de neutrófilos na resposta inflamatória aguda (Fecho and Cohen, 1998).

Macrófagos podem ativar a apoptose de neutrófilos através do reconhecimento de FasL na superfície dessas células, ou através da liberação extracelular de FasL na forma solúvel (Brown and Savill, 1999). A fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos envolve o complexo avb3 CD36-integrina que interage com um ligante, ainda não identificado, na superfície de neutrófilos apoptóticos (Savill et al, 1992). Macrófagos estimulados com partículas de glucanas digeríveis deixam de reconhecer o sistema avb3, mas passam a reconhecer fosfatidilserina exposta na superfície de células apoptóticas. CD36 parece agir como um cofator, necessário tanto para o sistema avb3 como para o reconhecimento de fosfatidilserina (Fadok et al, 1998a). CD14 participa da fagocitose de linfócitos apoptóticos, mas não de neutrófilos apoptóticos. Finalmente, a fagocitose de neutrófilos apoptóticos inibe ativamente a produção de IL-1 β , CXCL8, IL-10, GM-CSF, TNF- α , leucotrieno C4 e tromboxano B2 por macrófagos humanos (Fadok et al, 1998b). A supressão da produção de mediadores inflamatórios é importante para a etapa de resolução da inflamação aguda

GLICOCORTICÓIDES E INFLAMAÇÃO

Glicocorticóides são comumente utilizados no tratamento de uma ampla gama de doenças inflamatórias agudas, incluindo artrite reumatóide, asma e vasculite. No entanto, os mecanismos pelos quais os glicocorticóides exercem suas ações imunossupressoras e anti-inflamatórias não estão completamente esclarecidos. Há evidências de que agem através de várias vias em múltiplas células-alvo, tecidos e órgãos para iniciar seus efeitos pleiotrópicos.

É importante ressaltar que os glicocorticóides desempenham papéis fisiológicos e farmacológicos através da ativação do eixo adrenal hipotalâmico pituitário (HPA; hypothalamic-pituitary-adrenal) (Munck et al., 1984). Muitas das ações dos glicocorticóides sobre células são mediadas pela interação com receptores específicos de glicocorticóides intracelulares do tipo II. Esses receptores estão distribuídos em diferentes tecidos, mantendo habitualmente uma expressão da ordem de $0.03-3 \times 10^5$ moléculas por célula. O receptor de glicocorticóide do tipo II humano é membro da superfamília de receptor esteróide, com motif *zinc-finger* característico para interação com DNA. Duas variantes alternativas resultam do *splicing* de um único gene (Hollenberg et al., 1985), dando origem à forma α do receptor, constituída de 777 aminoácidos, e à forma β do receptor, uma proteína de 742 aminoácidos. A forma β do receptor é incapaz de se ligar ao corticóide, embora tenha capacidade de se ligar ao DNA. A expressão da forma β do receptor em muitas células e tecidos motiva a especulação de que ele possa funcionar como um inibidor endógeno de ação dos glicocorticóides (Bamberger, et al., 1995). Receptores de glicocorticóides são expressos em monócitos, macrófagos, granulócitos, e todas subpopulações de linfócitos (Schlaghecke et al., 1994).

Os glicocorticóides exercem poderosos efeitos sobre funções dos neutrófilos, particularmente as relacionadas com sensibilização e ativação. Muitos estudos do efeito dos glicocorticóides têm sido realizados *in vitro*, usando altas doses de esteróide sintético, como dexametasona. Efeitos similares aos exercidos *in vitro* pelos glicocorticóides são reproduzidos *in vivo* pelo cortisol liberado. A literatura descreve muitos efeitos dos glicocorticóides sobre neutrófilos, tais como: inibição da interação com outras células (Petroni et al., 1988); diminuição na expressão de moléculas de adesão, principalmente, CD11/CD18 e L-selectina (Burton et al., 1995; Filep et al., 1997; Yossef et al., 1995); inibição da liberação de mediadores, como quimiocinas (Wertheim et al., 1993), citocinas (Mianki et al. 1996; Pang et al. 1997), radicais livres (Direzzo et al. 1994; Tsuji & Shioya, 1994; Fukushima et al. 1990) e enzimas proteolíticas (Direzzo et al. 1994; Llewellyn-Jones et al. 1994). Os glicocorticóides inibem ainda atividades dos neutrófilos, como bactericida (Abe et al. 1996; Roilides et al. 1993), migratória (Llewellyn-Jones et al. 1994; Salak et al. 1993; Hirasawa et al. 1992) e de desgranulação (Joseph et al. 1995; Schleimer et al. 1989).

Há exemplos de proteínas neutrofilicas sendo positivamente reguladas pelos glicocorticóides. A expressão do receptor para interleucina-1 é elevada por ação de esteróides, um efeito contra-balanceado pela diminuição na produção do ligante IL-1. Sugere-se que esta contra-regulação dos níveis de receptor e ligante promova um controle endógeno da resposta imune pelos glicocorticóides (Munck et al., 1992). Várias outras proteínas são também positivamente reguladas pelos glicocorticóides. A expressão da proteína endógena anti-inflamatória anexina-1, também conhecida como lipocortina-1, tem sido descrita como induzida por glicocorticóides em neutrófilos murinos (Perretti & Flower 1996).

MNCF

Cunha & Ferreira (1986), demonstraram que monocamadas de macrófagos peritoneais de ratos, ao serem estimuladas com LPS, liberam no sobrenadante um fator que induz migração seletiva de neutrófilos, *in vitro* e *in vivo*. A peculiaridade dessa atividade - manifestar-se mesmo em animais-teste pré-tratados com glicocorticóide - sugeria que a molécula responsável fosse diferente dos atraentes conhecidos. Os autores denominaram-na MNCF - "macrophage derived chemotactic factor".

Os trabalhos de purificação do MNCF, realizado pelo grupo de pesquisa liderado pela Profa. Dra. Maria Cristina Roque-Barreira, iniciaram-se quando algumas moléculas mediadoras da imunidade natural vinham sendo identificadas como lectinas endógenas, motivando o ensaio de adsorção do sobrenadante de macrófagos em resinas com açúcar acoplado. Constatou-se adsorção seletiva da atividade MNCF em D-galactose imobilizada, sugerindo que a molécula correspondesse a lectina ligante desse açúcar. A cromatografia de afinidade em coluna de açúcar propiciou método de isolamento do MNCF, eluído com solução do açúcar específico. A preparação obtida passou a ser utilizada nos estudos subseqüentes (Dias-Baruffi et al.,1993; Dias-Baruffi et al.,1995a). O CRD da molécula de MNCF é responsável por sua capacidade de recrutar neutrófilos, já que a presença de D-galactose inibe seletivamente a atividade exercida *in vivo* e *in vitro* (Dias-Baruffi, et al., 1993; Dias-Baruffi, et al., 1995b). MNCF induz a movimentação dos neutrófilos por mecanismo haptotático, por ligar-se a laminina da matriz extracelular e a glicanas da superfície de neutrófilos (Dias-Baruffi, et al., 1995b; Dias-Baruffi, et al., 1999).

MNCF induz migração de neutrófilos em ratos e camundongos; em ambos a atividade é resistente a glicocorticóides. A migração neutrofilica é inibida por Toxina pertussis,

sugerindo que a sua ligação a glicanas de superfície induza sinalização via receptores acoplados a proteína G.

MNCF tem abrangente atividade como mediador do processo inflamatório, já que, além de atuar diretamente sobre neutrófilos, liga-se a glicanas de moléculas IgE da superfície de mastócitos, promovendo desgranulação celular e ampliando, dessa forma, o recrutamento de neutrófilos para o foco inflamatório (Moreno et al., 2003). Mais ainda, a produção e a secreção de MNCF por macrófagos são seguidas de sua ligação a glicanas da superfície dessas mesmas células (Bernardes 2000, dissertação de mestrado). MNCF é armazenado em macrófagos residentes de ratos e a ativação celular mobiliza-o para a superfície, seguindo-se liberação para o meio externo. Macrófagos estimulados sintetizam MNCF de novo (Moreno, 2002 tese de Doutorado). Recentemente, MNCF foi também detectado por anticorpos IgY, produzidos em nosso laboratório, em mastócitos da linhagem RBL-2H3 (comunicação pessoal).

No que se refere à especificidade fina de reconhecimento de carboidratos, MNCF liga-se não somente a β -galactose ($\text{Gal}\beta 4\text{Glic}$), mas também - e com maior afinidade - a glicanas contendo alfa-galactose terminal ($\text{Gal}\alpha 3\text{Gal}\beta 4\text{GlicNAc}$) (Dissertação de mestrado de Bernardes, E.S., 2000), reproduzindo a especificidade descrita por alguns autores para galectina-3 (Sato & Hughes, 1994).

OBJETIVOS

Nossos objetivos nesse estudo foram:

1. ampliar a caracterização da lectina MNCF quanto aos eventos de ativação celular induzidos em neutrófilos humanos;
2. identificar mecanismos de ação peculiares de MNCF e que justifiquem sua resistência ao efeito anti-inflamatório de glicocorticóides; e,
3. avaliar possíveis vias de sinalização pelas quais MNCF exerça seu papel de indutor de migração neutrofílica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Projeto analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP (no. Processo 9618/2004)

Obtenção da lectina MNCF

MNCF foi produzido em condições assépticas, de acordo com metodologia descrita por Toledo et. al., 2007. Macrófagos da linhagem P388-D1 adaptados ao meio livre de soro, Macrophage-SFM (Gibco BRL, Life Technologies, Inc, Grand Island, USA) foram estimulados na presença de LPS (10 µg/ml; Sigma, St Louis, MO, USA) diluído em meio RPMI (RPMI-1640; Gibco), à 37°C, em ar atmosférico umidecido acrescido de CO₂ 5%, por um período de 40 minutos. Ao final deste período, a solução contendo LPS foi descartada e as células cuidadosamente lavadas por três vezes com RPMI e novamente incubadas por 24 horas em RPMI na ausência de LPS. Em seguida, os sobrenadantes foram reunidos e submetidos à centrifugação (2000 xg, 5 minutos, 4°C) e a posterior concentração em sistema de Amicon (membranas YM-10; Amicon division, WR, Grace e Co., Beverly, MA, USA). Essas preparações foram submetidas à cromatografia de afinidade em coluna de agarose-melibiose (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA). Após a remoção do material não adsorvido, através de lavagem com PBS (pH 7.4), a fração adsorvida foi eluída com D-galactose 0.4M (Sigma), seguindo-se ultradiafiltração em Sistema Amicon. Algumas preparações foram adicionalmente cromatografadas em coluna de Detoxi-Gel™ Endotoxin Removing Gel (Pierce) para eliminação de contaminação por LPS. Foram realizadas a leitura

de absorvância em 280 nm e dosagem protéica pelo método de BCA (Sigma), para estimar a concentração protéica de cada preparação. O controle de qualidade das preparações de MNCF foi realizado através de ensaio de atividade biológica *in vivo* e análise eletroforética em SDS-PAGE (Dias-Baruffi 1995, Toledo et. al. 2007).

PARTE I

Separação de neutrófilos

Para realização de ensaios *in vitro*, neutrófilos humanos do sangue periférico foram isolados utilizando Mono-Poly Resolving Medium (Flow Laboratories, Rockville, MD, USA), conforme instruções do fabricante. Foram coletados 20 ml de sangue, de voluntários sadios, em seringa heparinizada (20 UL/ml; Lique mine, Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A., Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Amostras de 5 ml foram cuidadosamente colocadas sobre 4 ml de meio de separação. As amostras foram centrifugadas a 400 x g, durante 50 minutos, à 25° C. O plasma e o anel de mononucleares foram desprezados e o anel de neutrófilos foi lavado com 50 ml de RPMI a 500 xg por 10 minutos, por duas vezes. O sedimento de células foi ressuspendido em 1 ml de meio RPMI. Contagem global de células foi realizada em câmara de Neubauer (Neubauer Improved Bright-Line, Loptik Labor, Germany), partindo da suspensão diluída 20 vezes em solução de Turk (20ml ácido acético glacial, 0.5g azul de metileno e água para 1L). A preparação de neutrófilos foi analisada quanto à viabilidade, através do método de exclusão por azul de Tripán, e pureza por análise de tamanho e granulosidade através de citometria de fluxo em FacSort (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA), cujos foram tratados pelos programas Cell Quest e WinMDI (Newton et al, 1998).

Biotinilação da lectina MNCF

Amostras de 1 mg de MNCF foram submetidas à marcação com sulfo- NHS- LC- biotina (sulfosuccinimidil-6-(biotinamida) hexanoato) (Pierce). Para tanto, a cada amostra, diluída em 500 µl de bicarbonato de sódio 50 mM (pH 8.5) e adicionou-se um volume de 37 µl de biotina 1 mg/ml, diluída em água oxigenada. Após 2 horas de incubação em gelo, as amostras foram diafiltradas contra PBS, utilizando-se sistema Centricom (Amicon® Division) e estocada à -20°C.

Interação de MNCF-biotinilado e neutrófilos pré-tratados ou não com dexametasona

Citometria de fluxo

Neutrófilos humanos (10^6) foram pré-tratados ou não por 60 min à 37°C com dexametasona (25µM ou 10 µg/ml) (Merck, Darmstadt, Germany). Após lavagens por centrifugação (500 xg, 10 min, 4°C) os neutrófilos foram fixados com paraformaldeído 4% por 20 min, à temperatura ambiente. As células foram novamente lavadas e tratadas por 5 minutos com solução de glicina 0.1M, para então serem incubadas com MNCF biotinilado (10 µg/amostra), por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após duas lavagens com PBS, as células foram incubadas com estreptoavidina conjugada a fluoresceína (1:1000) (Sigma), por 30 minutos à temperatura ambiente. Após duas lavagens com PBS o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensão para 300 µl de PBS para análise por citometria de fluxo em FACsort.

Microscopia de Fluorescência

Neutrófilos humanos (10^5) aderidos a lamínulas tratadas com solução 2% de Biobond (EM Sciences, Fort Washington, PA) foram processados como descrito no item anterior. Após incubação com estreptoavidina-FITC, as células passaram por 10 lavagens, de 5 min cada, com PBS e, por último lavagem rápida em água ultrapura (Barnsted Thermol, Dubuque, OWA, USA). As lamínulas foram montadas em Fluormount G (EM Sciences). O material foi analisado em microscópio de fluorescência Eclipse 800 (Nikon Eclipse 800, Nikon USA, Melville, NY). As imagens foram adquiridas com o auxílio da câmara digital Nikon DXM 1200 (Nikon).

Migração de neutrófilos *in vitro*

Utilizou-se sistema Transwell (Corning Costar Corporation, Cambridge, MA) de 24 poços com membrana de polycarbonato com poros de 5 μm . A cada um dos poços adicionaram-se as amostras ensaiadas contidas em 600 μl de meio de cultura RPMI. As amostras foram: MNCF (10 $\mu\text{g/ml}$), fMLP (10^{-7}M ; Sigma) e CXCL8 (50 ng/ml ; R&D Systems, Minneapolis, MN). Poços contendo apenas meio correspondiam ao controle negativo. Suspensões de neutrófilos humanos (10^6) pré-tratados com dexametasona (25 μM) por 60 minutos, ou apenas RPMI, foram adicionados às peças de inserção do sistema. Após 1 hora de incubação à 37°C, as células emigrantes foram coletadas e centrifugadas por 10 minutos a 500 $\times g$. O número de neutrófilos contidos em cada poço foi estimado pela quantificação de mieloperoxidase.

Atividade mieloperoxidase (MPO)

Triton X-100 1% (Sigma) e tetrametilbenzidina (TMB) (Pierce) foram adicionados às amostras contendo neutrófilos emigrantes. Reação colorimétrica foi paralisada pela adição de ácido sulfúrico 2N após 10 minutos e a leitura colorimétrica realizada a 450 nm em leitor de microplacas (Power Wavex – BIO-TEK INSTRUMENTS, INC). O número de neutrófilos contido nas amostras foi inferido utilizando-se a regressão linear de curva padrão gerada pela leitura de absorbância proporcionada por número conhecido de neutrófilos ($0.05-1.0 \times 10^5$ neutrófilos/ml)

Expressão de CD62L

Neutrófilos humanos (10^6) tratados ou não com dexametasona ($25\mu\text{M}$), foram incubados com PMA (10 ng/ml; Sigma), CXCL8 (25 ng/ml) ou MNCF (10 $\mu\text{g/ml}$), diluídos em RPMI, por períodos de 5-120 minutos, à 37°C . As células foram lavadas, por centrifugação, com RPMI e ressuspensas em 200 μl desse meio para reação com anticorpo monoclonal murino anti-CD62L humano conjugado a FITC (Caltag Laboratories South San Francisco, CA). Como controle de isotipo foi utilizada IgG1 murina de especificidade irrelevante. Decorridos 30 minutos de incubação, à 4°C , com os anticorpos (10 $\mu\text{g/ml}$) as células foram lavadas e ressuspensas em paraformaldeído 2% para análise por FACSort.

Avaliação dos filamentos de F-actina

Citometria de fluxo

Neutrófilos humanos (10^6) pré-tratados ou não com dexametasona ($25\mu\text{M}$), foram incubados por diferentes períodos de tempo (1-60 min), com fMLP (10^{-7}M), CXCL8 (50ng/ml) ou MNCF (10 $\mu\text{g/ml}$) à 37°C . As células foram então fixadas com paraformaldeído 4% por 20 min à temperatura ambiente. Após lavagem por centrifugação (10 min, 500 $\times g$, 4°C) as células foram permeabilizadas com Triton X-100, 0.3% (v/v), por 10 min e novamente lavadas por centrifugação. Tratamento com glicina 0.1M foi realizado por 5 min à temperatura ambiente. Após nova centrifugação para lavagem das células, estas foram incubadas por 45 min à temperatura ambiente com Faloidina-Alexa 488 (1:500) (Molecular Probes, Eugene, OR). Ao término do período de incubação, as células foram lavadas por centrifugação e analisadas por citometria de fluxo.

Microscopia de fluorescência

Neutrófilos humanos (10^5) aderidos por 20 min, à 37°C , a lamínulas tratadas com Biobond 2, foram processados como descrito em item anterior. Os filamentos de F-actina foram revelados pela incubação das células com Faloidina-Alexa 488 (1:300) (Molecular Probes) por 45 min. Seguiram-se 10 lavagens com PBS por 5 min cada e uma última lavagem, rápida, com água ultrapura. As lâminas foram montadas em Fluoromount G (EM Sciences) e analisadas em microscópio de fluorescência Eclipse E800 (Nikon). As imagens foram adquiridas com o auxílio da câmara digital Nikon DXM 1200 (Nikon).

Western blot para NF- κ Bp50

A subunidade p50 do complexo NF κ B foi detectado por Western blot, usando-se anticorpo específico. Neutrófilos humanos (10^6) pré-tratados, ou não, com dexametasona ($25\mu\text{M}$; 60min) e estimulados com CXCL8 (50ng/ml) ou MNCF ($10\mu\text{g/ml}$), por 2 horas à 37°C . A partir do sedimento de células estimuladas foram obtidos extratos protéicos da membrana, do citoplasma e do núcleo preparados por fracionamento subcelular por Triton X-114 (JW Goding - 1996 - Academic Press). Os extratos foram diluídos em tampão de amostra redutor (10 mM Tris/HCl (pH 6.8)/1% (w/v) SDS/25% (v/v) glycerol/0.1 mM 2-mercaptoethanol/0.03% (w/v) Bromophenol Blue), fervidos e submetidos à SDS-PAGE em gel contendo 10% de acrilamida. Após separação eletroforética, o material foi eletrotransferido para membrana de nitrocelulose (Millipore, Bedford, MA, U.S.A.). A membrana foi incubada com solução PBS-BSA1%-Tween20 0,05% (tampão de bloqueio), por 60 minutos, à temperatura ambiente e incubada com anticorpo primário de cabra anti-NF- κ Bp50 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), diluído em tampão de bloqueio (1/200), por 16 horas, à 4°C . Seguiram-se lavagens das membranas e nova incubação com anticorpo secundário de macaco anti-IgG de cabra conjugado à peroxidase (Santa Cruz Biotechnology), diluído em tampão de bloqueio (1/200), por 60 min à temperatura ambiente. Finalmente, a reação foi revelada usando-se solução de DAB (3,3'-diaminobenzidine liquid substrate system tetrahydrochloride; Sigma).

Real-Time PCR para citocinas e quimiocinas

Neutrófilos humanos (10^6 células), pré-tratados ou não com dexametasona ($25\mu\text{M}$; 1h, 37°C) foram estimulados por 6 horas à 37°C com MNCF ($10\ \mu\text{g}/\text{ml}$), CXCL8 ($50\ \text{ng}/\text{ml}$) ou fMLP (10^{-7}M) na presença de soro fetal bovino (5%), em ar atmosférico umidecido e 5% de CO_2 . Ao final da incubação, as células foram coletadas e lavadas por centrifugação ($500\ \text{xg}$, 10min, 4°C) em PBS. O sedimento foi ressuspense em $500\ \mu\text{l}$ de Trizol (Invitrogen life Technologies) para extração de ácidos nucléicos.

