



ANGÉLICA APARECIDA ANTONIELLIS SILVEIRA

**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO E DE
RHO GTPASES NA ADESÃO DE NEUTRÓFILOS SOB
CONDIÇÕES INFLAMATÓRIAS**

***INVESTIGATION OF THE ROLE OF NITRIC OXIDE AND
RHO GTPASES IN NEUTROPHILS ADHESION UNDER
INFLAMMATORY CONDITIONS***

CAMPINAS

2012



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

ANGÉLICA APARECIDA ANTONIELIS SILVEIRA

**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO E DE RHO GTPASES NA
ADESÃO DE NEUTRÓFILOS SOB CONDIÇÕES INFLAMATÓRIAS**

Orientadora: Dra. Nicola Amanda Conran Zorzetto

***INVESTIGATION OF THE ROLE OF NITRIC OXIDE AND RHO GTPASES IN
NEUTROPHILS ADHESION UNDER INFLAMMATORY CONDITIONS***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a Obtenção do Título de Mestra em Ciências Médicas, na área de concentração em Ciências Biomédicas

Master dissertation presented to the Medical Science Post Graduation Programme of the School of Medicine Science of the University of Campinas to complete an M.Sc in Medical Science, in the concentration area in Biomedical Science

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA ANGÉLICA APARECIDA ANTONIELIS SILVEIRA
E ORIENTADA PELA DOUTORA NICOLA AMANDA CONRAN ZORZETTO

**CAMPINAS
2012**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

Si39i Silveira, Angélica Aparecida Antoniellis, 1987 -
Investigação do papel do óxido nítrico e de Rho
GTPases na adesão de neutrófilos sob condições
inflamatórias / Angélica Aparecida Antoniellis Silveira. --
Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador : Nicola Amanda Conran Zorzetto.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Citocinas. 2. Neutrófilos. 3. Proteínas Rho de
ligação ao GTP. 4. Moléculas de adesão. 5. Inflamação.
I. Zorzetto, Nicola Amanda Conran. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Investigation of the role of nitric oxide and Rho GTPases in neutrophils adhesion under inflammatory conditions.

Palavras-chave em inglês:

Cytokines

Neutrophils

Rho GTP-binding proteins

Adhesion molecules

Inflammation

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Mestra em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Nicola Amanda Conran Zorzetto [Orientador]

Ronei Luciano Mamoni

Alessandra Gambero

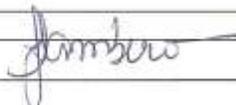
Data da defesa: 20-09-2012

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Angélica Aparecida Antoniellis Silveira

Orientador(a): Prof(a), Dr(a), Nicola Amanda Conran Zorzetto

Membros:	
Professor (a) Doutor (a) Alessandra Gambero -	
Professor (a) Doutor (a) Ronei Luciano Mamoni -	
Professor (a) Doutor (a) Nicola Amanda Conran Zorzetto -	

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

Data: 20/09/2012

*"O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.
Caminhando e semeando, no fim terei o que colher!"*

Cora Coralina

*Aos meus queridos pais Erasmo e Sarita, meus
maiores exemplos, por todo o incentivo em todas
as etapas de minha vida.*

*Ao Leandro, pelo companheirismo em todos os
momentos.*

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível pelo apoio de inúmeras pessoas. A todos manifesto minha gratidão, e de modo especial:

À minha orientadora Nicola Conran, pela oportunidade, orientação, experiência e profissionalismo. Agradeço por toda a confiança depositada em mim desde o princípio, seu incentivo, pela oportunidade de trabalharmos juntas e por todo o aprendizado tanto pessoal quanto profissional que eu obtive ao longo destes dois anos.

À professora Alessandra Gambero, sempre admirada por seus conhecimentos, me mostrou que a vinda para Unicamp e a realização deste mestrado seria um bom caminho a seguir.