Extração de ácidos nucléicos

A extração de RNA total dos neutrófilos foi feita em Trizol, segundo recomendações do fabricante. Brevemente, as amostras foram mantidas por 5 min em $500\ \mu\text{l}$ de Trizol, adicionando-se em seguida $100\ \mu\text{L}$ de clorofórmio (Merk, Darmstadt, Germany). Após incubação de 3 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a $12.000\ \text{xg}$ por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e o RNA nele contido foi precipitado com $250\ \mu\text{L}$ de álcool isopropílico (Sigma). Decorridos 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, as amostras foram novamente centrifugadas. O sedimento foi lavado com $500\ \mu\text{l}$ de etanol 75% e centrifugado a $7.500\ \text{xg}$ por 5 minutos. Após descarte do sobrenadante o sedimento, contendo o RNA foi ressuspense em água livre de DNase e RNase (Gibco).

Transcrição reversa

O RNA total foi convertido em cDNA por transcrição reversa, sendo cada reação preparada em um volume final de 20 μL . Inicialmente, 1 μg de RNA e 20 pmol de Oligo dT (Invitrogen life Technologies, Carlsbad, CA, USA), foram incubados à 70°C por 5 minutos e, em seguida, mantidos em gelo por mais 5 minutos. Adicionou-se às amostras uma mistura contendo 0.5 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP (100mM dNTP Set, PCR Grade, Invitrogen), 20 unidades de inibidor de RNase (RNaseOut Ribonuclease Inhibitor, Invitrogen life Technologies), 1 μL de transcriptase reversa (ImProm-II Reverse Transcriptase, Promega Corporation, Madison, WI, USA), 3 mM de MgCl_2 e 4 μL de tampão da reação. A mistura foi incubada por 5 minutos à 25°C, seguida de 60 minutos à 42°C e 15 minutos à 70°C. As amostras foram então tratadas com 10 μg de RNase (Gibco), por 30 minutos à 37°C e submetidas à reação de PCR em Tempo Real.

PCR em Tempo Real

As reações de PCR em Tempo Real foram preparadas em volume final de 25 μL , contendo 2 μL de cDNA, 5 pmol de cada *primer* e 12,5 μL de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), contendo 3 mM de MgCl_2 , 200 μM de dATP, dCTP e dGTP, 400 μM de dUTP, 1,25 unidades de AmpliTaq GoldR DNA polimerase e 0,5 unidades de AmpEraseR uracil-N-glicosilase (UNG). Foi utilizado o Sistema de PCR em tempo real da Applied Biosystems 7300 para detectar e quantificar a amplificação do DNA na presença de SYBR Green. Os parâmetros de ciclagem termal foram feitos de acordo com as instruções do fabricante. A mistura foi incubada a 50°C por 2 minutos, seguida de 10 minutos a 95°C,

para ativar a enzima AmpliTaq Gold. Seguiram-se 40 ciclos de incubação a 95°C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto. Todas as quantificações foram normalizadas em relação a um controle endógeno (β -actina).

Primers utilizados na reação de PCR em Tempo Real

As seqüências de RNA mensageiro para as citocinas e quimiocinas foram retiradas do banco de dados Website NCBI. Todos os primers foram desenhados com o programa Primer Express (v 2.0, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os 6 pares de primers (Erviergas, São Paulo, SP, Brasil) eram constituídos de 20 pares de bases, possuíam temperatura de *melting* de 58°C e amplificavam fragmentos de cerca de 100 pares de bases. A Tabela 2 resume as seqüências dos primers específicos.

Quantificação de CXCL8

Neutrófilos humanos (5×10^5) foram incubados ou não com dexametasona (25 μ M), diluída em RPMI, por 60 minutos, à temperatura ambiente. Após incubação, as células foram lavadas com RPMI por centrifugação (500 *xg*, 4°C) por 10 minutos e adicionadas a poços individuais de uma placa de cultura com 24 poços. Os estímulos, LPS (5 μ g/ml), fMLP (10^{-7} M) ou MNCF (10 μ g/ml), foram diluídos em RPMI acrescido de 5% de soro fetal bovino e adicionados aos neutrófilos. As células foram incubadas em estufa umidecida e 5% de CO₂, por 12 horas. No final do período de incubação, o sobrenadante da cultura foi removido e centrifugado por 10 min, 500x *g* a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e estocados à – 20°C até o momento de uso. A detecção de CXCL8 nos sobrenadantes coletados foi feita

por método de ELISA, utilizando-se OPTEIA™ Human CXCL8 ELISA Kit II (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante.

Tabela 2 – Seqüência dos primers específicos

Primer	Sequence (5'→3')
TNF- α	Forward: GCAGAGGACCAGCTAAGAGGG Reverse: GGAAGAGAACCTGCCTGGC
IL1- β	Forward: CAAGGCACAACAGGCTGCT Reverse: CATTTCACTGGCGAGCTCAG
CXCL8	Forward: AAACCACCGGAAGGAACCA Reverse: GCACCTTCACACAGAGCTC
CXCL10	Forward: AACCGTACGCTGTACCTGCAT Reverse: CACGTGGACAAAATTGGCTTG
CCL4	Forward: GCGTGACTGTCCTGTCTCTCC Reverse: AAGAAAAGCAGCAGGCGGT
β -actin	Forward: AAGGATTCCTATGTGGGCGA Reverse: TCCATGTCGTCCCAGTTGGT

PARTE II

Purificação de neutrófilos humanos do sangue periférico

Neutrófilos humanos do sangue periférico foram isolados à temperatura ambiente, utilizando Polymorphprep (AXIS-SHIELD PoC AS, Oslo, Norway) conforme instruções do fabricante. Para tanto, amostras de 21 ml de sangue, obtidas de voluntários sadios do "Etablissement Français du Sang", em tubos BD Vacutainer, adicionados com EDTA, foram centrifugadas por 20 minutos a 900 rpm. O sobrenadante, contendo plasma e plaquetas, foi novamente centrifugado por 10 minutos, a 2400 rpm. O plasma, depletado de plaquetas, foi recolocado sobre as hemáceas e, após homogeneização, as amostras foram cuidadosamente colocadas sobre 3.5 ml de Polymorphprep (Axis-Shield Poc. AS, Norton MA, USA), e centrifugadas a 2000rpm, durante 45 minutos. O plasma e o anel de mononucleares foram descartados e o anel de neutrófilos coletado. Após lavagem com 50 ml de PBS (Gibco) a 1500 rpm por 10 minutos, as hemáceas que contaminavam a preparação foram lisadas com solução NaCl 0.2%, por 1 minuto, e igual volume de NaCl 1.6%. Após nova lavagem, o sedimento de neutrófilos foi ressuspensão em 3 ml de PBS. Contagem global de células foi realizada em câmara de Neubauer, partindo da suspensão diluída 20 vezes em solução de Turk. A viabilidade dos neutrófilos foi verificada através do método de exclusão por azul de Tripán.

Apoptose em neutrófilos incubados com MNCF

Neutrófilos (10^6), diluídos em RPMI, acrescido de soro fetal bovino 10%, foram incubados com MNCF (0,0005-50 $\mu\text{g/ml}$) ou somente com meio, por 16 horas, à 37°C ou à 4°C. Para

detecção de neutrófilos em processo apoptose ou de necrose utilizaram-se as marcações com 7AAD conjugado a PE e Annexin-V conjugada a FITC, por 15 minutos, à temperatura ambiente, de acordo com recomendações do fabricante (Euromedex, Souffel Weyersheim, France). As células foram, imediatamente, submetidas à leitura por citometria de fluxo e posterior análise usando o programa Cell Quest. Em alguns ensaios, neutrófilos foram pré-tratados com etanercept 1µg/ml (um receptor solúvel de TNF- α).

Avaliação da desgranulação neutrofílica através da expressão de CD11b, CD35, CD63 e CD66

Um total de 10^6 neutrófilos, diluídos em 500 µl de HBSS⁺⁺, foram pré-incubados ou não com diferentes inibidores de tirosino-quinases e, posteriormente, estimulados por rhTNF- α (20ng/ml), rhCXCL8 (50ng/ml) ou MNCF 10µg/ml por diferentes intervalos de tempo, à 37°C, em tubos ependorfs revestidos com BSA 1%. A reação foi paralisada com 1 ml de HBSS⁺⁺ gelado e as células foram centrifugadas por 10 minutos a 1400 rpm, à 4°C. O sedimento de células foi ressuspensão e incubados por 45 min, à 4°C, com anticorpos específicos ou isotipo controle, conjugados a FITC ou PE (BD Biosciences), diluídos em PBS-BSA1%, azida sódica 0.1%. As células foram lavadas com PBS-Azida 0.1% e fixadas em solução Fix-FACs (PBS-Azida 0.1%-formaldeído 1%), até o momento de leitura por citometria de fluxo.

Análise de fosforilação de proteínas tirosino-quinase e p38 MAP quinase

Neutrófilos (2×10^6), diluídos em 500 μ l de HBSS⁺⁺ foram estimulados em tubos ependorfs revestidos com BSA 1% por 20 minutos a 37°C, com MNCF 10 μ g/ml, rhCXCL8 50ng/ml ou rhTNF- α 20ng/ml. A reação foi paralisada com 1 ml de HBSS⁺⁺ gelado e as células foram centrifugadas rapidamente (10-20 segundos) em alta rotação (5000 rpm). As amostras foram ressuspendidas em 30 μ l de tampão de amostra aquecido contendo SDS (0.1 M Tris, pH 6,8, 4% SDS, 1.8 mM glicerol, 1.5 mM 2-ME, 4 mM ortovanadato, 40 kallikrein inhibitory units (KIU)/ml aprotinina, 8 mM leupeptina, 80 μ g/ml quimostatina, 4 mM phenylmethanesulfonyl fluoride) e imediatamente fervidas por 10 minutos. Para análise de fosforilação de proteínas tirosino-quinases totais, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida gradiente 7-15% e submetidas à migração eletroforética durante uma noite, à 4°C. Para análise de p38 MAPK fosforilada, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10% e submetidas à migração eletroforética por 2 horas à temperatura ambiente. Ao final da eletroforese, procedeu-se a eletro transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose (Hybond-ECL), feita em tampão de Western Blot contendo 24mM Tris, 190 mM Glicina e 20% etanol, durante 3 horas, à 4°C. A membrana foi saturada com tampão TBS (25mM Tris, 120mM NaCl, 500mM KCl) acrescido de-Tween 0.1%-BSA 5% (tirosino-quinase) ou TBS acrescido de Tween 0.1%-leite desnatado 5% (p38MAPK), denominados tampão de saturação, durante 1 hora a temperatura ambiente para posterior incubação com anticorpo monoclonal de camundongo anti-phosphotyrosine-PY20-HRP(1/1000) ou policlonal de coelho anti-phosphop38MAPK (1/1000), diluídos em tampão de saturação, durante 16 horas, à 4°C. As membranas foram lavadas em TBS-Tween 0.1% e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase para análise de p38MAPK durante 1 hora a

temperatura ambiente. A reação de ambas quinases foi revelada por Western Blot Luminol Reagent em filme Kodak. A revelação de p38MAPK total foi feita pela reação com anticorpo policlonal de coelho anti-p38MAPK após remoção dos anticorpos primário e secundário utilizados para detecção de phosphop38MAPK. A incubação durou 3 horas, à 55°C, e foi feita na presença de tampão de *stripping* contendo 62.5M Tris 0.5M pH 6.8, 2% SDS, 100mM beta-mercaptoetanol. Para a análise quantitativa foi utilizado o software NIH Image 1.63.

Análise estatística

A análise estatística foi feita pelo teste de Student-Newman-Keuls, através da utilização do programa INSTAT (INSTAT software, GrafhPad, San Diego, CA).

RESULTADOS

PARTE I

MNCF interage na superfície de neutrófilos pré-tratados ou não com dexametasona

O reconhecimento por MNCF de ligantes na superfície de neutrófilos humanos, foi avaliado por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência utilizando-se MNCF biotinilado, cuja ligação foi revelada pelo conjugado estreptoavidina-FITC. Como controles negativos foram utilizados neutrófilos pré-tratados, ou não, com dexametasona incubados apenas com estreptavidina-FITC. A exposição de neutrófilos à lectina MNCF biotinilada aumentou a intensidade média de fluorescência (MIF), indicando ligação da lectina à superfície celular (**figura 4A**). Análise por microscopia de fluorescência confirma a ocorrência dessa interação e mostra a distribuição homogênea do MNCF ligado à superfície dos neutrófilos (**figura 4B**).

Análises similares foram realizadas utilizando neutrófilos pré-tratados com dexametasona. Os ensaios demonstram que o pré-tratamento das células não interferiu na ligação de MNCF (**figura 4A**). Por citometria de fluxo, a intensidade média de fluorescência teve seu valor aumentado, indicando a ligação de MNCF à superfície celular. Da mesma maneira, a distribuição de MNCF ligado à superfície celular continuou homogênea em neutrófilos pré-tratados com dexametasona (**figura 4B**).

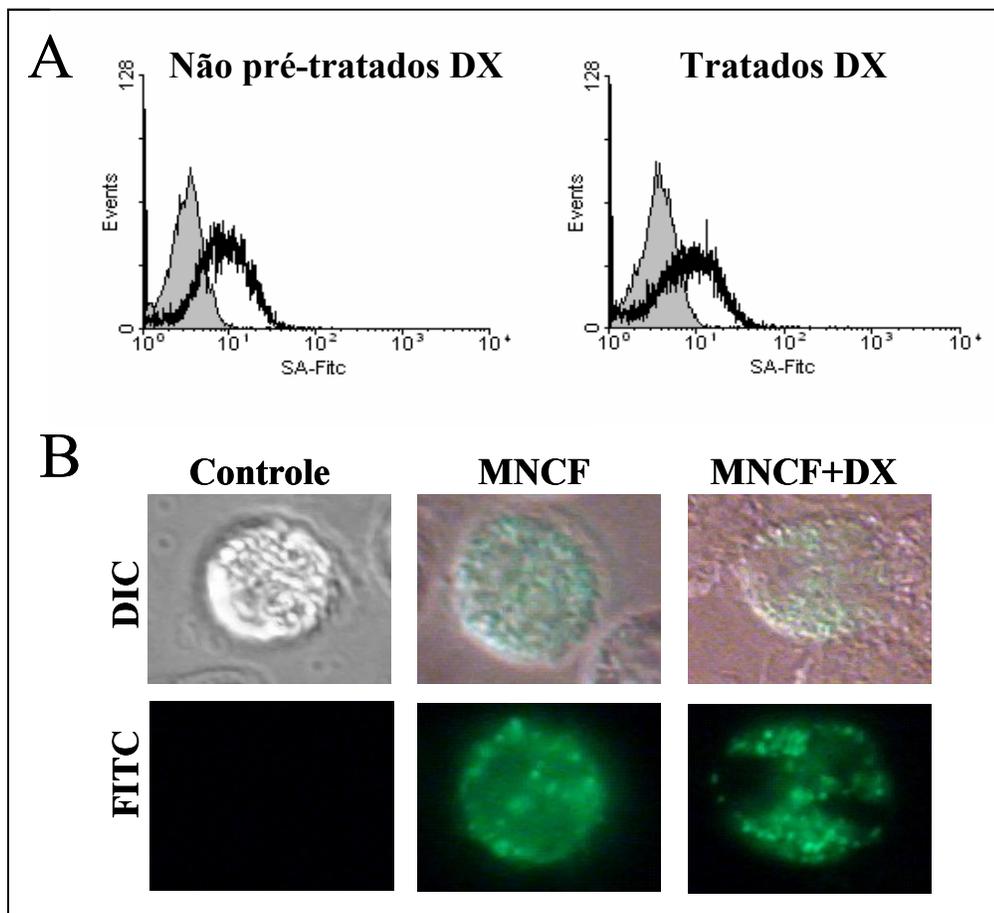


Figura 4. Dexametasona não interfere na ligação de MNCF à superfície de neutrófilos humanos. Neutrófilos pré-tratados ou não com dexametasona (25 μ M DX) foram incubados com MNCF-biotina (10 μ g; histograma vazio) ou somente meio (controle; histograma cheio). A ligação revelada com estreptoavidina conjugada à FITC foi analisada por citometria de fluxo (A) e microscopia de fluorescência (B).

Migração neutrofílica *in vitro*, induzida por MNCF, não inibida por dexametasona

Neutrófilos humanos, pré-tratados ou não com dexametasona, foram submetidos a estímulo com diferentes atraentes: FMLP (10⁻⁷ M), CXCL8 (50 ng/ml) e MNCF (10 μ g/ml), em sistema Transwell. A quantidade de neutrófilos que migraram foi estimada determinando-se a concentração de mieloperoxidase no poço inferior, após a lise das células nele contidas.

Todos os estímulos utilizados induziram migração dos neutrófilos que não haviam sido pré-tratados com dexametasona (**figura 5**). MNCF e CXCL8 tiveram atividades quimiotáticas similares proporcionando a migração de 38 e 55 x 10⁴ neutrófilos, respectivamente, enquanto fMLP determinou a migração de 80 x 10⁴ neutrófilos.

O pré-tratamento com dexametasona, por si só, não afetou o comportamento de neutrófilos não estimulados (meio). Entretanto, ele inibiu drasticamente a migração induzida por fMLP (**figura 5**). Migrações determinadas por MNCF e por CXCL8 não foram alteradas pelo pré-tratamento com dexametasona (**figura 5**).

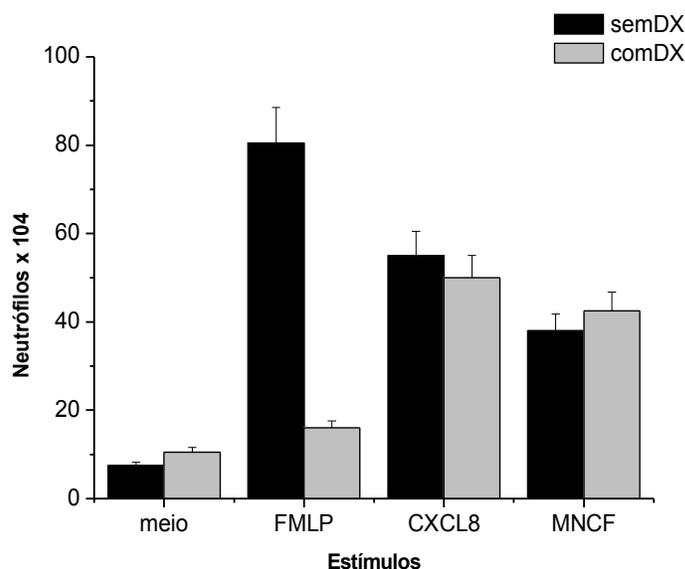


Figura 5. Migração *in vitro* de neutrófilos, induzida por MNCF, é resistente ao pré-tratamento com dexametasona. O ensaio foi realizado em sistema Transwell. Os poços continham os estímulos ensaiados e nos insertos foram aplicados 10⁶ neutrófilos pré-tratados com dexametasona (25 µM). Os estímulos utilizados foram MNCF (10 µg/ml), CXCL8 (50 ng/ml) ou fMLP (10⁻⁷M), tendo apenas meio como controle negativo. O número de neutrófilos que migraram para os poços foi estimado pela determinação da concentração de mieloperoxidase após 1h de estímulo. O resultado é expresso como número de neutrófilos emigrantes.

MNCF regula a expressão de CD62L em neutrófilos humanos

A expressão de L-selectina (CD62L) foi monitorada na superfície de neutrófilos submetidos a estímulo com PMA (10 ng/ml), MNCF (10 µg/ml) ou CXCL8 (25 ng/ml). Como demonstra a **figura 6A**, todos os estímulos analisados provocaram decréscimo na intensidade de fluorescência referente à molécula CD62L, indicando a ocorrência de *shedding* de L-selectina. Frente ao estímulo com MNCF ou PMA, o *shedding* foi mais eficiente; ocorreu a partir de 5 minutos de estímulo. Já CXCL8 só determinou *shedding* de CD62L, a partir de 15 minutos de estímulo (**figura 6A**). Aos 60 minutos, os decréscimos de expressão de CD62L eram similares entre neutrófilos submetidos aos diferentes estímulos.

Neutrófilos pré-tratados com dexametasona (25µM) também foram monitorados quanto à expressão de CD62L. Foi constatado, inicialmente, que o pré-tratamento das células com dexametasona, isoladamente, não altera a expressão de CD62L (dados não mostrados). O estímulo dos neutrófilos pré-tratados com dexametasona com PMA ou CXCL8 provocou queda da expressão de superfície de CD62L, refletindo a ocorrência de *shedding* eficiente desta molécula. (**figura 6B**). No entanto, o estímulo com MNCF não provocou queda da expressão de CD62L, no decorrer de 60 minutos de monitoramento, fato indicativo de não ter ocorrido *shedding* (**figura 6B**). A extensão do período de observação para 120 minutos mostrou diminuição da intensidade de fluorescência para CD62L, sugerindo que apenas tardiamente MNCF induziria *shedding* de L-selectina de neutrófilos pré-tratados com dexametasona.

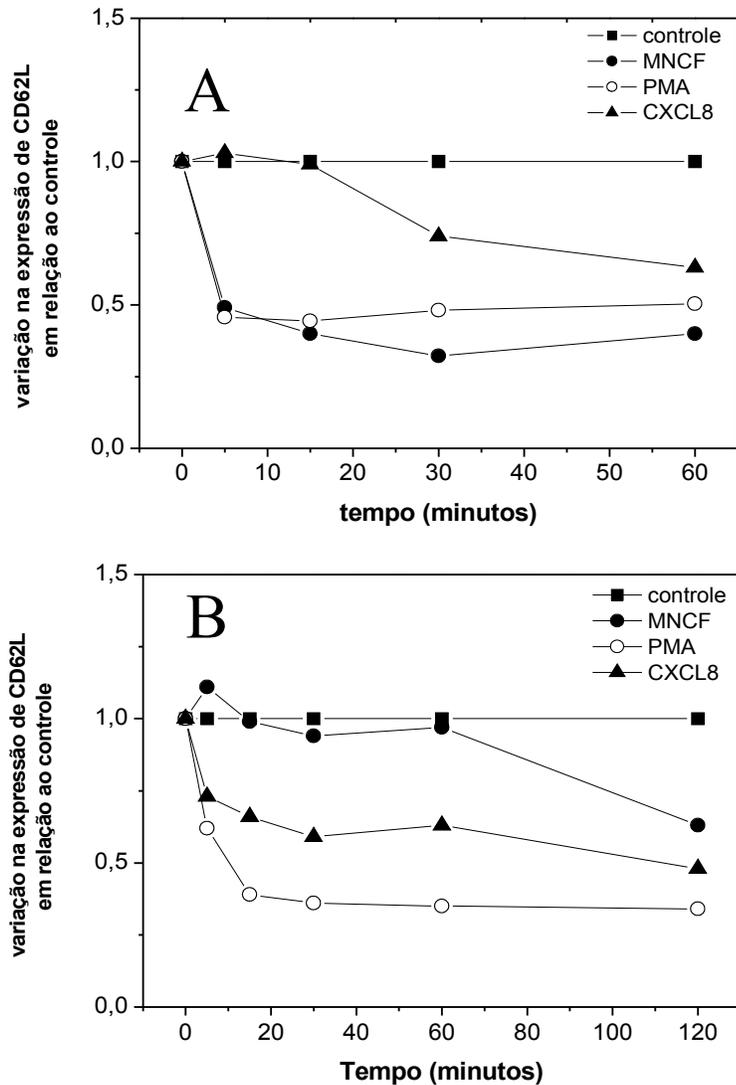


Figura 6. O pré-tratamento de neutrófilos com dexametasona inibe o *shedding* de CD62L induzido por MNCF. Neutrófilos humanos, pré-tratados (B) ou não (A) com dexametasona (25 μ M) e estimulados por diferentes períodos de tempo (0-120 min) com MNCF (10 μ g/ml), CXCL8 (50 ng/ml) e PMA (10 ng/ml) tiveram a expressão de CD62L na superfície celular analisada por citometria de fluxo. O resultado é representativo de três ensaios independentes.

Efeito de MNCF sobre o aumento de expressão de F-actina e a polarização de neutrófilos pré-tratados, ou não, com dexametasona

Efeito de MNCF sobre neutrófilos não pré-tratados com dexametasona: indução de polarização celular, não associada ao aumento de expressão de F-actina

Neutrófilos estimulados por CXCL8, fMLP ou MNCF foram analisados por citometria de fluxo, quanto ao grau de expressão de F-actina.

Reproduzindo dados da literatura, os estímulos controles de CXCL8 e fMLP induziram rápido (1 min) aumento da expressão de F-actina, evidenciada pela marcação com faloidina. Esse rápido aumento do conteúdo de F-actina foi seguido de queda gradual, completada em 10-20 min. (**figura 7A**). Os dados gerados por microscopia de fluorescência demonstram que esses mesmos estímulos provocam polarização dos filamentos de F-actina e formação de *ruffles* na superfície dos neutrófilos. (**figura 8**).

O estímulo de neutrófilos com MNCF evidenciou algumas peculiaridades. Intrigantemente, as análises por citometria de fluxo demonstram que MNCF não aumenta a expressão de F-actina, que se mantém em níveis similares ou inferiores aos detectados nas células controles (não estimuladas), durante todo o período de 60 minutos de monitoramento, sugerindo que MNCF não tivesse determinado polimerização de F-actina (**figura 7A**). Apesar desse fato, a microscopia de fluorescência evidenciou que MNCF induziu suaves ondulações na superfície dos neutrófilos (*ruffles*), visíveis após 1 min de estímulo (dados não mostrados). Já a polarização das células e a reorganização dos filamentos de F-actina só aconteceram tardiamente, aos 60 minutos de estímulo, como mostra a **figura 8**.

Nossos dados sugerem que, na ausência de dexametasona, MNCF induza a polarização tardia e dos filamentos de F-actina de neutrófilos sem, contudo, determinar o esperado aumento de expressão de F-actina, como fazem os estímulos controles.

Interferência de dexametasona na expressão de F-actina e polarização de neutrófilos estimulados por quimioatraentes

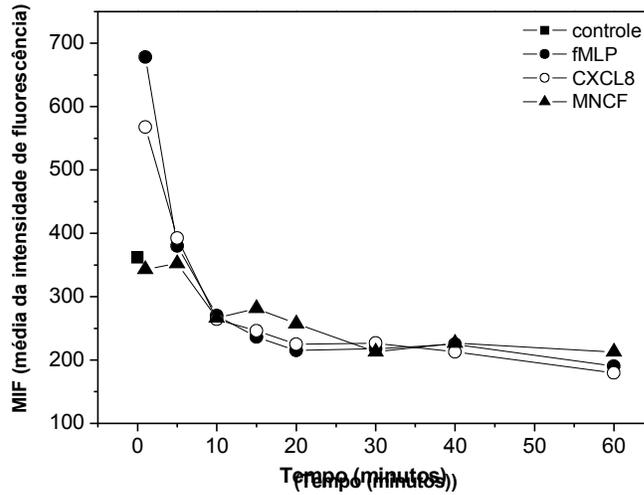
Neutrófilos pré-tratados com dexametasona e estimulados com MNCF (10 µg/ml), CXCL8 (50 ng/ml) e fMLP (10⁻⁷M) foram avaliados quanto ao conteúdo e organização dos filamentos de F-actina. Análise por citometria de fluxo mostrou que o pré-tratamento de neutrófilos humanos com dexametasona proporcionou diminuição nos níveis de expressão de F-actina, conforme evidencia a diferença da intensidade média de fluorescência proporcionada pelas células pré-tratadas (DX) e não pré-tratadas (controle) com dexametasona, na ausência de estímulo (**figura 7B**).

Sob estímulo de CXCL8, MNCF ou fMLP ocorreu rápido (1min) aumento no conteúdo de F-actina (**figura 7B**), quando comparado ao conteúdo de F-actina mensurado em neutrófilos pré-tratados com dexametasona e não estimulados. Entretanto, a expressão de F-actina induzida pelos diferentes estímulos em neutrófilos pré-tratados com dexametasona sempre esteve aquém dos níveis basais verificados em neutrófilos não tratados com dexametasona e não estimulados (controle). No decorrer do tempo, verificou-se, nas células estimuladas, diminuição gradual do conteúdo de F-actina (**figura 7B**). Os estímulos com MNCF, CXCL8 ou fMLP proporcionaram resultados similares entre si, desenhando um perfil de aumento e queda dos níveis de F-actina semelhante aos proporcionados por CXCL8 ou

fMLP em neutrófilos não tratados com dexametasona (**figura 7A**). Diferiram, entretanto, da curva determinada por MNCF nas células não tratadas (**figura 7A**).

A microscopia de fluorescência revelou que neutrófilos pré-tratados com dexametasona e estimulados com CXCL8 ou MNCF não reorganizaram os filamentos de F-actina mesmo no intervalo de 1min (**figura 9**), correspondente ao ponto máximo de expressão de F-actina observado por citometria de fluxo (**figura 7B**). Assim, o aumento relativo do conteúdo de F-actina, proporcionado em condições anti-inflamatórias em resposta aos estímulos com MNCF ou CXCL8 não foi acompanhado da polarização desses filamentos (**figura 9**).

A



B

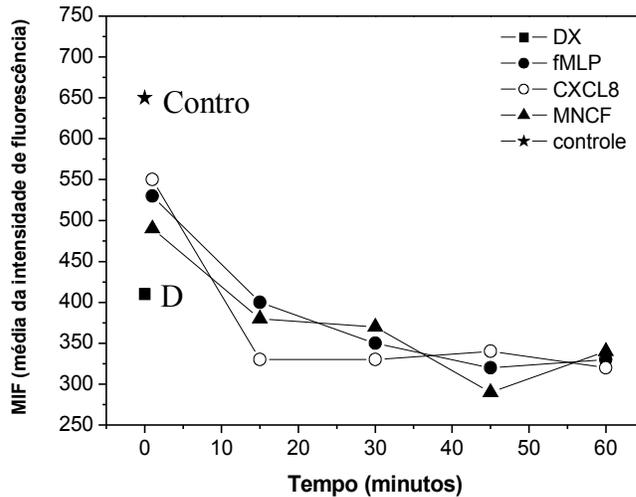


Figura 7. MNCF não induz aumento de expressão de F-actina em neutrófilos. A expressão de F-actina foi monitorada em neutrófilos humanos pré-tratados (B), ou não (A) com dexametasona e estimulados por CXCL8 (50 ng/ml), fMLP (10^{-7} M) ou MNCF (10 μ g/ml) por diferentes períodos de tempo. A expressão de F-actina foi avaliada por citometria de fluxo, através da reação com Faloidina conjugada à Alexa-Fluor 488. Os resultados são expressos como Média da Intensidade de Fluorescência (MIF). O resultado é representativo de três ensaios independentes.

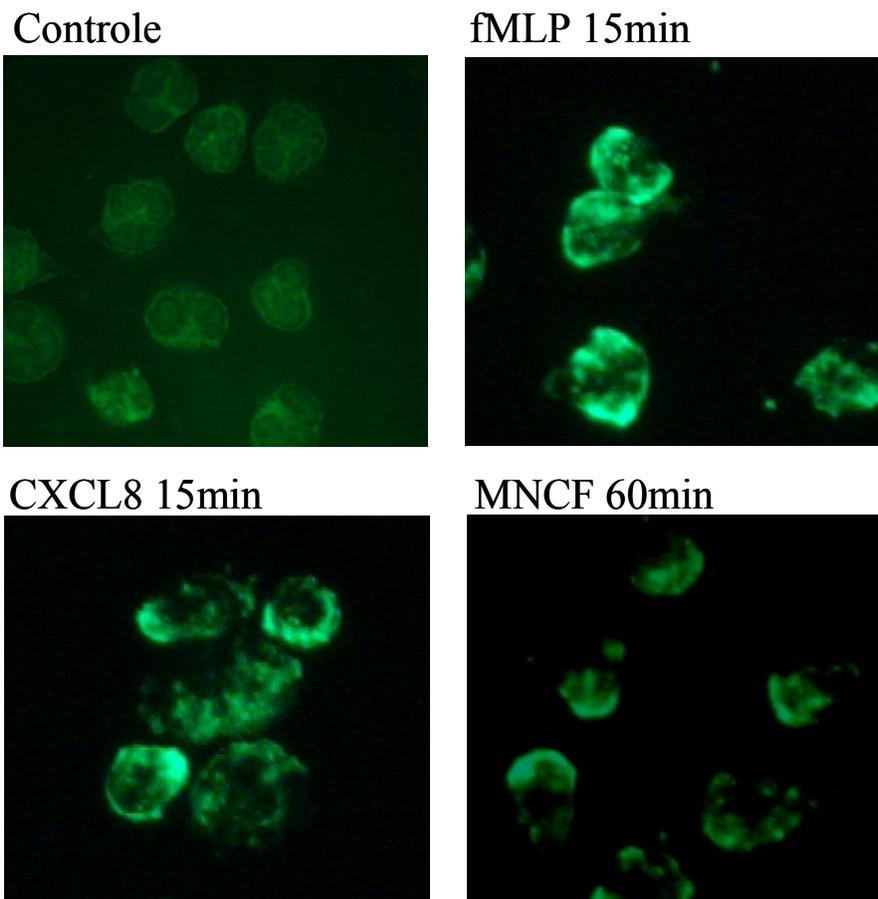
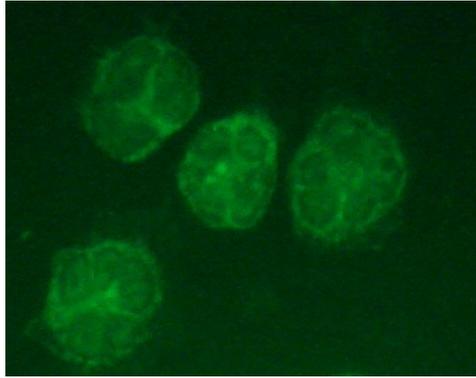
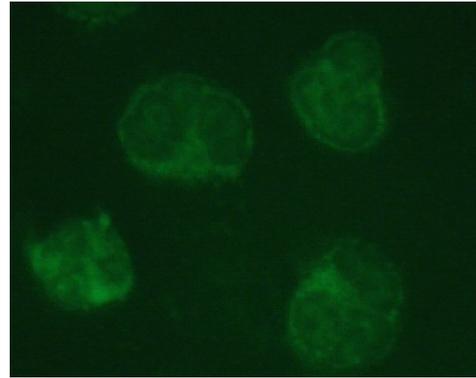


Figura 8. Polarização dos filamentos de F-actina induzida pela lectina MNCF em neutrófilos. Neutrófilos humanos, aderidos a lamínulas tratadas com Biobond 2%, foram estimulados por CXCL8 (50 ng/ml), fMLP (10^{-7} M) ou MNCF (10 μ g/ml) por diferentes períodos à 37°C. Neutrófilos não estimulados foram utilizados como controles. A polarização dos filamentos de F-actina foi observada por microscopia de fluorescência através de reação com Faloidina conjugada à Alexa-Fluor 488. As imagens são representativas de três ensaios independentes.

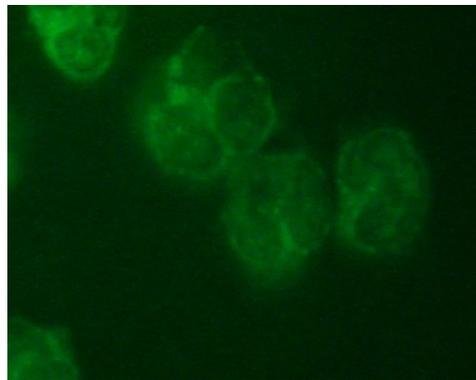
Controle



DX



CXCL8 1min



MNCF 1min

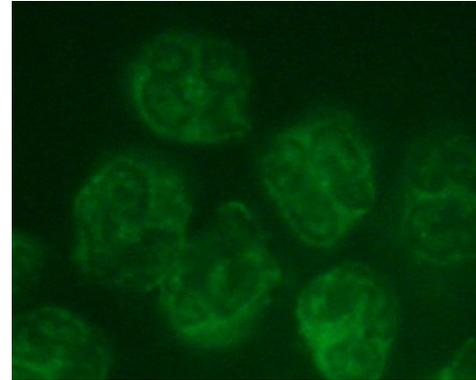


Figura 9. Pré-tratamento com dexametasona inibe a polarização de filamentos de F-actina em neutrófilos. Neutrófilos humanos, pré-tratados com dexametasona (25 μ M), foram aderidos a lamínulas e estimulados com CXCL8 (50 ng/ml) ou MNCF (10 μ g/ml). Preparações de neutrófilos também foram incubadas com dexametasona (DX) ou apenas meio (controle). A polarização dos filamentos de F-actina foi observada por microscopia de fluorescência através de reação com Faloidina conjugada à Alexa-Fluor 488. As imagens são representativas de três ensaios independentes.

Pré-tratamento com dexametasona não inibe a translocação do fator de transcrição NF- κ B induzido por MNCF

Neutrófilos humanos (2×10^6), pré-tratados ou não com dexametasona (60 min; $25 \mu\text{M}$), e estimulados com MNCF ($10 \mu\text{g/ml}$) tiveram a localização nuclear de NF- κ B p50 monitorada (**figura 10**). Nos extratos nucleares obtidos de células não estimuladas (controles), NF- κ B não foi detectado por anticorpos específicos, resultado que permaneceu negativo em extratos que foram obtidos de neutrófilos pré-tratados com dexametasona. Nos extratos nucleares de neutrófilos pré-tratados ou não com dexametasona e estimulados com MNCF, a subunidade p50 de NF- κ B foi imunomarcada (**figura 10**). Esse resultado indica que MNCF induz a translocação de NF- κ B para o núcleo do neutrófilo, independentemente do pré-tratamento da célula com dexametasona.

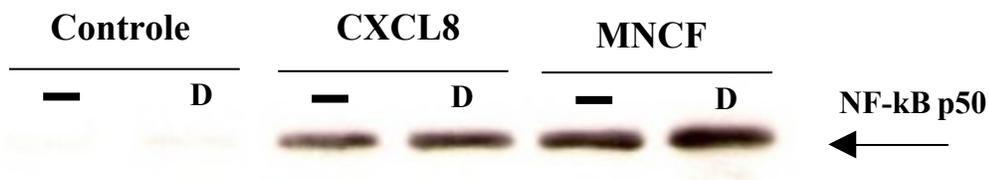


Figura 10. MNCF induz a translocação de NF- κ B para o núcleo de neutrófilos pré-tratados, ou não, com dexametasona. Neutrófilos humanos pré-tratados, ou não, com dexametasona ($25 \mu\text{M}$; 60 minutos), foram estimulados com MNCF ($10 \mu\text{g/ml}$) por 2 horas, à 37°C . A translocação de NF- κ B p50 foi avaliada por Western blot de extrato nuclear, utilizando-se anticorpo policlonal anti-NF κ B p50. A revelação foi feita com anticorpo conjugado à peroxidase. O resultado mostrado é representativo de três ensaios independentes.

MNCF ativa a expressão gênica de TNF α , IL-1 β , CCL4 e CXCL8 por neutrófilos humanos, mesmo quando prétratados com dexametasona.

A transcrição dos genes das citocinas TNF- α e IL-1 β e das quimiocinas CCL4 e CXCL8 foi avaliada por PCR quantitativo em tempo real em neutrófilos humanos pré-tratados, ou não, com dexametasona e posteriormente estimulados com MNCF, CXCL8 ou fMLP (**figura 11**). O estímulo dos atraentes foi eficaz na indução da transcrição gênica de todas as citocinas e quimiocinas testadas. Além disso, o potente efeito estimulatório da lectina MNCF sobre neutrófilos foi, mais uma vez, demonstrado. MNCF, comparado aos controles positivos (CXCL8 e fMLP), foi capaz de induzir transcrição gênica 10 vezes maior para o gene de TNF- α e CXCL8 e 20 vezes maior para os genes de IL-1 β e CCL4 (**figura 11**).

O pré-tratamento com dexametasona, por si só, não ativou a transcrição de nenhum dos genes testados. No entanto a expressão de mRNA foi totalmente inibida em neutrófilos pré-tratados com dexametasona e subsequentemente estimulados com CXCL8 ou fMLP para todos genes testados (**figura 11**). Por outro lado, o estímulo com a lectina MNCF sobrepôs os efeitos inibitórios de dexametasona. A transcrição gênica induzida por MNCF para os genes de TNF- α , IL-1 e CXCL8 foi apenas parcialmente inibida pelo glicocorticóide, mas ainda assim foi 3, 60 e 30 vezes maior, respectivamente, do que a verificada no controle negativo (neutrófilos não estimulados e pré-tratados com dexametasona). A transcrição gênica para CCL4 induzida por MNCF não sofreu nenhuma inibição pelo tratamento com dexametasona (**figura 11**), enquanto a transcrição para TNF- α induzida por MNCF foi a mais afetada pela dexametasona.

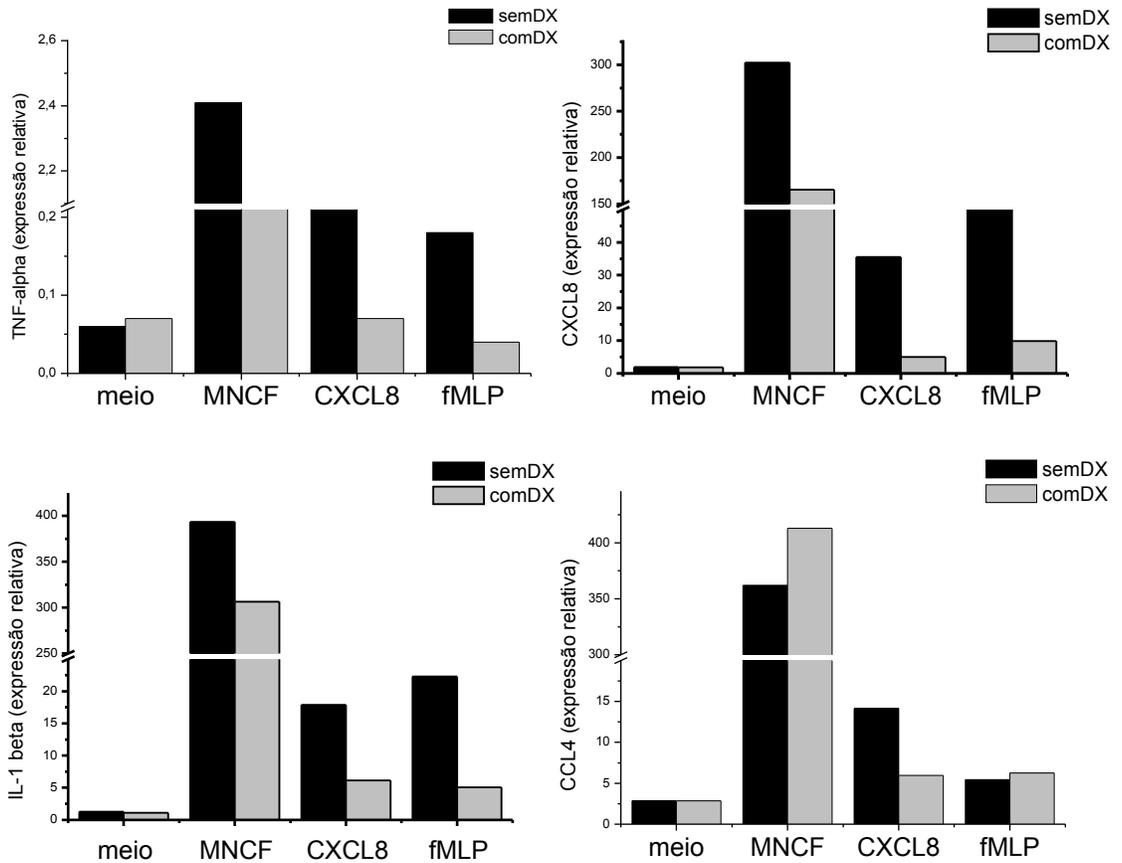


Figura 11. Transcrição gênica de mediadores inflamatórios induzida por MNCF em neutrófilos humanos pré-tratados, ou não, com dexametasona. Neutrófilos humanos pré-tratados, ou não, com dexametasona (25 μ M; 60 minutos), foram estimulados com CXCL8 (50 ng/ml), fMLP (10^{-7} M) ou MNCF (10 μ g/ml). As células foram submetidas à extração de RNA total, que foi convertido em cDNA. Os níveis de expressão foram quantificados por PCR em tempo real. Os painéis mostram a expressão dos mediadores TNF- α , IL1 β , CXCL8 e CCL4.

Neutrófilos pré-tratados com dexametasona sob estímulo de MNCF secretam CXCL8.

O sobrenadante de cultura de neutrófilos estimulados por MNCF durante 12 horas foi avaliado quanto ao conteúdo de CXCL8. O sobrenadante de células que não haviam sido

tratadas com dexametasona continha níveis de CXCL8 equivalentes aos induzidos pelos estímulos controles, LPS e fMLP (**figura 12**).

O pré-tratamento de neutrófilos com dexametasona reduziu a secreção da quimiocina CXCL8 induzida pelos estímulos de LPS e fMLP aos níveis detectados em células não estimuladas (meio). Já o estímulo com MNCF determinou níveis altos de produção de CXCL8, próximos aos proporcionados por neutrófilos não tratados com dexametasona (**figura 12**). Esse resultado sugere que, mesmo em condições anti-inflamatórias, MNCF induza secreção CXCL8, quimiocina sabidamente atraente de neutrófilos. A produção de CXCL8 induzida por MNCF pode constituir-se em alça de amplificação da atividade de recrutamento de neutrófilos para o foco inflamatório.

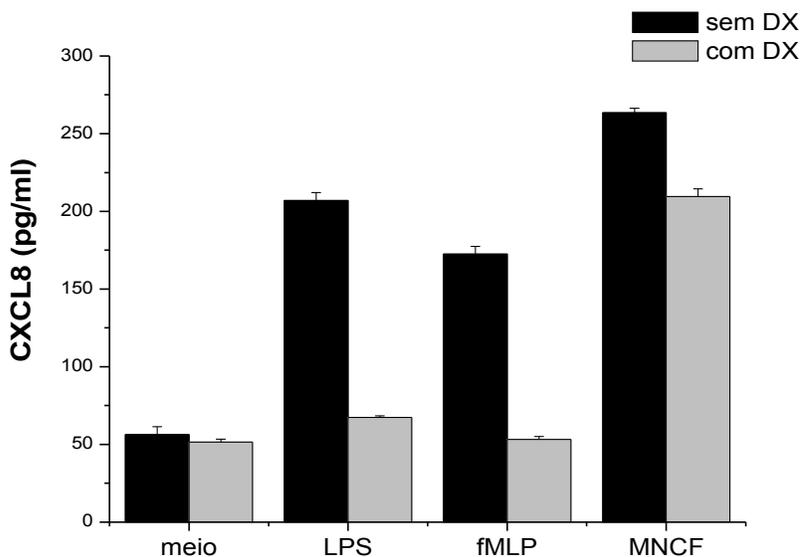


Figura 12. Secreção de CXCL8 por neutrófilos pré-tratados ou não com dexametasona e estimulados por MNCF. Neutrófilos, pré-tratados ou não com dexametasona (60 min; 25 μ M), foram estimulados com MNCF (10 μ g/ml), LPS (5 μ g/ml), fMLP (10^{-7} M). A incubação apenas com meio proporcionou o controle negativo do ensaio. A quantificação de CXCL8 contido no sobrenadante de cultura foi determinada por ELISA. Os resultados estão expressos como pg/ml \pm SD de amostras ensaiadas em triplicata.

PARTE II

Efeito anti-apoptótico de MNCF sobre neutrófilos humanos

Neutrófilos humanos foram incubados durante 20 horas, à 4°C (controle negativo) ou à 37°C, na ausência ou na presença da lectina MNCF, em diferentes concentrações (0-50 µg/ml). Ao final do período de incubação, as células foram coletadas e incubadas com Anexina-V, marcador de apoptose e 7AAD, marcador de necrose. Os resultados, ilustrados na **figura 13**, mostram que MNCF inibiu significativamente a apoptose espontânea de neutrófilos humanos. A concentração de MNCF que causou maior inibição da apoptose foi a de 0,5 µg/ml. As demais concentrações foram menos efetivas e determinaram aumento da ocorrência de necrose. É importante ressaltar que resultados similares entre si foram obtidos utilizando-se preparações de MNCF submetidas, ou não, a adsorção em resina de Detoxi-gel (**figura 14A**), ligante de LPS.

Os efeitos anti-apoptóticos de MNCF foram comparados aos efeitos da citocina TNF- α (**figura 14B**). Neutrófilos, incubados por 20 horas com TNF- α , tiveram a apoptose espontânea diminuída em nível similar ao determinado por MNCF. O efeito anti-apoptótico de TNF- α sobre neutrófilos humanos foi revertido pela co-incubação das células com etanercept, um receptor solúvel de TNF- α . A co-incubação de neutrófilos com etanercept não interferiu na inibição da apoptose espontânea determinada por MNCF (**figura 14B**).

O experimento ilustrado no painel A demonstra que o efeito inibitório exercido por MNCF não é atribuível à contaminação das preparações com LPS. Já o ensaio ilustrado no painel B demonstra que graus similares de inibição da apoptose são determinados por MNCF

e TNF- α , mas que apenas o efeito de TNF- α é revertido pela co-incubação dos neutrófilos com o receptor solúvel, específico para essa citocina.

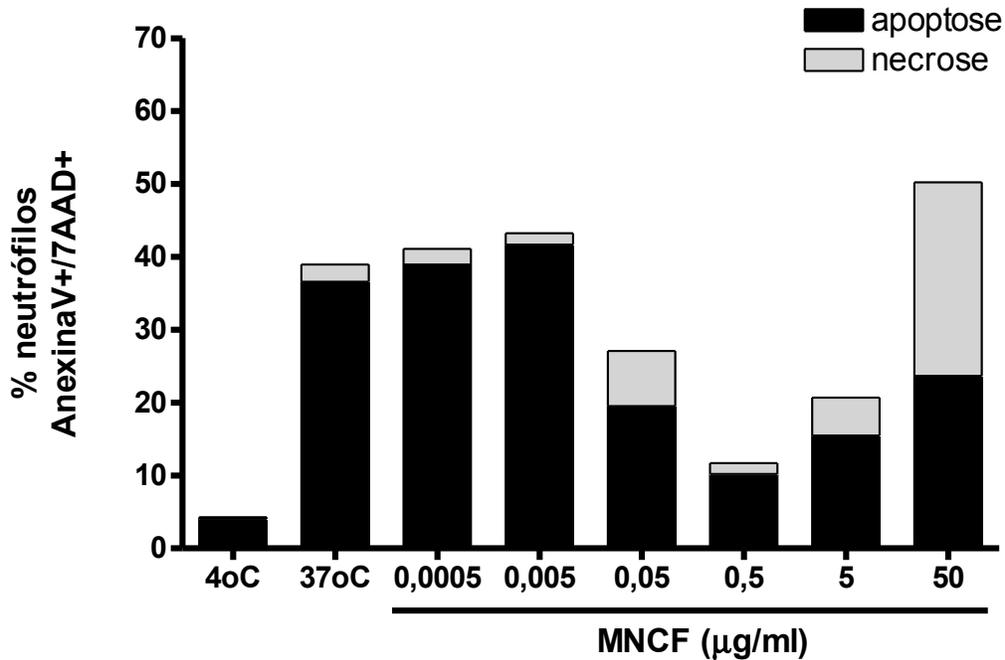


Figura 13. A apoptose espontânea de neutrófilos é inibida por MNCF. Neutrófilos humanos (10^6) foram incubados à 37°C com MNCF em diferentes concentrações (0-50 $\mu\text{g/ml}$) durante 20 horas. As células foram analisadas, por citometria de fluxo, quanto a ligação de Anexina-V (marcador de apoptose) e 7AAD (marcador de necrose). Neutrófilos mantidos à 4°C, durante o mesmo período de 20h, constituíram o controle negativo de apoptose e necrose. O resultado é expresso como porcentagem de células positivas para anexinaV e 7AAD e é representativo de três ensaios independentes.

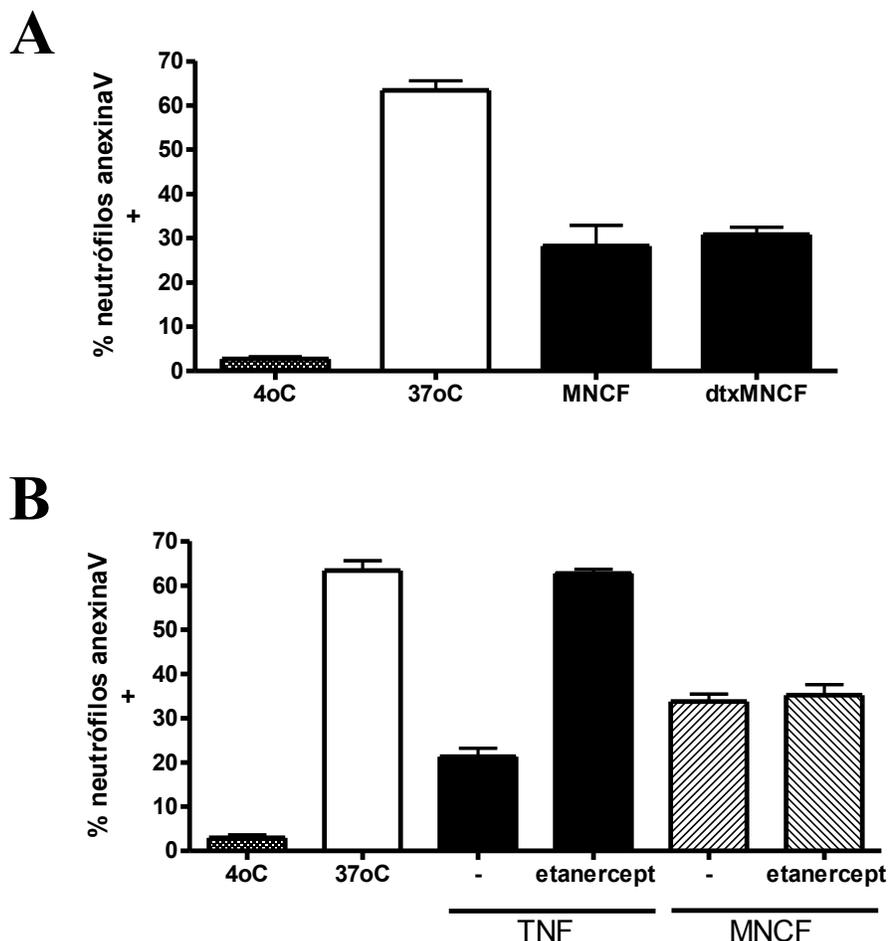


Figura 14. Caracterização do efeito anti-apoptótico de MNCF sobre neutrófilos humanos, comparado ao efeito de TNF- α . Neutrófilos (10^6) foram incubados à 37°C, durante 20 horas, com preparações de MNCF (0.5 $\mu\text{g/ml}$) previamente adsorvidas (dtxMNCF) ou não à resina de Detoxi-gel (A). Realizaram-se ensaios comparativos entre MNCF e TNF- α (B); tais preparações foram acrescidas de etanercept, um receptor solúvel de TNF- α . Os neutrófilos foram analisados, por citometria de fluxo, quanto a ligação de Anexina-V (marcador de apoptose) e 7AAD (marcador de necrose). Neutrófilos mantidos à 4°C, durante o mesmo período de 20h, constituíram o controle negativo de apoptose e necrose. O resultado é expresso em porcentagem de células positivas para anexinaV, e representa a média dos valores obtidos em 3 ensaios independentes.

MNCF induz desgranulação neutrofílica

O monitoramento do processo de desgranulação neutrofílica foi feito por citometria de fluxo, utilizando-se anticorpos específicos para CD11b, CD66, CD35 e CD63. Os neutrófilos foram estimulados com MNCF (0.1-10 µg/ml), à 37°C, por período de 30 minutos. As citocinas TNF- α e CXCL8 foram utilizadas como controles positivos; ambas induziram aumento na expressão de CD11b, determinando cinéticas de ativação distintas: a expressão máxima de CD11b foi detectada aos 5 minutos de estímulo com CXCL8, e aos 20 minutos de estímulo com TNF- α (**figura 15**).

A incubação de neutrófilos humanos com MNCF (10 µg/ml) induziu aumento na expressão de todos marcadores estudados, com exceção de CD63 (**figura 15A**). O estímulo dos neutrófilos com diferentes concentrações de MNCF, mostra que a expressão de CD11b é dose dependente e que 10 µg/ml de MNCF induz alta expressão do marcador (**figura 15B**). Em relação à cinética de expressão de CD11b proporcionada por MNCF (10 µg/ml) foi observado aumento discreto e gradual da expressão de CD11b nos primeiros 20 minutos de estímulo. Decorridos 30 minutos, o efeito de MNCF é máximo sobre a expressão de CD11b (**figura 15C**). A cinética de expressão de CD11b determinada por MNCF é próxima à determinada por TNF- α , enquanto CXCL8 aumentou mais rapidamente a expressão do marcador, que já era máxima aos 10 minutos de estímulo.

O efeito de MNCF (10 µg/ml) sobre a expressão de CD11b aos 30 minutos de estímulo foi comparado ao efeito de TNF- α na condição de presença ou ausência de etanercept. Etanercept reverteu o aumento de expressão de CD11b induzido por TNF- α e não teve qualquer efeito sobre a ação de MNCF (**figura 16A**).

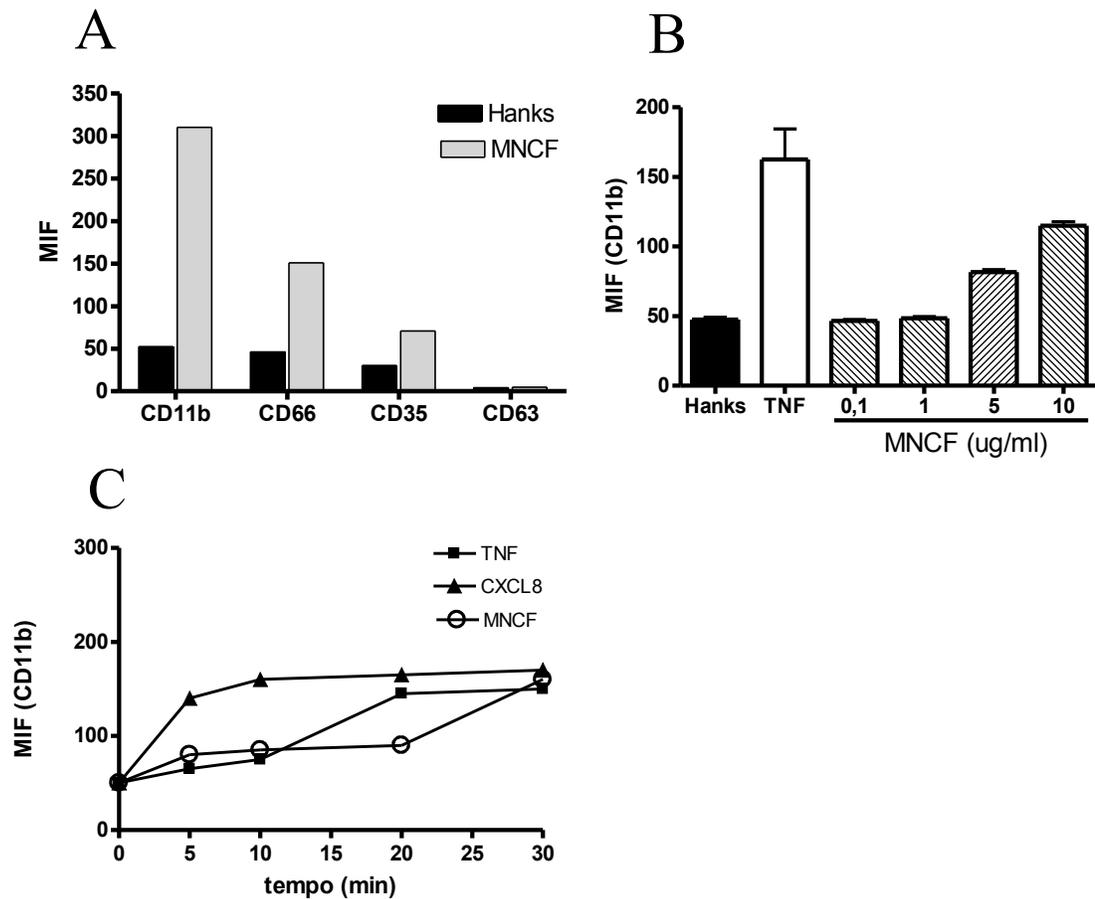


Figura 15. Efeito de MNCF sobre a expressão de marcadores associados ao processo de desgranulação de neutrófilos. A expressão de diferentes marcadores de superfície relacionados ao processo de desgranulação (CD11b, CD66, CD35, CD63) foi avaliada por citometria de fluxo em neutrófilos (10^6) estimulados com MNCF ($10\mu\text{g/ml}$) (painel A). A expressão de CD11b foi analisada a partir do estímulo com diferentes concentrações de MNCF (painel B). A cinética da expressão de CD11b estimulada por MNCF ($10\mu\text{g/ml}$) foi comparada às cinéticas determinadas por CXCL8 e TNF- α . Dos dados obtidos por citometria, a média de intensidade de fluorescência (MIF) foi plotada nos gráficos A, B, C. Os resultados ilustrados representam a média de três ensaios independentes.

Preparações de MNCF pré-adsorvidas, ou não, em resina de Detoxi-gel exerceram efeitos semelhantes sobre a expressão de CD11b em neutrófilos, enquanto preparações de MNCF desnaturadas por fervura não aumentaram a expressão de CD11b na superfície de neutrófilos (**figura 16B**). LPS aumentou, apenas discretamente, a expressão de CD11b (**figura 16B**).

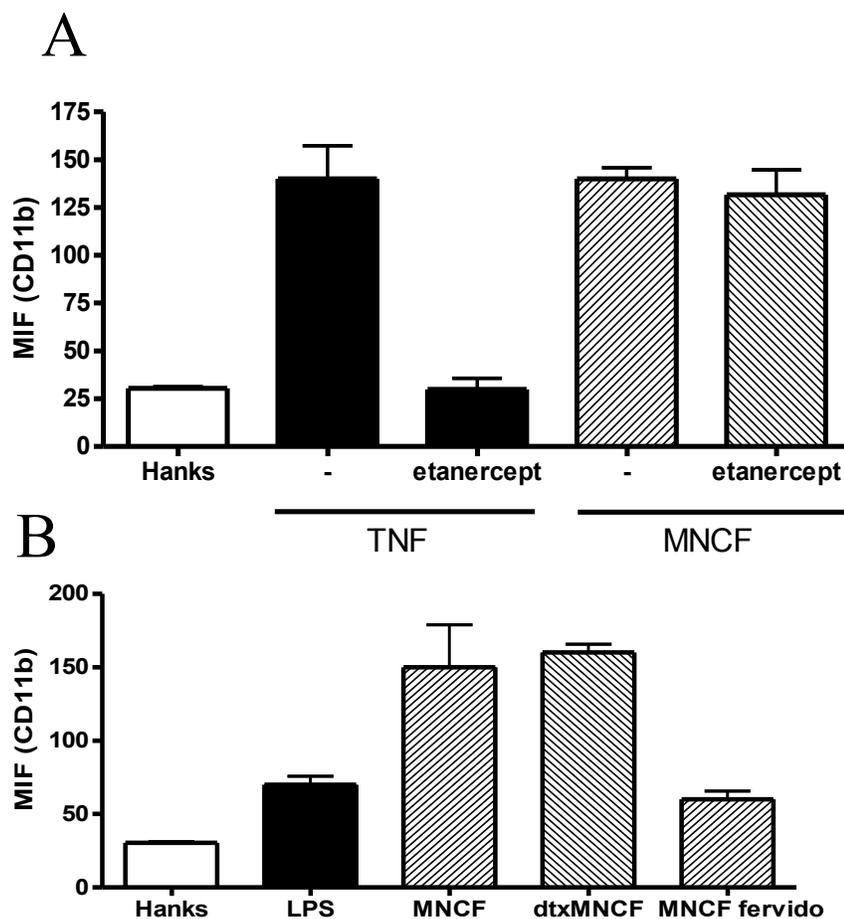


Figura 16. Desgranulação de neutrófilos, induzida por MNCF, manifesta por aumento de expressão de CD11b. Neutrófilos (10^6) foram estimulados por MNCF e analisados quanto a expressão de CD11b. MNCF ($10 \mu\text{g/ml}$) e TNF (20 ng/ml) foram respectivamente acrescidos, ou não, de etanercept ($1 \mu\text{g/ml}$) (A). Neutrófilos também foram incubados com preparações de MNCF adsorvidas em Detoxi-gel ou desnaturadas por fervura. LPS ($10 \mu\text{g/ml}$) também foi ensaiado como estímulo de desgranulação celular. A expressão de CD11b foi avaliada por citometria de fluxo e expressa como Média da Intensidade de Fluorescência (MIF). Os gráficos apresentados são representativos de três ensaios independentes.

MNCF induz fosforilação de tirosino-quinases e p38 MAPK em neutrófilos

A fosforilação de proteínas tirosino-quinases, em neutrófilos estimulados pela lectina MNCF foi estudada através de Western Blot, revelado com anticorpo PY20 conjugado a peroxidase (HRP) (**figura 17**). A revelação de proteínas com resíduos de tirosina fosforilados em neutrófilos não estimulados proporcionou o controle basal (CTR) para análises comparativas. Como controle positivo, foi utilizado TNF- α (20 ng/ml), que induziu fosforilação dos resíduos de tirosina em proteínas de massa molecular aparente de 125 e 70 kDa. MNCF (10 μ g/ml) induziu fosforilação dos resíduos de tirosina em proteínas com massa molecular aparente de 70 kDa (**figura 17**).

Avaliou-se a cinética de fosforilação de p38 MAP quinase induzida por MNCF, TNF- α e CXCL8 (**figura 18**). Observou-se que MNCF foi capaz de induzir fosforilação de p38MAPK, determinando uma cinética de ativação de p38MAPK muito similar à proporcionada por TNF- α . A fosforilação de p38MAPK já ocorria aos 5 minutos de estímulo com MNCF, atingindo um máximo após 10 minutos (**figura 18**). Decorridos 20 minutos de estimulação houve diminuição discreta na quantidade de p38MAPK fosforilada. Já a fosforilação de p38MAPK induzida por CXCL8 foi detectada apenas no período de 5 minutos pós-estimulação; não houve detecção de p38MAPK em sua forma fosforilada decorridos 10 e 20 minutos de estímulo (**figura 18**).

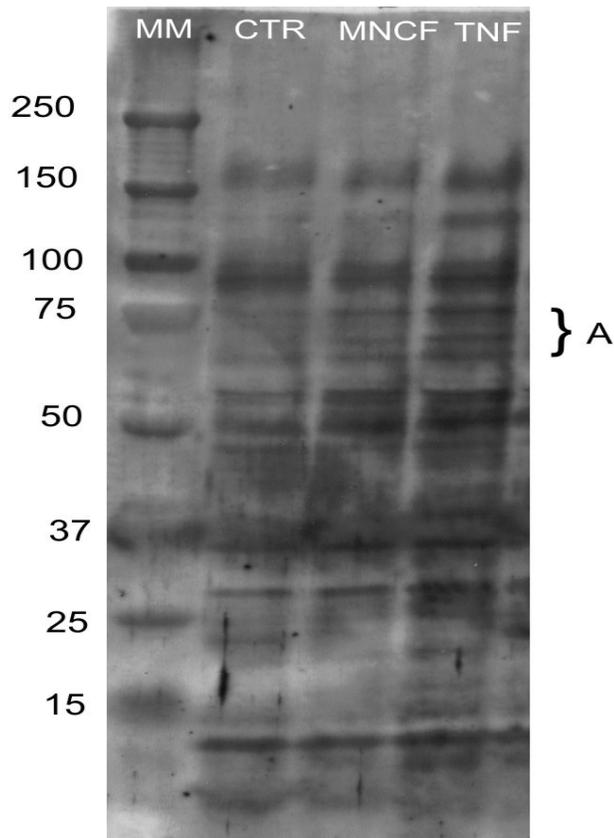


Figura 17. Fosforilação induzida por MNCF de resíduos de tirosina em proteínas de neutrófilos. Neutrófilos (2×10^6) foram estimulados por MNCF (10 $\mu\text{g/ml}$) ou TNF (20 ng/ml) durante 30 minutos, a 37°C . O sedimento de neutrófilos ressuspensão em tampão de amostra redutor foi aplicado em gel de acrilamida, gradiente 7-15%. A fosforilação total foi avaliada através de Western Blot utilizando-se o anticorpo antiPY20 conjugado a peroxidase e revelação por quimioluminescência. MM= mistura de marcadores de massa molecular conhecida, CTR= controle, proporcionado por neutrófilos não estimulados.

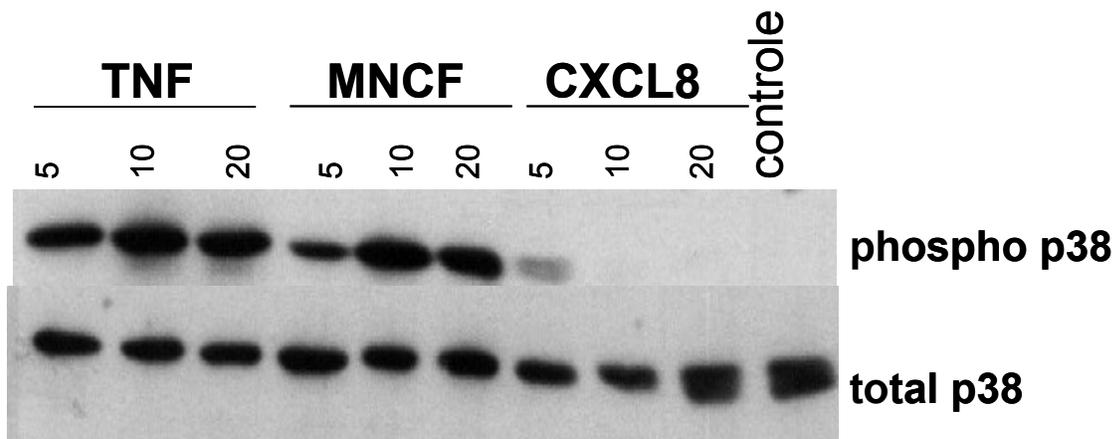


Figura 18. Fosforilação de p38MAP quinase por MNCF. Neutrófilos (2×10^6 células) foram estimulados com TNF (20 ng/ml), MNCF (10 μ g/ml) ou CXCL8 (50 ng/ml), por até 20 minutos, a 37°C. O sedimento celular, solubilizado em tampão de amostra redutor foi aplicado em gel de acrilamida 10%. As formas fosforilada (phospho p38) e total de p38 MAPK (total p38) foram reveladas por anticorpos monoclonais específicos. O controle corresponde ao material obtido de neutrófilos não estimulados.

Avaliação das possíveis vias de sinalização envolvidas na desgranulação induzida por MNCF

Foram avaliadas as vias de sinalização possivelmente envolvidas na desgranulação neutrofílica induzida pela lectina MNCF. Para tanto, utilizaram-se inibidores específicos de tirosino-quinases (genisteína), de proteínas da família Src (PP2), de proteína PKC (staurosporina) e de inibidores das MAP quinases p38 e ERK (SB203580 e PD98059) na avaliação da expressão de CD11b na superfície de neutrófilos estimulados com MNCF. Com exceção de staurosporina, todos os inibidores utilizados determinaram inibição, em diferentes graus, do aumento da expressão de CD11b estimulada por MNCF (**figura 19**). Esse resultado

sugere que as vias de sinalização ativadas por MNCF incluem tirosino-quinases bem como MAP quinases. Nesta análise, a tirosino quinase PKC não faria parte do conjunto de moléculas que sinalizam a ativação de neutrófilos mediada por MNCF.

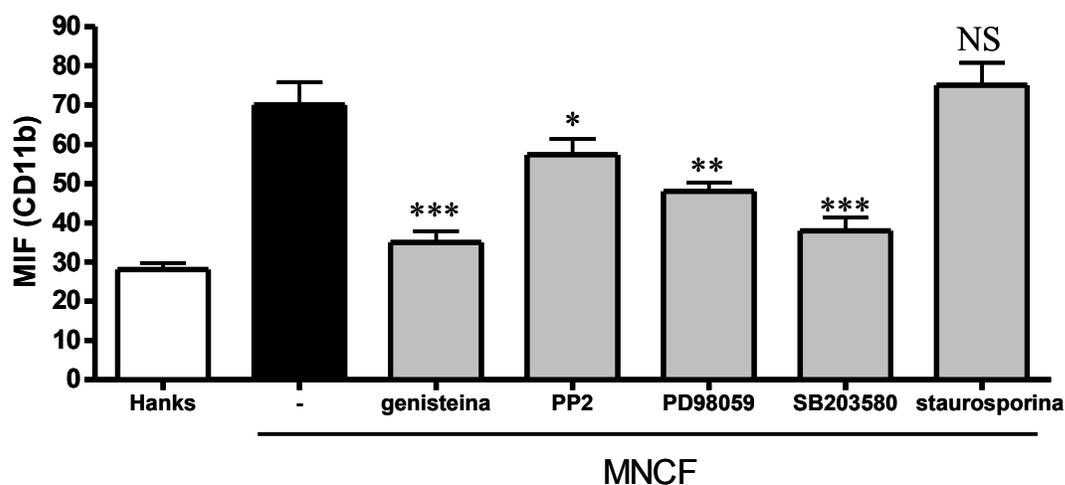


Figura 19. Avaliação de possíveis vias de sinalização envolvidas no processo de degranulação de neutrófilos induzida por MNCF. Neutrófilos (10^6) foram estimulados com MNCF ($10 \mu\text{g/ml}$) e analisados, por citometria de fluxo, quanto a expressão de CD11b. O estímulo foi aplicado em células pré-tratadas com inibidores, indicados na figura, de vias de sinalização envolvidas na desgranulação de neutrófilos. A expressão de CD11b foi avaliada por citometria de fluxo e expressa como Média da Intensidade de Fluorescência (MIF). O gráfico apresentado é resultado da média de três ensaios independentes, sendo * para $P < 0,05$, ** para $P < 0,01$ e *** para $P < 0,001$ comparado a neutrófilos estimulados com MNCF, na ausência de inibidores. *NS*, não significativo.

DISCUSSÃO

O mediador inflamatório MNCF (*Macrophage-derived Neutrophil Chemotactic Factor*) é uma lectina atraente de neutrófilos, ligante de galactosídeos, liberada no sobrenadante de monocamadas de macrófagos peritoneais (rato e camundongos) e macrófagos da linhagem P388-D1 estimulados com LPS (Dias-Baruffi et al, 1995 e Toledo et al, 2007). A atividade de recrutar neutrófilos desta lectina é peculiar pelo fato de manifestar-se mesmo em animais pré-tratados com dexametasona (Dias-Baruffi et al, 1995). Neste trabalho, através de ensaios realizados *in vitro* com neutrófilos humanos, identificamos que a indução de produção persistente de CXCL8, mantida em células pré-tratadas com dexametasona é um dos eventos que distingue MNCF de outros atraentes. Caracterizamos ainda o processo de desgranulação de neutrófilos induzido por MNCF e avaliamos as vias de sinalização implicadas nesse evento.

Moreno et al. (2003) descreveram a existência de um glicoligante para MNCF, na superfície de neutrófilos humanos. Trata-se de um receptor acoplado a proteína G, uma vez que o tratamento com Toxina pertussis inibiu a migração de neutrófilos induzida pela lectina. Receptores em neutrófilos podem ter a sua expressão e funcionalidade modificadas por glicocorticóides. Por exemplo, a expressão dos receptores da citocina IL1 e de Fc γ do tipo I em neutrófilos é regulada por dexametasona (revisado por Goulding, 1998). Outro estudo sugere que glicocorticóides possam interferir na interação de receptor da superfície do neutrófilo com seu agonista (Filep et al. 1997). Nossos resultados demonstram que o pré-tratamento de neutrófilos humanos com dexametasona não inibe, e nem mesmo interfere, na ligação de MNCF à superfície de neutrófilos, evento este que desencadeia a ativação neutrofílica e culmina com a transmigração celular (Moreno et al. 2003).

Comparamos atividades exercidas por MNCF sobre neutrófilos com as exercidas por atraentes conhecidos – fMLP e CXCL8. Na presença de dexametasona, os resultados proporcionados variaram de acordo com o atraente testado. O peptídeo fMLP teve sua atividade indutora de migração inibida, resultado coincidente com o relatado por Burnett et al. (1994), mas que diverge de outros estudos (Sasagawa et al. 2000; Lomas et al. 1991). Já a quimiocina CXCL8 e a lectina MNCF não tiveram sua atividade atraente inibida pelo pré-tratamento dos neutrófilos com dexametasona. Comportamento semelhante já foi descrito para LTB4 e PAF (Psychoyos et al. 1989; Kurihara et al. 1989; Sasagawa et al. 2000), mas o mecanismo que o determina ainda é desconhecido. Sasagawa et al. (2000) sugerem que a ação inibitória de glicocorticóides envolva mecanismo relacionado à inibição da secreção da quimiocina CXCL8. Nossos resultados demonstram que neutrófilos estimulados com MNCF produzem CXCL8, produção esta que é mantida em neutrófilos pré-tratados com dexametasona.

Observamos que o pré-tratamento de neutrófilos com dexametasona não alterou o *shedding* de L-selectina provocado pelos estímulos PMA ou CXCL8, manifesto desde 5 minutos após o estímulo. Já o estímulo com MNCF de neutrófilos pré-tratados com dexametasona resultou em manutenção dos níveis de CD62L, no decorrer de 60 minutos, ou seja, em ausência de *shedding* de L-selectina. Baseando-se em dados de Filep et al (1997) poder-se-ia supor que a ausência de *shedding* frente ao estímulo com MNCF estaria relacionada à ausência de interação dessa lectina com o seu respectivo receptor. No entanto, este trabalho demonstra claramente que o pré-tratamento de neutrófilos com dexametasona não interfere na ligação da lectina ao seu receptor. Assim, outras alternativas devem ser cogitadas. Por exemplo, visto que a ação proteolítica da enzima *sheddase* depende de uma estrutura tri-dimensional apropriada de CD62L, próxima à membrana plasmática (Zouki et al.

2000), é válido especular que o pré-tratamento com dexametasona interfira na conformação estrutural de CD62L, fazendo com que o processo de *shedding* induzido por MNCF seja inibido.

O fato do processo de migração induzido por MNCF se completar a despeito da ausência de *shedding* de CD62L não é coerente com a idéia clássica de que o *shedding* seja um pré-requisito para a diapedese de neutrófilos. Tal exigência tem sido contestada por diversos autores. Estudos *in vivo* e *in vitro* usando inibidores de protease que bloqueiam a clivagem de CD62L têm gerado resultados conflitantes. O inibidor KD-IX-73-4 reduz a velocidade do *rolling* de neutrófilos e aumenta o acúmulo desse tipo celular sobre ligantes imobilizados, em condições de fluxo (Walcheck et al. 1996). Já o inibidor de metaloproteinase, Ro 31-9790, bloqueia a clivagem de CD62L, sem alterar a habilidade dos neutrófilos de aderir, rolar e transmigrar (Allport et al. 1997). Em camundongos que expressam CD62L modificadas, por *gene targeting*, resistente à clivagem proteolítica, há aumento do afluxo de neutrófilos para sítio inflamatório (Venturi et al. 2003). Assim, há dados da literatura que dão suporte à nossa observação de que a manutenção da expressão de CD62L, em condições anti-inflamatórias, não é impeditiva para a ocorrência da migração de neutrófilos.

Os processos de polimerização e polarização dos filamentos de F-actina foram estudados em neutrófilos estimulados por MNCF antes do pré-tratamento, ou não, com dexametasona. MNCF induz a polarização, ainda que tardia, dos neutrófilos, sem, contudo aumentar o conteúdo de F-actina na célula. Os fenômenos tardios induzidos por MNCF remetem às ações de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , que induzem migração de neutrófilos por mecanismo indireto (Faccioli et al. 1990). TNF- α induz mudanças

morfológicas em neutrófilos, associadas porém à queda no conteúdo de F-actina (Kutsuna et al. 2004). Dada a importância da polarização dos filamentos de F-actina em direção à região frontal das células para que elas se movam, sugerimos que a migração neutrofílica induzida por MNCF envolva mudanças morfológicas e reorganização da F-actina; mas não obrigatoriamente a polimerização dos filamentos de F-actina.

Diversos trabalhos mostram o papel regulatório dos glicocorticóides sobre os filamentos de actina (Miki et al. 2000; Clark et al. 2005). Demonstramos que o pré-tratamento com dexametasona diminui o conteúdo de F-actina em neutrófilos. Tomando como referência esse conteúdo diminuído de F-actina de neutrófilos pré-tratados com dexametasona, é possível constatar uma recuperação parcial do conteúdo de F-actina em resposta ao estímulo com CXCL8, fMLP e MNCF, sem que nenhuma alteração morfológica visível fosse visualizada.

O processo de polarização dos filamentos de F-actina envolve a participação orquestrada de diversas proteínas e receptores. Receptores de quimioatraentes, integrinas e outras moléculas de adesão, proteínas do citoesqueleto e moléculas regulatórias intracelulares mudam sua localização celular durante o processo de polarização. Um sistema complexo de moléculas de transdução de sinal, incluindo tirosino-quinases, lipídeo quinases, mensageiros secundários, como cálcio ou cAMP e membros da família Rho das pequenas GTPases estão envolvidos no processo regulatório do rearranjo do citoesqueleto durante a polarização e a migração do leucócito (revisto por Sanchez-Madrid e del Pozo, 1999). Além disso, outras proteínas pertencentes a rede de microfilamentos podem ser responsáveis pela locomoção celular, como talina, tubulina e paxilina (revisto por Sanchez-Madrid e del Pozo, 1999), mas elas não foram avaliadas em nosso estudo. Assim, investigação adicional é necessária para verificar se dexametasona inibe a locomoção celular através da inibição da polarização dos

filamentos de F-actina e, ainda, se o estímulo com MNCF não se associa ao rearranjo da rede de citoesqueleto celular, ou rearranje outros filamentos diferentes de F-actina. A complexidade do processo de migração celular, que envolve diversas cascatas de sinalização e diferentes tipos celulares, reforça a necessidade de que se ampliem os estudos em torno da lectina MNCF e suas ações peculiar sobre a ativação e migração de neutrófilos.

Nossas observações sugerem claramente que neutrófilos humanos após tratamento com dexametasona continuam sendo células responsivas ao estímulo da lectina MNCF. Com o intuito de ampliarmos essa caracterização, analisamos ainda a transcrição gênica de citocinas (TNF- α e IL1 β) e quimiocinas (CXCL8 e CCL2) pró-inflamatórias. Demonstramos, pela primeira vez, que MNCF é uma lectina indutora de altos níveis de mRNA para moléculas pró-inflamatórias, efeito que é independente do pré-tratamento das células com dexametasona. Esses resultados se revestem de especial importância se levarmos em consideração as fortes evidências, existentes na literatura, de que o efeito anti-inflamatório dos glicocorticóides seja atribuído à inibição da transcrição de genes de proteínas pró-inflamatórias. Esses genes correspondem aos de numerosas citocinas (interleucinas 1-6, 11, 13, TNF-alpha e GM-CSF), quimiocinas (CXCL8, CCL5, CCL3, CCL2, CCL11) e moléculas de adesão (revisto por Cosio et al. 2005). Isso significa que a lectina MNCF seja um agente indutor de migração de neutrófilos resistente aos efeitos de dexametasona e que um dos mecanismos dessa resistência esteja associado a sua propriedade de manter a transcrição gênica de mediadores inflamatórios, a despeito dos efeitos inibitórios exercidos pelo glicocorticóide. Os mecanismos propostos de repressão da transcrição gênica mediada pelos glicocorticóides são (a) interação proteína-proteína entre GR ativado e fatores de transcrição como AP-1 (Jonat et al. 1990) e NF-kB (Ray e Prefontaine, 1994), (b) inibição

da translocação nuclear das subunidades de NF- κ B (Ohtsuka et al. 1996) e, (c) bloqueio da interação de NF- κ B com o próprio DNA (Scheinman et al. 1994).

Dentre os mediadores inflamatórios que tiveram sua transcrição gênica aumentada pela lectina MNCF merece destaque CXCL8. Esta quimiocina está implicada na rápida amplificação da resposta inflamatória aguda, através do recrutamento de neutrófilos e da prevenção de apoptose dessas células. Dada a sua importância no processo inflamatório, foi feita a quantificação da proteína CXCL8. MNCF, diferentemente de LPS e fMLP, induz secreção de CXCL8 por neutrófilos pré-tratados ou não com dexametasona, fato coerente com o resultado proporcionado pela análise de transcrição gênica e que pode justificar o efeito indutor de migração de neutrófilos pré-tratados com dexametasona exercido por MNCF.

CXCL8 é uma quimiocina encontrada estocada intracelularmente em neutrófilos. A sub-localização de CXCL8 ainda não foi definida com exatidão, mas acredita-se que ela esteja presente em grânulos neutrofílicos não clássicos (Pellmé et al. 2006). Baseados na importância do processo de desgranulação neutrofílica durante o processo inflamatório (Borregaard et al., 1994; Sengelov et al., 1993) e da existência de citocinas e quimiocinas estocadas em seu citoplasma (Lloyd e Oppenheim, 1992; Bronchud et al. 1987; Caspar et al. 1993; Cassatella, 1995; Bliss et al. 1999; Kasama et al. 1993 e 1994; Rudack et al. 2004), seguimos nosso estudo avaliando o papel de MNCF na desgranulação de neutrófilos, avaliada em paralelo com o efeito sobre a apoptose espontânea de neutrófilos.

Demonstramos que a lectina MNCF em baixas concentrações (0.5 μ g/ml) diminui a taxa apoptótica espontânea de neutrófilos e não ativa o processo de desgranulação neutrofílica. Para que ocorra aumento de expressão nos marcadores de desgranulação

neutrofílica são necessárias concentrações maiores (10 µg/ml) dessa lectina. Porém, nessas condições, observa-se maior frequência de neutrófilos necróticos. Assim, a concentração ótima de MNCF varia para diferentes efeitos biológicos, como a proteção à apoptose espontânea de neutrófilos ou a desgranulação celular. Esse comportamento da lectina MNCF levou à formulação de várias hipóteses.

Primeiramente, a modulação da apoptose apresentada por MNCF poderia estar intimamente relacionada com o estado de ativação induzido pela lectina. O TNF- α é uma citocina que também modula a apoptose espontânea de neutrófilos de maneira dependente da dose utilizada; os autores dessa observação sugerem que a diminuição da meia vida dos neutrófilos relacione-se ao estado de ativação celular, induzido pela citocina. Em altas concentrações, TNF- α ativa o *burst* respiratório e CD11b/CD18, concomitantemente com as vias pró-apoptóticas. Já em baixas concentrações, TNF-alpha exerce efeito anti-apoptótico (van den Berg et al. 2001).

Os diferentes efeitos exercidos por MNCF em diferentes doses poderiam ser atribuíveis à presença de contaminantes em nossas preparações de MNCF. Há semelhanças entre os efeitos de MNCF e de outros mediadores sobre neutrófilos. A cinética de desgranulação neutrofílica induzida por MNCF é semelhante à determinada por TNF- α , citocina implicada no extravasamento de neutrófilos e no recrutamento dos mesmos para o sítio inflamatório (Canetti et. al., 2001 e 2003, Gosset et. al., 1984, Xing et. al., 1994, Bombini et. al., 2004). TNF- α , diferentemente de fMLP ou LTB₄, ativa neutrófilos tardiamente, induzindo, dentre outras respostas, aumento na expressão de CD11b e CD15 via p38 MAPK (Berger et. al., 2002, Suzuki et. al. 2001). Cecílio e colaboradores (1997) postularam que a citocina TNF-alpha murina fosse a responsável pela atividade quimiotática de neutrófilos

resistente à dexametasona em camundongos, hipótese fundamentada em ensaios de quimiotaxia feitos na presença de anticorpos anti-TNF- α murino. Cabe ressaltar que a citocina TNF- α apresenta sítio lectínico, específico para açúcares contendo diacetilquitobiose (Lucas et al. 1994). Como descrito acima, TNF- α possui atividade anti-apoptótica sobre neutrófilos (van den Berg et al. 2001), além de induzir desgranulação neutrofílica aumentando a expressão de moléculas de adesão como CD11b e CD15 (Berger et al. 2002; Suzuki et al. 2001). Já havíamos demonstrado anteriormente que preparações de MNCF murinas são desprovidas de TNF- α (Toledo et al. 2007) e novas evidências desse fato foram geradas no presente trabalho. Às preparações de MNCF foi adicionada a droga ethanercept, um receptor solúvel de TNF- α , capaz de bloquear as atividades anti-apoptóticas e indutoras de desgranulação neutrofílica induzidas pela citocina. Nestas condições, as atividades de MNCF não foram inibidas, afastando, mais uma vez, a possibilidade de que TNF- α seja o responsável pelas atividades da lectina MNCF.

O processo de obtenção de MNCF envolve o estímulo de macrófagos em cultura com LPS. Há indicações na literatura de que LPS é contaminante comum de amostras biológicas, não sendo eliminado facilmente por processos convencionais de cromatografia (Wicks et al. 1995; Issekutz 1983). Por essa razão, avaliou-se a atividade das preparações de MNCF após processo de adsorção de LPS em resinas com polimixina B imobilizada (Detoxi-gel) ou após fervura por 10 minutos, processo de desnaturação protéica ao qual LPS é resistente. O processo de desnaturação protéica inibiu as atividades da amostra, enquanto que a adsorção à coluna de Detoxi-gel não afetou os efeitos exercidos pela amostra. Os resultados obtidos não eliminam a possibilidade de contaminação das preparações de MNCF com LPS, mas sugerem fortemente que a mobilização de grânulos induzida por MNCF não corresponda

a processo que exige o *priming* de neutrófilos, como ocorre com galectina-3 (Karlsson et. al., 1998, Almkvist et. al., 2001).

Galectina-3 é uma lectina ligante de β -galactosídeos que atua sobre a fisiologia de neutrófilos induzindo agregação celular (Timoshenko et. al., 2003), adesão a laminina (Kuabara & Liu, 1996) e o extravasamento em resposta a infecção (Sato et. al., 2002). A ação de galectina-3 sobre neutrófilos, ocorre após o *priming* celular através da incubação com LPS ou citocalasina B. O *priming* é indispensável porque o receptor de galectina-3, CD66b, encontra-se no interior dos grânulos de gelatinase (Karlsson et. al., 1998, Almkvist et. al., 2001, Feuk-Lagerstedt et. al., 1999, Yamaoka et. al., 1995, Sengelov et. al., 1995). A comparação entre galectina-3 e MNCF, no que tange aos aspectos supracitados, torna válido supôr que o receptor para MNCF esteja constitutivamente expresso na superfície de neutrófilos humanos.

Finalmente, investigamos a possibilidade que MNCF interaja com neutrófilos humanos através de diferentes receptores, fosforilando assim diversas proteínas envolvidas nesta cascata de sinalização. Para tanto, avaliou-se a interferência exercida por diferentes inibidores da cascata de sinalização sobre a desgranulação neutrofilica induzida por MNCF. Há um aumento da fosforilação de proteínas, nos resíduos de tirosina, em resposta a diferentes agonistas de desgranulação, como agentes quimiotáticos e quimiocinas, ligantes de receptores Fc, citocinas, microcristais inflamatórios e PMA (phorbol myristate acetate) (Yan et al. 1996; Huang et al. 1988 e 1990; Gómez-Cambronero et al. 1989, 1991 e 1992; Berkow & Dodson 1990; McColl et al. 1991; Connely et al. 1991; Ohta et al. 1992; gaudry et al. 1993; Richard et al. 1994a e 1994b; Dusi et al. 1994a e 1994b; Liang et al. 1995). Estudos com inibidores de tirosino-quinases indicaram que a mobilização das vesículas secretórias

requer fosforilação de tirosina (Naccache et al. 1994). MNCF, a exemplo de outros agonistas de neutrófilos, induz fosforilação dos resíduos de tirosina. Além disso, genisteína (um inibidor de tirosino-quinases) inibe de maneira significativa a desgranulação induzida por MNCF. As proteínas fosforiladas por MNCF têm massa molecular aparente de 70 kDa, sugerindo fortemente a quinase Syk, juntamente com a família Src (Fgr, Hck e Lyn) estejam envolvidas na transdução de sinal pelos receptores sete transmembrânicos (Gaudry et al. 1995; Ptasznik et al. 1995 e 1996), β 2-integrinas (Berto et al. 1994; Yan et al. 1995), Fc γ Rs (Hamada et al. 1993; Kiener et al. 1993) e outros estímulos (Corey et al. 1994; Welch et al. 1997). No atual estado da investigação, só é possível afirmar que a família Src esteja envolvida no processo de desgranulação induzido por MNCF, já que PP2 inibiu o aumento de CD11b na superfície de neutrófilos estimulados pela lectina.

A desgranulação de neutrófilos induzida por MNCF foi avaliada sob a influência de outros inibidores, como a staurosporina, um inibidor de PKC. PKC, juntamente com Ca²⁺ citosólico livre é ativado por agonistas de receptores, como PMA, um poderoso indutor de desgranulação. Apesar de fortes sugestões de participação de PKC no processo de desgranulação neutrofílica, o inibidor staurosporina não afetou o aumento de expressão de CD11b na superfície de neutrófilos estimulados por MNCF. Esse resultado torna improvável que o receptor de MNCF, na superfície de neutrófilos, ative vias em que PKC esteja implicada.

A cascata de MAP quinase é descrita por participar de múltiplas funções neutrofílicas como desgranulação, locomoção, proliferação, diferenciação e sobrevivência (Lewis et al., 1998). Peptídeos quimiotáticos (Grinstein & Furuya 1992; Torres et al. 1993), quimiocinas (Knall et al. 1996), L-selectina (Waddell et al. 1995), citocinas (Gomez-

Cambronero et al. 1993; Rafiee et al. 1995) ativam esta via em neutrófilos, ficando demonstrado agora que MNCF faz o mesmo. MNCF induz fosforilação máxima de p38MAPK de maneira tempo-dependente, exercendo sua atividade máxima após 10 minutos de estímulo, de maneira semelhante a TNF-alpha. A cinética de fosforilação de p38MAPK proporcionada por MNCF, diferiu da atribuída a CXCL8 quanto ao aumento na expressão de CD11b. Além disso, SB203580 e PD98059, inibidores de p38 e ERK MAPK, respectivamente, inibiram de maneira significativa a desgranulação induzida por MNCF.

O conjunto de resultados apresentados constitui uma primeira demonstração de que MNCF induz atividades anti-apoptótica e indutora de desgranulação em neutrófilos. A caracterização desses eventos, ainda que parcial, fornece informações importantes sobre essa lectina, resumidas a seguir. MNCF induz desgranulação de grânulos específicos e de gelatinase e das vesículas secretórias, não afetando os grânulos azurofílicos. Esse processo de desgranulação é independente do *priming* de neutrófilos por LPS e da presença da citocina TNF-alpha. Dentre as vias de sinalização ativadas por MNCF durante o processo de desgranulação estão as tirosino-quinases, proteínas da família Src e as MAP quinases, p38 e ERK.

A respeito da migração neutrofilica induzida por MNCF em condições anti-inflamatórias, grandes avanços também foram feitos e e podem ser, resumidamente, avaliados na **tabela 3**. Nossos resultados complementam observação prévias de Toledo et al. 2007, onde foi demonstrada a importância de glicoproteínas da matriz extracelular (laminina e fibronectina) na resistência à ação de dexametasona, tanto na adesão quanto na haptotaxia induzidas por MNCF. Demonstramos, neste trabalho, que o glicocorticóide dexametasona, embora modifique alguns efeitos de MNCF sobre neutrófilos humanos, não impede sua ação ativadora sobre tal tipo celular. Neutrófilos humanos que tiveram contato com dexametasona

e foram estimulados por MNCF são células que, embora não apresentem *shedding* de CD62L e polarização de F-actina, mantém capacidade migratória. Secundariamente, após translocamento nuclear de NF- κ B p50, são ativadas vias de transcrição gênica e secreção de mediadores inflamatórios, como CXCL8.

Finalmente, sugerimos que MNCF não seja o único mediador envolvido na migração neutrofílica resistente à ação de glicocorticóides. Embora maiores estudos sejam necessários, demonstramos que nessa condição anti-inflamatória, MNCF lança mão de uma indução persistente da secreção de diversos outros mediadores pró-inflamatórios. A disponibilidade destes mediadores no sítio inflamatório poderá, então, complementar a ação inflamatória da lectina MNCF tanto sobre neutrófilos quanto outros tipos celulares envolvidos no processo inflamatório, auxiliando assim na quebra de resistência aos glicocorticóides.

Tabela 3. Análise comparativa das atividades desencadeadas pelos agonistas MNCF e CXCL8 sobre neutrófilos pré-tratados ou não com dexametasona (DX).

Atividades avaliadas	MNCF		CXCL8	
	sem DX	com DX	sem DX	com DX
Migração neutrofílica	sim	sim	sim	sim
Shedding L-selectina	sim	não	sim	sim
Aumento na expressão de F-actina	não	sim	sim	sim
Polarização celular	sim	não	sim	não
Translocamento de NF- κ B	sim	sim	sim	sim
Transcrição gênica	sim	sim	sim	não
Secreção de CXCL8	sim	sim	-	-

CONCLUSÕES

MNCF foi caracterizado como uma lectina agonista de neutrófilos humanos que atua sobre os seguintes parâmetros: (i) diminuição na taxa espontânea de apoptose, (ii) desgranulação de vesículas secretórias e grânulos secundários dependente da participação de tirosino e MAP quinases, além de membros da família Src, (iii) *shedding* de CD62L, (iv) translocação de NF- κ B, (v) transcrição gênica de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e, (vi) secreção de CXCL8.

Além disso, a manutenção de transcrição gênica e secreção de mediadores pró-inflamatórios, sob condições anti-inflamatórias, corresponde a um possível mecanismo pelo qual MNCF recruta neutrófilos de maneira resistente à ação de glicocorticóides.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe S, Ohnishi M, Nohmi T, Katoh M. et al. (1996) A glucocorticoid antagonist, mifepristone, affects anticandida activity of murine neutrophils in the presence of prednisolone-treated mice in-vivo. *FEMS Immunol Med. Microbiol* v. 13: 311-316

Allport JR, Ding HT, Ager A, Steeber DA. et al. (1997) L-selectin *shedding* does not regulate human neutrophil attachment, rolling or transmigration across human vascular endothelium *in vitro*. *J. Immunol.* v. 158: 4365-4372

Almkvist J, Faldt J, Dahlgren C, Leffer H, Karlsson A. (2001) Lipopolysaccharide-induced gelatinase granule mobilization primes neutrophils for activation by galectin-3 and formylmethionyl-Leu-Phe. *Infect Immun.* v. 69(2):832-7

Alpin AE, Howe S, Alahari SK, Juliano R.L. (1998) Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: The role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol. Rev.*, v. 50: 197-263

Arnljots K, Sorensen O, Lollike K, Borregaard N. (1998) Timing, targeting and sorting of azurophil granule proteins in human myeloid cells. *Leukemia*, v. 12: 1789–1795

Bainton DF, Ulliyot JL, Farquhar MG. (1971) The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J. Exp. Med.*, v. 134: 907–934

Bamberger CM, Bamberger AM, de Castro M, Chrousos GP. (1995) Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. *J. Clin. Invest.*, v. 95: 2435-2441

Bargatze RF, Kurk S, Butcher EC, Jutila MA. (1994) Neutrophils roll on adherent neutrophils bound to cytokine-induced endothelial cells via L-selectin on the rolling cells. *J. Exp. Med.*, v. 180:1785-1792

Bazil, V. & Strominger, JL. (1994) Metalloprotease and serine protease are involved in cleavage of CD43, CD44 and CD16 from stimulated human granulocytes. *J. Immunol.*, v. 152: 1314-1322

Berger M, Budhu S, Lu E, Li Y, Loike D. et al. (2002) Different G(i)-coupled chemoattractant receptors signal qualitatively different functions in human neutrophils. *J Leukoc Biol*, v. 71: 798-806

Berkow RL, Dodson RW. (1990) Tyrosine specific protein phosphorylation during activation of human neutrophils. *Blood*, v. 75: 2445-2452

Bernardes, ES. (2000) “Reconhecimento de alfa-glicanas pela lectina MNCF. Identificação de proteína cognata ao MNCF no soro fetal bovino” Rib. Preto (Dissertação de Mestrado, FMRP-USP)

Berton G, Fumagalli L, Laudanna C, Sorio C. Beta2 integrin-dependent protein tyrosine phosphorylation and activation of the FGR protein tyrosine kinase in human neutrophils. *J Cell Biol*, v. 126: 1111-1121

Bianchi E, Bender JR, Blasi F, Pardi R. (1997) Through and beyond the wall: late steps in leucocyte transendothelial migration. *Immunol. Today*, v. 18, p. 586-591

Bienenstock J, Befus AD, Denburg JA. (1986) Mast cell heterogeneity: basic questions and clinical implications. In: Befus AD, Beinenstock J, Denburg JA. *Mast Cell Differentiation and Heterogeneity*. Raven Press, Inc., New York, p. 379-402

Bliss SK, Marshall AJ, Zhang Y, Denkers EY. (1999) Human polymorphonuclear leukocytes produce IL-12, TNF- α , and the chemokines macrophage-inflammatory protein-1 α and -1 β in response to *Toxoplasma gondii* antigens. *J Immunol.*, v. 162: 7369-7375

Bohnsack JF, Chang J, Zhou X, Yednock TA. (1995) Mechanisms of beta 1 integrin-dependent adherence of granulocytic HL60 to fibronectin. *J. Leukoc. Biol.*, v. 57: 592-599

Bombini G, Canetti R, Rocha FA, Cunha FQ. (2004) Tumour necrosis factor- α mediates neutrophil migration to the knee synovial cavity during immune inflammation. *Eur j Pharmacol.*, v. 496: 197-204

Borregaard N. & Cowland JB. (1997) Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, v. 89: 3503-3521

Borregaard N, Kjeldsen L, Sengelov H, Diamond MS et al. (1994) Changes in subcellular localization and surface expression of L-selectin, alkaline phosphatase, and Mac-1 in human neutrophils during stimulation with inflammatory mediators. *J. Leukocyte Biol*, v. 56: 80-87

Borregaard N, Miller LJ, Springer TA. (1987) Chemoattractant-regulated mobilization of a novel intracellular compartment in human neutrophils. *Science*, v. 237: 1204-1206

Brandes ME, Mai UE, Ohura K, Wahi SM. (1991) Type I transforming growth factor- β receptors on neutrophils mediate chemotaxis to transforming growth factor- β . *J.Immunol*, v. 147: 1600-1606

Bronchud MH, Scarffe JH, Thatcher N, Crowther D et al. (1987) Phase I/II study of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in patients receiving intensive chemotherapy for small cell lung cancer. *Br J Cancer*, v. 56: 809-813

Brown SB, and Savill J (1999). Phagocytosis triggers macrophage release of Fas ligand and induces apoptosis of bystander leukocytes. *J Immunol.*, v. 162:480-485

Bruehl RE, Moore KL, Lorant DE, Borregaard N et al. (1997) Leukocyte activation induces surface redistribution of P-selectin glycoprotein ligand-1. *J. Leukoc. Biol.*, v. 61: 489-499

Bruyninckx WJ, Comerford KM, Lawrence DW, Colgan SP. (2001) Phosphoinositide 3-quinase modulation of beta-3-integrin represents an endogenous “braking” mechanism during neutrophil transmatrix migration. *Blood*, v. 97: 3251-3258

Burnett D, Adams DH, Martin TJ, Liu Q et al. (1994) Inhibition by FK506 of formyl peptide-induced neutrophil activation and associated protein synthesis. *Biochem. Pharmacol.* v. 48: 1081-1088

Burton JL, Kehrli ME, Kapil S, Horst RL. (1995) Regulation of L-selectin and CD18 on bovine neutrophil by glucocorticoids – effects of cortisol and dexamethasone. *J. Leukoc. Biol.* v. 57: 317-325

Canetti C, Silva JS, Ferreira SH, Cunha FQ. (2001). Tumor necrosis factor-alpha and leukotriene B(4) mediate the neutrophil migration in immune inflammation. *Br J Pharmacol*, v. 134: 1619-1628

Carlos TM and Harlan JM (1994) Leukocyte–endothelial adhesion molecules. *Blood*, v. 84: 2068–2101

Caspar CB, Seger RA, Buger J, Gmur J. (1993) Effective stimulation of donors for granulocyte transfusion with recombinant methionyl granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*, v. 81: 2866-2871

Cassatella MA. (1995) The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today*, v. 16: 21-26

Cecilio CA, Costa EH, Ulcelli EH, Chaves CAA et al. (1997) The neutrophil migration induced by tumor necrosis alpha in mice is unaffected by glucocorticoids. *Mediators of inflammation*, v. 6: 46-52

Cham BP, Gerrard JM and Bainton DF. (1994) Granulophysin is located in the membrane of azurophilic granules in human neutrophils and mobilizes to the plasma membrane following cell stimulation. *Am. J. Pathol.*, v. 144: 1369–1380

Chapple DS, Mason DJ, Joannou CL, Odell EW et al. (1998) Structure–function relationship of antibacterial synthetic peptides homologous to a helical surface region on human lactoferrin against *Escherichia coli* serotype O111. *Infect. Immun.*, v. 66: 2434–2440

Chertov O, Michiel DF, Xu L, Wang JM et al. (1996) Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J. Biol. Chem.*, v. 271: 2935–2940

Cieutat AM, Lobel P, August JT, Kjeldsen L. et al. (1998) Azurophilic granules of human neutrophilic leukocytes are deficient in lysosome-associated membrane proteins but retain the mannose 6-phosphate recognition marker. *Blood*, v. 91: 1044–1058

Clark AF, Brotchie D, Read AT, Hellberg P et al. (2005) Dexamethasone alters F-actin architecture and promotes cross-linked actin network formation in human trabecular meshwork tissue. *Cell Motil Cytoskeleton*, v. 60(2): 83-95

Clark EA, Brugge JS. (1995) Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science*, v. 268: 233-239

Conelly PA, Farrell CA, Merenda JM, Conklyn MJ, Showell HJ. (1991) Tyrosine phosphorylation is an early signaling event common to Fc receptor crosslinking in human neutrophils and rat basophilic leukemia cells (RBL 2H3). *Biochem Biophys Res Commun*, v. 177: 192-201

Corey SJ, Burkhardt AL, Bolen JB, Geahlen RK et al. (1994) Granulocyte colony-stimulating factor receptor signaling involves the formation of a three-component complex with Lyn and Syk protein-tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 91: 4683-4687

Cosio BG, Torrego A, Adcock IM. (2005) Molecular mechanisms of glucocorticoids. *Arch Bronconeumol.*, v. 41(1):34-41

Cox G, Crossley J, and Xing Z (1995). Macrophage engulfment of apoptotic neutrophils contributes to the resolution of acute pulmonary inflammation in vivo. *Am J Resp Cell Mol Biol.*, v. 12:232–237

Cox G (1996). (IL-10) enhances resolution of pulmonary inflammation in vivo by promoting apoptosis of neutrophils. *American Journal of Physiology*, v. 271:L566–L571.

Cunha FQ, Ferreira SH. (1986) The release of a neutrophil chemotactic factor from peritoneal macrophages by endotoxin: inhibition by glucocorticoids. *Eur J Pharmacol.*, v. 23;129(1-2):65-76

Dahms NM, Lobel P and Kornfeld S. (1989) Mannose 6-phosphate receptors and lysosomal enzyme targeting. *J. Biol. Chem.*, v. 264: 12115–12118

Delclaux C, Delacourt C, D'Ortho MP, Boyer V. et al. (1996) Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, v. 14: 288–295

Detmers PA, Zhou D, Powell D, Lichenstein H. (1995) Endotoxin receptors (CD14) are found with CD16 (Fc gamma RIII) in an intracellular compartment of neutrophils that contains alkaline phosphatase. *J. Immunol.*, v. 155: 2085–2095

Deuel TF, Senior RM, Chang D, Griffin GL. et al. (1981) Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 78: 4584-4587

Dias-Baruffi M, Cunha FQ, Ferreira SH, Roque-Barreira MC. (1993) Macrophage released neutrophil chemotactic factor (MNCF) induces PMN-neutrophil migration through lectin-like activity. *Agents actions.*, v.38: C54

Dias-Baruffi M, Roque-Barreira MC, Cunha FQ, Ferreira SH. (1995) Biological characterization of a homogeneous fraction of purified macrophage-derived-neutrophil-chemotactic-factor. *Mediators inflammation.*, v. 4: 55-57

Dias-Baruffi M, Roque-Barreira MC, Cunha FQ, Ferreira SH. (1995) Isolation and partial chemical characterization of macrophage-derived-neutrophil-chemotactic-factor. *Mediators inflammation.*, v. 4: 52-54

Dias-Baruffi M. (1999) Novos aspectos da caracterização da lectina de origem macrofágica, MNCF: Produção por linhagem de macrófagos de camundongo, analogia com proteínas conhecidas e ligação à superfície de neutrófilos e à laminina. Rib. Preto (Tese-Doutorado, FMRP-USP)

Dibbert B, Weber M, Nikolaizik WH, Vogt P. et al. (1999). Cytokine-mediated Bax deficiency and consequent delayed neutrophil apoptosis: A general mechanism to accumulate effector cells in inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96:13330–13335

Dimitrijevic I, Axelsson L, Andersson T. (2002) The adhesion receptor CD31 can be primed to rapidly adjust the neutrophil cytoskeleton. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 292: 1092-1097

Direnzo M, Pasqui AL, Chiarion C, Carducci A, Auteri A. (1994) The in vitro effect of 2 glucocorticoids on some lymphomonocyte and neutrophil functions. *Int. J. Immunother.* v. 10: 103-112

Doherty DE, Haslett C, Tonnesen MG, Henson PM. (1987) Human monocyte adherence: a primary effect of chemotactic factors on the monocyte to stimulate adherence to human endothelium. *J.Immunol*, v. 138: 1762-1771

Drost EM. & MacNee W. (2002) Potential role of IL-8, platelet-activating factor and TNF-alpha in the sequestration of neutrophils in the lung: effects on neutrophil deformability, adhesion receptor expression, and chemotaxis. *J. Immunol.* v. 32:393-403

Dusi S, Donini M, Rossi F. (1994a) Tyrosine phosphorylation and activation of NADPH oxidase in human neutrophils: a possible role for MAP kinases and for a 75 kDa protein. *Biochem J*, v. 304: 243-250

Dusi S, Donini M, Della Bianca V, Rossi F. (1994b) Tyrosine phosphorylation of phospholipase Cgamma2 is involved in the activation of phosphoinositide hydrolysis by Fc receptors in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 201: 1100-1108

Egesten J, Breton-Gorius J, Guichard U, Gullberg, Olsson I. (1994) The heterogeneity of azurophil granules in neutrophil promyelocytes: immunogold localization of myeloperoxidase, cathepsin G, elastase, proteinase 3, and bactericidal/permeability increasing protein. *Blood*, v. 83: 2985–2994

Faccioli LH, Souza GE, Cunha FQ, Poole S, Ferreira SH. (1990). Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration “in vivo” by indirect mechanisms. *Agents Actions*, v. 30(3-4): 344-349

Fadok VA, Warner ML, Bratton DL, and Henson PM (1998a). CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor (alpha v beta 3). *J Immunol.*, v. 161:6250–6257

Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW. et al.(1998b). Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest.*, v. 101:890–898

Fassbender K, Kaptur S, Becker P, Groschel J et al. (1999) Inverse association between endogenous glucocorticoid secretion and S-selectin (CD62L) expression in trauma patients. *Life Sci.* v. 65 (23):2471-2480

Faubion WA, Gores GJ. (1999) Death receptors in liver biology and pathobiology. *Hepatology*, v.29:1-4

Faurschou M, Sorensen OE, Johnsen AH, Askaa J and Borregaard N. (2002) Defensin-rich granules of human neutrophils: characterization of secretory properties. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1591: 29–35

Faurschou M & Borregaard N. (2003) Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection*, v.5: 1317-1327

Fecho K, and Cohen PL (1998). Fas ligand (gld)- and Fas (lpr)-deficient mice do not show alterations in the extravasation or apoptosis of inflammatory neutrophils. *J Leukocyte Biol* v. 64:373–383.

Feuk-Lagerstedt E, Jordan ET, Leffler H, Dahlgren C, Karlsson A. (1999) Identification of CD66a and CD66b as the major galectin-3 receptor candidates in human neutrophils. *J Immunol.*, v. 163(10): 5592-5598

Feuk-Lagerstedt E, Samuelsson M, Mosgoeller W, Movitz C et al. (2002) The presence of stomatin in detergent-insoluble domains of neutrophil granule membranes. *J. Leukocyte Biol.*, v. 72: 970–977

Filep JG, Dela-Landre A, Payette Y, Foldes-Filep E (1997) Glucocorticoid receptor regulates expression of L-selectin and CD11/CD18 on human neutrophils. *Circulation.* v. 96: 295-301

Folkesson HG, Matthay MA, Hebert CA, Broaddus VC (1995) Acid aspiration-induced lung injury in rabbits mediated by interleukin-8-dependent mechanisms. *J. Clin. Invest.*, v. 96: 107-116

Ford-Hutchinson AW, Bray MA, Doig MV, Shipley ME, Smith MJH. (1980) Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature*. v. 286: 264-265

Fukushima K, Ando M, Ito K, Suga M, Araki S. (1990) Stimulus and cumulative dose-dependent inhibition of O²⁻ production by polymorphonuclear leukocytes of patients receiving corticosteroids. *J. Clin. Lab. Immunol.*, v. 33: 117-123

Gaudry M, Roberge CJ, de Medicis R, Lussier A et al. (1993) Crystal induced neutrophil activation : III. Inflammatory microcrystals induce a distinct pattern of tyrosine phosphorylation in human neutrophils. *J Clin Invest* v. 91 : 1649-1655

Gaudry M, Gilbert C, Barabe F, Poubelle PE, Naccache PH. (1995) Activation of Lyn is a common element of the stimulation of human neutrophils by soluble and particulate stimuli. *Blood*, v. 86 : 3567-3574

Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME et al. (2002) The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol. Cell*, v.10:1033–1043

Gomez-Cambronero J, Colasanto JM, Huang CK, Sha'afi RI. (1993) Direct stimulation by tyrosine phosphorylation of microtubule-associated protein (MAP) kinase activity by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in human neutrophils. *Biochem J*, v. 291 : 211-217

Gomez-Cambronero J, Huang CK, Bonak VA et al. (1989) Tyrosine phosphorylation in human neutrophil. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 162 : 1478-1485

Gomez-Cambronero J, Wang E, Johnson G, Huang CK, Sha'afi RI (1991) Platelet activating factor induces tyrosine phosphorylation in human neutrophils. *J Biol Chem*, v. 266 : 6240-6245

Gomez-Cambronero J, Huang CK, Gomez-Cambronero TM, Waterman WH et al. (1992) Granulocyte macrophage colony stimulating factor induced protein phosphorylation of microtubule associated protein kinase in human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 89 : 7551-7555

Gosset P, Tonnel AB, Joseph M, Prin L et al. (1984) Secretion of a chemotactic factor for neutrophils and eosinophils by alveolar macrophages from asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol*, v. 74: 827-834

Goulding NJ, Euzger HS, Butt SK, Perretti M. (1998) Novel pathways for glucocorticoid effects on neutrophils in chronic inflammation. *Inflamm Res. Suppl* v.3:S158-165

Griffin JD, Spertini O, Ernst J, Belvin MP et al. (1990) Granulocyte-macrophage colony-stimulated factor and other cytokines regulate surface expression of the leukocyte adhesion molecule-1 on human neutrophils, monocytes, and their precursors. *J. Immunol.*, v. 145: 576-584

- Grinstein S, Furuya W. (1992) Chemoattractant-induced tyrosine phosphorylation and activation of microtubule-associated protein kinase in human neutrophils. *J Biol Chem*, v. 267: 18122-18125
- Hafezi-Moghadam A, Thomas KL, Prorock AJ, Huo Y, Ley K. (2001) L-selectin shedding regulates leukocyte recruitment. *J. Exp. Med.*, v. 193 (7): 863-872
- Hamada F, Aoki M, Akiyama T, Toyoshima K. (1993) Association of immunoglobulin G Fc receptor II with Src-like protein kinase Fgr in neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 90: 6305-6309
- Hendey B, Lawson M, Marcantonio EE, Maxfield FR. (1996) Intracellular calcium and calcineurin regulate neutrophil motility on vitronectin through a receptor identified by antibodies to av and b3. *Blood*, v. 87: 2083-2048
- Hickey MJ, Forster M, Mitchell D, Kaur J et al. (2000) L-selectin facilitates emigration and extravascular locomotion of leukocytes during acute inflammatory responses *in vivo*. *J.Immunol.* v.165:7164-7170
- Hirasawa N, Watanabe M, Mue S, Watanabe K et al. (1992) Induction of neutrophil infiltration by rat chemotactic cytokine (CINC) and its inhibition dexamethasone in rats. *Inflammation*, v. 16: 187-196
- Hollenberg SM, Weinberger MC, Ong ES, Cerelli G et al. (1985) Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature*, v. 315: 635-641
- Howard TH and Meyer WH. (1984). Chemotactic peptide modulation of actin assembly and locomotion in neutrophils. *J Cell Biol.*, v.98: 1265-1271
- Huang CK, Laramee GR, Casnellie JE. (1975) Chemotactic factor-induced tyrosine phosphorylation of membrane-associated proteins in rabbit peritoneal neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 151: 794-801
- Huang CK, Bonak V, Laramee GR, Canellie JE. (1990) Protein tyrosine phosphorylation in rabbit peritoneal neutrophils. *Biochem J*, v. 269: 431-436
- Huber AR, Kunkel SL, Todd RF, Weiss JS (1991) Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science*, v. 254: 99-102
- Issekutz AC (2003) Removal of gram negative endotoxin from solution by affinity chromatography. *J Immunol Meth*, v. 61: 275-281
- Jabado N, Jankowski A, Dougaparsad S, Picard V et al. (2000) Natural resistance to intracellular infections: natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nrampl) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane *J. Exp. Med.*, v. 192: 1237-1248

Jesaitis AJ, Buescher ES, Harrison D, Quinn MT et al. (1990) Ultrastructural localization of cytochrome *b* in the membranes of resting and phagocytosing human granulocytes. *J. Clin. Invest.*, v. 85: 821–835

Joiner KA, Ganz T, Albert J and Rotrosen D The opsonizing ligand on *Salmonella typhimurium* influences incorporation of specific, but not azurophil, granule constituents into neutrophil phagosomes. *J. Cell Biol.*, v. 109: 2771–2782

Jonat C, Rahmsdorf HJ, Park KK, Cato AC et al. (1990) Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell.*, v. 62(6):1189-204

Joseph BZ, Beam R, Martin RJ, Borish L (1995) Prednisone inhibits leukocyte granule secretion into the asthmatic airway. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, v. 8: 23-30

Kang T, Yi J, Guo A, Wang X et al. Subcellular distribution and cytokine- and chemokine-regulated secretion of leukolysin/MT6-MMP/MMP-25 in neutrophils. *J. Biol. Chem.*, v. 276: 21960–21968

Karlsson A, Follin P, Leffler H, Dahlgren C. (1998). Galectin-3 activates the NADPH-oxidase in exudate but not peripheral blood neutrophils. *Blood*, v.91: 3430-3438

Kasama T, Strieter RM, Standiford TJ, Burdick MD, Kunkel SL. (1993) Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 alpha. *J Exp Med*, v. 178: 63-72

Kasama T, Strieter RM, Lukacs NW, Burdick MD, Kunkel SL. (1994) Regulation of neutrophil-derived chemokine expression by IL-10. *J Immunol.*, v. 152: 3559-3569

Kay AB. (1970) Studies on eosinophils leucocyte migration. I. Eosinophils and Neutrophils accumulation following Antigen-Antibody reactins in Guinea-Pig Skin. *Clin. Exp. Immunol*, v. 6:75-86

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. (1972) Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.*, v. 26 (4):239-357

Kiener PA, Rankin BM, Burkhardt AL, Schieven GL et al. (1993) Cross-linking of Fcγ receptor I (FcγRI) and receptor II (FcγRII) on monocytic cells activates a signal transduction pathway common to both Fc receptors that involves the stimulation of p72 Syk protein tyrosine kinase. *J Biol Chem*, v. 268: 24442-24448

Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL, Butcher EC. (1989) Neutrophil Mac-1 and Mel-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science*, v. 245:1238-1241

Kjeldsen L, Bjerrum OW, Askaa J and Borregaard N (1992) Subcellular localization and release of human neutrophil gelatinase, confirming the existence of separate gelatinase-containing granules. *Biochem. J*, v. 287: 603–610

- Klebanoff SL (1999) Myeloperoxidase. *Proc. Assoc. Am. Physicians*, v. 111: 383–389
- Knall C, Young S, Nick JA, Buhl AM et al. (1996) Interleukin-8 regulation of the Ras/Raf/mitogen activated protein kinase pathway in human neutrophils. *J Biol Chem*, v. 271: 2832-2838
- Konstantopoulos K. and McIntire LV. (1996) Effects of fluid dynamics on vascular cell adhesion. *J. Clin. Invest.*, v. 98: 2661-2665
- Kurihara K, Wardlaw AJ, Moqbel R, Kay AB. (1989) Inhibition of platelet-activating factor (PAF)-induced chemotaxis and PAF binding to human eosinophils and neutrophils by the specific ginkgolide-derived PAF antagonist. BN 52021. *J. Allergy Clin. Immunol.* v. 83: 83-90
- Kutsuna H, Kenichi S, Kamata N, Kato T et al. (2004). Actin reorganization and morphological changes in human neutrophils stimulated by TNF, FM-CSF, and G-CSF: the role of MAP kinases. *Am J Physiol Cell Physiol*, v. 286: 55-64
- Laudanna C, Constantin G, Baron P, Scarpini E (1994) Sulfatides trigger increase of cytosolic free calcium and enhanced expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-8 mRNA in human neutrophils. Evidence for a role of L-selectin as a signaling molecule. *J. Biol. Chem*, v. 269: 4021–4026
- Lauffenburger DA. and Horwitz AF. (1996) Cell migration: A physically integrated molecular process. *Cell.*, v. 84: 359-369
- Lawrence MB. and Springer TA. (1991) Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: Distinction and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell*, v. 65: 859-873
- Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. (1998). Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res*, v. 74: 49-139
- Ley K, Gachtgens P, Fennie M, Singer S et al. (1991) Lectin-like cell adhesion molecule 1 mediates leukocyte rolling in mesenteric venules *in vivo*. *Blood*, v 77:2553-2555
- Liang L, Huang CK. (1995) Tyrosine phosphorylation induced by cross-linking of Fc gamma receptor type II in human neutrophils. *Biochem J*, v. 306: 489-495
- Llewellyn-Jones CG, Hill SL, Stockley RA. (1994) Effects of fluticasone propionate on neutrophil chemotaxis, superoxide, superoxide generation, and extracellular proteolytic activity *in-vitro*. *Thorax* v. 49: 207-212
- Lloyd AR, Oppenheim JJ. (1992) Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. *Immunol Today*, v. 13: 169-172
- Loike JD, Cao L, Budhu S, Marcantonio EE et al. (1999) Differential regulation of beta 1 integrins by chemoattractants regulates neutrophil migration through fibrin. *J. Cell Biol.*, v. 144: 1047-1056

- Lomas DA, Ip M, Chamba A, Stockley RA. (1991) The effect of in vitro and in vivo dexamethasone on human neutrophil function. *Agents Actions*, v. 33: 279-285
- Lucas R, Magez S, Leys R, Fransen L et al. (1994) Mapping the lectin-like activity of tumour necrosis factor. *Science*, v. 263: 814-817
- McCull SR, DiPersio JF, Caon AC, Ho P, Naccache PH. (1991) Involvement of tyrosine kinases in the activation of human peripheral blood neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*, v. 78: 1842-1852
- Macever RP. And Cummings RD. (1997) Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J. Clin. Invest.*, v. 100: 485-492
- Martin-Padura I, Lostaglio S, Shneemann M, Williams L et al. (1988) Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J. Cell Biol.*, v. 142: 117-127
- Matsumoto T, Yokoi K, Mukaida N, Harada A et al. (1997) Pivotal role of interleukin-8 in the acute respiratory distress syndrome and cerebral reperfusion injury. *J. Leukoc. Biol.*, v. 62: 581-587
- Mianki S, Hamasaki Y, Yamamoto S, Miyazaki S. (1996) Inhibition by dexamethasone of the lipopolysaccharide-induced increase in IL-6 messenger-RNA abundance and IL-6 production in human polymorphonuclear leukocytes. *Int. Immunopathol. Pharmacol.* v. 18: 339-346
- Michaelson D, Rayner J, Couto M and Ganz T (1992) Cationic defensins arise from charge-neutralized propeptides: a mechanism for avoiding leukocyte autotoxicity?. *J. Leukocyte Biol.*, v.51: 634-639
- Middleton J, Neil S, Wintle J, Clark-Lewis I et al. (1997) Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell*, v. 91: 385-395
- Miki H, Mio T, Nagai S, Hoshino Y et al. (2000) Glucocorticoid-induced contractility and F-actin content of human lung fibroblasts in three-dimensional culture. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, v. 278(1): L13-L18
- Mirnic ZK, Calafat J, Udby L, Lovelock J et al. (2002) Identification of the presenilins in hematopoietic cells with localization of presenilin 1 to neutrophil and platelet granules. *Blood Cells Mol. Dis.*, v. 28: 28-38
- Mollinedo F, Nakajima M, Llorens A, Barbosa E et al. Major co-localization of the extracellular-matrix degradative enzymes heparanase and gelatinase in tertiary granules of human neutrophils. *Biochem. J*, v. 327: 917-923
- Moore KL, Stults NL, Diaz S, Smith DL et al. (1992) Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells. *J. Cell Biol.*, v. 118: 445-456

- Moreno AN. (2002) A Lectina MNCF: cinética da localização em macrófagos, papel na atividade de neutrófilos e mastócitos e mimetização de seu efeito pela lectina vegetal KM⁺. Rib. Preto (Tese-Doutorado, FMRP-USP)
- Moreno AN, Jamur MC, Oliver C, Roque-Barreira MC. (2003) Mast cell degranulation induced by lectins: effect on neutrophil recruitment. *Int Arch Allergy Immunol.* v.132: 221-30
- Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ. (1984) Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr. Rev.*, v. 5: 25-44
- Munck A, Naray Fejes-Toth A. (1992) The ups and downs of glucocorticoid physiology. Permissive and suppressive effects revisited. *Mol. Cell Endocrinol.* v. 90: C1-C4
- Muller WA, Weigl SA, Deng X, Philips DM. (1993) PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J. Exp. Med.*, v. 178: 449-460
- Muller, W.A. (1995) The role of PECAM-1 (CD31) in leukocyte emigration: studies in vitro and in vivo. *J. Leukoc. Biol.*, v. 57: 523-528
- Naccache PH, Jean N, Liao NW, Bator JM et al. (1994) Regulation of stimulated integrin surface expression in human neutrophils by tyrosine phosphorylation. *Blood*, v. 84: 616-624
- Nanda A, Brumell JH, Nordstrom T, Kjeldsen L et al. Activation of proton pumping in human neutrophils occurs by exocytosis of vesicles bearing vacuolar-type H⁺-ATPases. *J. Biol. Chem.*, v. 271:15963–15970
- Nauseef WM, McCormick S and Yi H (1992) Roles of heme insertion and the mannose-6-phosphate receptor in processing of the human myeloid lysosomal enzyme, myeloperoxidase. *Blood*, v. 80: 2622–2633
- Ng-Sikorski J, Andersson R, Patarroyo M and Andersson T (1991) Calcium signaling capacity of the CD11b/CD18 integrin on human neutrophils. *Exp. Cell Res.*, v.195: 504–508
- Newton RA, and Hogg N. (1998). The human S100 protein MRP-14 is a novel activator of the β 2-integrin Mac-1 on neutrophil. *J. Immunol.*, v. 160:1427-1435
- Ohta S, Inazu T, Taniguchi T, Nakagawara G, Yamamura H. (1992) Protein-tyrosine phosphorylation induced by concanavalin A and N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in human neutrophils. *Eur J Biochem*, v. 206: 895-900
- Ohtsuka T, Kaziro Y, Satoh T. (1996) Analysis of the T-cell activation signaling pathway mediated by tyrosine kinases, protein kinase C, and Ras protein, which is modulated by intracellular cyclic AMP. *Biochim Biophys Acta*, v. 1310(2) 223-232
- Ooi CE, Weiss J, Elsbach P, Frangione B and Mannion B (1987) A 25-kDa NH₂-terminal fragment carries all the antibacterial activities of the human neutrophil 60-kDa bactericidal/permeability-increasing protein. *J. Biol. Chem.*, v. 262:14891–14894

Oram JD and Reiter B (1968) Inhibition of bacteria by lactoferrin and other iron-chelating agents. *Biochim. Biophys. Acta*, v.170: 351–365

Palmblad J, Malmsten CL, Uden AM, Radmark O et al. (1981) Leukotriene B₄ is a potent stereospecific stimulator of neutrophil chemotaxis and adherence. *Blood*. v. 58: 658-661

Pang G, Ortega M, Ren ZG, Reeves G, Clancy R. (1997) Autocrine modulation of IL-8 production by sputum neutrophils in chronic bronchial sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* v. 155: 726-731

Parmley RT, Rice WG, Kinkade KM, Gilbert C and Barton JC (1987) Peroxidase-containing microgranules in human neutrophils: physical, morphological, cytochemical, and secretory properties. *Blood*, v. 70: 1630–1638

Patel T, Gores GJ. Apoptosis in liver transplantation: a mechanism contributing to immune modulation, preservation injury, neoplasia, and viral disease. *Liver Transplant Surg*, v. 4:42-50

Perretti M, Flower RJ. (1996) Measurement of lipocortin 1 levels in murine peripheral blood leukocytes by flow cytometry ; modulation by glucocorticoids and inflammation. *Br. J. Pharmacol.* v. 118: 605-610

Peschon JJ, Slack JL, Reddy P, Stocking KL et al. (1998) An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science*, v. 282: 1281-1284

Petroni KC, Shen L, Guyre PM. (1988) Modulation of human polymorphonuclear leukocyte IgG Fc-receptors and Fc-receptor-mediated functions by IFN-gamma and glucocorticoids. *J. Immunol.* v.140: 3467-3472

Pongracz J, Webb P, Wang KQ, Deacon E et al. (1999). Spontaneous neutrophil apoptosis involves caspase 3-mediated activation of protein kinase C-delta. *J Biol Chem*, v. 274:37329–37334

Psychoyos S, Uziel-Fusi S, Bhagwat S, Morrissey MM. (1989) Influence of standard and novel LTB₄ analogs on human neutrophil chemotaxis by multiwell cap assay. *J. Immunol. Methods* v. 124: 189-196

Preece G, Murphy G, Ager A. (1996) Metalloproteinase-mediated regulation of L-selectin levels on leucocytes. *J.Biol.Chem.* v. 271: 11634-11640

Ptasznik A, traynor-Kaplan A, Bokoch GM. (1995) G protein-coupled chemoattractant receptors regulate Lyn tyrosine kinase: Src adapter protein signaling complexes. *J Biol Chem*, v. 270: 19969-19973

Ptasznik A, Prossnitz ER, Yoshikawa D et al. (1996) A tyrosine kinase signaling pathway accounts for the majority of phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate formation in chemoattractant stimulated human neutrophils. *J Biol. Chem*, v. 271: 25204-25207

Rafiee P, Lee JK, Leung CC, Raffin TA. (1995) TNF alpha induces tyrosine phosphorylation of mitogen activated protein kinase in adherent human neutrophils. *J Immunol*, v. 154: 4785-4792

Ray A, Prefontaine KE. (1994) Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 91(2):752-6

Rice WG, Ganz T, Kinkade JM, Selsted ME et al. (1987) Defensin-rich dense granules of human neutrophils. *Blood*, v.70: 757-765

Richard S, Shaw AS, Showell HJ, Connelly PA (1994a) The role of individual Fc gamma receptors in aggregated IgG-stimulated protein tyrosine phosphorylation in the human neutrophil. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 199: 653-661

Richard S, Farrell CA, Shaw AS, Showell HJ, Connelly PA (1994b) C5a as a model for chemotactic factor stimulated tyrosine phosphorylation in the human neutrophil. *J Immunol.*, v. 152: 2479-2487

Roilides E, Uhlig K, Venzon D, Pizzo PA, Walsh TJ. (1993) Prevention of corticosteroid-induced suppression of human polymorphonuclear leukocyte-induced damage of aspegillus-fumigatus hyphae by granulocyte-colony-stimulating factor and gamma-interferon. *Infect. Immun*, v. 61: 4870-4877

Roussel E. and Gingras MC. (1997) Transendothelial migration induces rapid expression on neutrophils of granule-release VLA6 used for tissue infiltration. *J. Leukoc. Biol.*, v. 62: 356-362

Rudack C, Jorg S, Sachse F. (2004) Biologically active neutrophil chemokine pattern in tonsillitis. *Clin Exp Immunol.*, v. 135: 511-518

Saito N, Pulford KA, Breton-Gorius J, Masse JM et al. (1991) Ultrastructural localization of the CD68 macrophage-associated antigen in human blood neutrophils and monocytes. *Am. J. Pathol.*, v. 139: 1053-1059

Salak JL, McGlone JJ, Lyte M. (1993) Effects of in-vitro adrenocorticotrophic hormone, cortisol and human recombinant interleukin-2 on porcine neutrophil migration and luminol-dependent chemiluminescence. *Vet. Immunol. Immunopathol* v. 39: 327-337

Sanchez-Madrid F, del Pozo MA. (1999) Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J.*, v. 18(3):501-511

Sato S, Hughes RC. (1994) Regulation of secretion and surface expression of Mac-2, a galactoside-binding protein of macrophages. *J Biol Chem.*, v. 269(6):4424-30

Savill J (1997). Apoptosis in resolution of inflammation. *J Leukoc Biol* , v.61:375-380

Savill J, Hogg N, Ren Y, and Haslett C (1992). Thrombospondin cooperates with CD36 and the VnR in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J Clin Invest*, v.90:1513–1520

Sasagawa Y, Sakuma S, Higashi Y, Sasakawa T, Amaya T, Goto T. (2000) FK506 suppresses neutrophil chemoattractant production by peripheral blood mononuclear cells. *Eur.J. Pharmacol.* v. 403: 281-288

Sheinman SJ, Reid R, Coulson R, Jones DB, Ford SM (1994) Transepithelial phosphate transport in rabbit proximal tubular cells adapted to phosphate deprivation. *Am J Physiol.*, v. 266:C1609-1618

Schlaghecke R, Beuscher D, Kornely E, Specker C. (1994) Effects of glucocorticoids in rheumatoid arthritis. Diminished glucocorticoid receptors do not result in glucocorticoid resistance. *Arthritis Rheum.*, v. 37: 1127-1131

Sham RL, Phatak PD, Ihne TP, Abboud CN (1993). Packman CH. Signal pathway regulation of interleukin-8-induced actin polymerization in neutrophils. *Blood*, v; 82: 2546-2551

Sekido N, Mukaida N, Harada A, Nakanishi I et al. (1993) Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8. *Nature*, v. 365: 654-657

Sengelov H, Kjeldsen L and Borregaard N. (1993) Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J. Immunol.*, v.150:1535–1543

Sengelov H, Kjeldsen L, Diamond MS, Springer TA and Borregaard N (1993) Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils. *J. Clin. Invest.*, v. 92: 1467–1476

Sengelov H, Kjeldsen L, Diamond MS, Springer TA and Borregaard N (1993) Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha and beta 2) in human neutrophils. *J. Clin. Invest.*, v. 92: 1467–1476.

Sengelov H, Kjeldsen L, Kroeze W, Berger M and Borregaard N (1994) Secretory vesicles are the intracellular reservoir of complement receptor 1 in human neutrophils. *J. Immunol.*, v. 153: 804–810

Sengelov H, Boulay F, Kjeldsen L and Borregaard N (1994) Subcellular localization and translocation of the receptor for *N*-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine in human neutrophils. *Biochem. J*, v.. 299: 473–479.

Sengelov H, Follin P, Kjeldsen L, Lollike K et al. (1995) Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils. *J. Immunol*, v. 154: 4157–4165.

Sengelov, H. (1996) Secretory vesicles of human neutrophils. *Eur. J. Haematol.*, v. 57: 6-24

Simon SI, Burns AR, Taylor AD, Gopalan PK et al. (1995) L-selectin (CD62L) cross-linking signals neutrophil adhesive functions via the Mac-1 (CD11b/CD18) beta2-integrin. *J. Immunol.*, v. 155: 1502-1514

Singer II, Scott S, Kawka DW and Kazazis DM (1989) Adhesomes: specific granules containing receptors for laminin, C3bi/fibrinogen, fibronectin, and vitronectin in human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J. Cell Biol.*, v.109: 3169–3182

Smith CW, Kishimoto TK, Abbass O, Hughes et al. (1991) Chemotactic factors regulated lectin adhesion molecule-1 (LECAM-1) dependent neutrophil adhesion to cytokine-stimulated endothelial cells in vitro. *J. Clin. Invest.*, v. 87: 609-618

Smolen JE, Petersen TK, Koch C, O'Keefe SJ et al. (2000) L-selectin signaling of neutrophil adhesion and degranulation involves p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, v. 275:15876-15884

Snyderman R. and Goetzl EJ. (1981) Molecular and cellular mechanisms of leukocyte chemotaxis. *Science*, v. 213: 830-837

Spertini O, Luscinskas FW, Munro JM, Griffin JD et al (1991) Leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1, L-selectin) interacts with an inducible endothelial cell ligand to support leukocyte adhesion. *J. Immunol.*, v. 147: 2565-2573

Stoolman LM and Rosen SD (1983) Possible role for cell-surface carbohydrate-binding molecules in lymphocyte recirculation. *J. Cell Biol.*, v. 96: 722-729

Strausbaugh HJ, Rosen SD. (2001) A potential role for annexin 1 as a physiologic mediator of glucocorticoid-induced L-selectin shedding from myeloid cells. *J. Immunol.*, v. 166: 6294-6300

Suzuki K, Hino M, Kutsuna H, Hato F et al (2001) Selective activation of p38 mitogen-activated protein kinase cascade in human neutrophils stimulated by IL-1beta *J Immunol.*, v.167(10):5940-7

Tsuji C, Shioya S. (1994) In-vivo effect of methylprednisolone on lipopolysaccharide-induced superoxide production by pulmonary and circulating blood neutrophils in rats. *Circ. Shock*. v. 42: 128-134

Tanida N, Ohno N, Adachi Y, Matsuura M et al. (1992) Modification of immunopharmacological activities of synthetic monosaccharide lipid A analogue, GLA60, by lysozyme. *J. Biochem.*, v. 112: 616–623

Thomas E, Leroux JL, Blotman F, Descomps B, Chavis C. (1995) Enhancement of leukotriene A4 biosynthesis in neutrophils from patients with rheumatoid arthritis after a single glucocorticoid dose. *Biochemical Pharmacology*, v.49: 243-248

Thompson CB. (1999) Apoptosis. In: Paul WE, editor. *Fundamental immunology*. 4. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; p.813-29

Timoshenko AV, Gorudko IV, Maslakova OV, Andre S et al (2003) Analysis of selected blood and immune cell responses to carbohydrate-dependent surface binding of proto- and chimera-type galectins. *Mol Cell Biochem.*, v. 250(1-2):139-49

Toledo KA, Bernardes ES, Baruffi MD, Roque-Barreira MC. (2007) Neutrophil haptotaxis induced by mouse MNCf: interactions with extracellular matrix glycoproteins probably contribute to overcoming the anti-inflammatory action of dexamethasone. *Inflammation Research.*, v. 56 (9): 368-376.

Torres M, Hall FL, O'Neil K. (1993) Stimulation of human neutrophils with formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces tyrosine phosphorylation and activation of two distinct mitogen-activated protein kinases. *J Immunol.*, v. 150: 1563-1577

Turner J, Cho Y, Dinh NN, Waring AJ and Lehrer RI (1998) Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 42: 2206–2214

van den Berg JM, Weyer S, Woening JJ, Roos D, Kerijpers TW. (2001) Divergent effects of tumor necrosis factor-alpha on apoptosis of human neutrophils. *J Leukocyte Biology*, v. 69: 467-473

Vaporciyan AA. (1993) Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-I in neutrophil recruitment in vivo. *Science*, v. 262: 1580-1582

Varki A. (1997) Selectin ligands: Will the real ones please stand up? *J. Clin. Invest.*, v. 99: 158-162

Venturi GM, Tu L, Kadono T, Khan AI et al. (2003) Leukocyte migration is regulated by L-selectin endoproteolytic release. *Immunity*, v.19(5):713-24

Von Andrian UH, Chambers JD, McEvoy LM, Bargatze RF et al (1991) Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: Distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta2-integrins in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 88: 7538-7542

Wadell TK, Fialkow L, Chan CK, Kishimoto TK, Downey GP. (1995) Signaling functions of L-selectin: enhancement of tyrosine phosphorylation and activation of MAP kinase. *J Biol Chem*, v. 270: 15403-15411

Wagner JG. and Roth RA. (2000) Neutrophil migration mechanisms, with emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol. Rev.*, v. 52: 349-374

Walcheck B, Kahn J, Ficher JM, Wang BB et al. (1996) Neutrophil rolling altered by inhibition of L-selectin shedding in vitro. *Nature*, v. 380(6576):720-3

Watson RW, O'Neill A, Brannigen AE, Coffey R et al. (1999). Regulation of Fas antibody induced neutrophil apoptosis is both caspase and mitochondrial dependent. *FEBS Letters*, v. 453:67–71.

Welch H, maridonneau-Parini I. (1997) Hck is activated by opsonized zymosan and A23187 in distinct subcellular fractions of human granulocytes. *J Biol Chem*, v. 272: 102-109

Wertheim WA, Kunker SL, Standiford TJ, Burdick MD et al. (1993) Regulation of neutrophil-derived IL-8-the role of prostaglandin-E2 dexamethasone and IL-4. *J. Immunol.*, v.151: 2166-2175

Wicks IP, Howell ML, Hancock T, Kohsaka H et al. (1995) Bacterial lipopolysaccharide copurifies with plasmid DNA: implications for animal models and human gene therapy. *Hum Gene Ther*, v. 6(3): 317-323

Williams MA and Solomkin JS. (1999) Integrin-mediated signaling in human neutrophil functioning. *J. Leukoc. Biol.*, v. 65: 725-736

Wimley WC, Selsted ME and White SH (1994) Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. *Protein Sci*, v. 3:1362-1373

Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. (2000) Biology of disease. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab. Invest.*, v. 80: 617-653

Worthen GS, Avdi N, Vukajlovich S, Tobias PS. (1992) Neutrophil adherence induced by lipopolysaccharide in vitro. Role of plasma component interaction with lipopolysaccharide. *J. Clin. Invest*, v. 90: 2526-2535

Xing Z, Jodana M, Kirpalani H, Driscoll KE et al. (1994) Cytokine expression by neutrophils and macrophages in vivo: endotoxin induces tumor necrosis factor-alpha, macrophage inflammatory protein-2, interleukin-1 beta, and interleukin-6 but not RANTES or transforming growth factor-beta 1 mRNA expression in acute lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, v.10: 148-153

Yamaoka A, Kuwabara I, Frigeri LG, Liu FT (1995) A human lectin, galectin-3 (epsilon bp/Mac-2), stimulates superoxide production by neutrophils. *J Immunol.*, v.154(7):3479-87

Yan SR, Fumagalli L, Berton G. (1996) Activation of SRC family kinases in human neutrophils: evidence that p58C FGR and p53/56 LYN redistributed to a Triton X 100 insoluble cytoskeletal fraction, also enriched in the caveolar protein caveolin, display an enhanced kinase activity. *FEBS Lett*, v. 380: 198-203

Yan SR, Huang M, Berton G. (1997) Activation of p58 c-fgr and p53/56 lyn in adherent human neutrophils: evidence for a role of divalent cations in regulating neutrophil adhesion and protein tyrosine kinase activities. *J Inflammation*, v. 45: 297-311

Yang D, Chen Q, Chertov O and Oppenheim JJ (2000) Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J. Leukocyte Biol*, v.68: 9-14

Yang D, Chen Q, Schmidt AP, Anderson GM et al. (2000) LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPR1) as a

receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J. Exp. Med.*, v.192: 1069–1074.

Youssef P, Roberts-Thomson P, Ahern M, Smith M. (1995) Pulse methylprednisolone in rheumatoid-arthritis - effects on peripheral-blood and synovial-fluid neutrophil surface phenotype *J. Rheumatol.* v .22: 2065-2071

Zocchi MR, Ferrero E, Leone BE, Rovere P et al. (1996) CD31/PECAM-1-driven chemokine-independent transmigration of human T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, v. 26: 759-767

Zouki C, Quellet S, Filep JG (2000) The anti-inflammatory peptides, antinflammins, regulate the expression of adhesion molecules on human leukocytes and prevent neutrophil adhesion to endothelial cells. *FASEB J.*, v.14(3):572-80

FICHA CATALOGRÁFICA

Toledo, Karina Alves

Da ativação de neutrófilos pela lectina MNCF decorrem transcrição gênica e secreção de mediadores sustentadas em ambiente anti-inflamatório. Ribeirão Preto, 2007.

106 p.: il.; 30 cm

Tese de doutorado em co-tutela, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Roque-Barreira, Maria Cristina

Co-orientadora: Halbwachs-Mecarelli, Lise

MNCF, 2. ativação neutrofilica, 3. glicocorticóides