Aos meus pais, Erasmo e Sarita, por terem me dado à oportunidade de estudar, por darem o melhor deles por mim durante todos os anos da minha vida até hoje e que por muitas vezes renunciaram aos seus sonhos para que os meus se realizem. Vocês são para mim o melhor exemplo a seguir! Ao meu irmão, Mateus, pelo companheirismo e amizade. Obrigado por serem minha família!

Ao meu namorado, Leandro, pela cumplicidade, dedicação, amor e carinho.

Aos meus queridos e verdadeiros amigos, aos que estão perto e aos que mesmo longe, sei que sempre torcem por mim. Obrigado por fazerem parte da minha vida!

À Daiana e Venina que desde o início deste trabalho me acompanharam, se preocuparam comigo e me apoiaram quando precisei. Obrigada pela amizade sincera e por terem sido grandes companheiras.

À Mariana Lazarini, por estar sempre disposta a me ajudar.

Agradeço a todos do laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro da Unicamp, local em que foi desenvolvida esta pesquisa, e com carinho especial à Venina por me ajudar nos experimentos, dissertações e apresentações e pelo aprendizado que obtive com você durante este período de mestrado.

Aos demais membros do laboratório pela harmonia na convivência diária. À Liciane, Vanessa, Regiane, Flávia Lopes, Camila, Carol Lanaro, Carla, Flavia Leonardo, Ana Flávia, Tatiana, Marília, Thaís, Carol Ayumi, Cíntia, Sheley, Diana, Flávia Pallis, Emília, Dri, Simone, Lena, Telma, Andrey, Pedro, Dul, Dil e Dani.

Agradeço também à equipe da coleta de doadores de sangue do hemocentro da Unicamp, que sempre me acolheu bem e me ajudou na aquisição das amostras.

À Fapesp por financiar este estudo.

Enfim, agradeço a todos que participaram de forma direta ou indiretamente deste estudo e reforço que a contribuição e a presença de vocês foram muito importantes para esta concretização e principalmente a Deus, pois com suas mãos colocou todas essas pessoas no meu caminho, por me dar sempre força e por mais esta conquista.

Este trabalho obteve auxílio científico e financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) durante o período em que foi desenvolvido.



RESUMO

Durante a resposta inflamatória, os neutrófilos e outros leucócitos aderem ao endotélio, deixando os vasos sanguíneos e movimentando-se ativamente em direção ao foco inflamatório. A migração dos neutrófilos para sítios inflamatórios depende de uma série de eventos adesivos e quimiotáticos, resultantes da ativação de moléculas de adesão como as selectinas e integrinas e receptores de quimiocinas. Devido às suas propriedades, os neutrófilos podem ser ativados por proteínas de sinalização intracelular, as Rho GTPases, que auxiliam os neutrófilos a desempenhar esta função por interferirem em mudanças no citoesqueleto. Estas proteínas também estão envolvidas na adesão e proliferação celular. Os neutrófilos são capazes de sintetizar óxido nítrico (NO), sendo que esta produção de NO é um importante componente da resposta imune inata durante a inflamação. Estudos demonstraram que os neutrófilos têm papel indutor na geração de inflamação e esforços visando compreender o mecanismo adesivo destas células nos processos inflamatórios podem ser um ponto chave para intervenções farmacológicas em doenças que são caracterizadas por inflamação vascular com consequente obstrução de fluxo sanguíneo. Diante disso, este estudo objetivou avaliar o papel da via do NO e das Rho GTPases no mecanismo pelo qual os estímulos inflamatórios aumentam a adesão de neutrófilos. Também foi avaliado os efeitos da sinvastatina na modulação das propriedades adesivas de neutrófilos, como ferramenta para auxiliar no estudo do envolvimento das Rho GTPases, Rac1 e RhoA, no processo adesivo destas células. Este mecanismo foi estudado a partir de neutrófilos isolados do sangue periférico por ensaios de adesão estática e em fluxo e citometria de fluxo. Além disso, foi analisada a expressão gênica das Rho GTPases, Rac1 e RhoA, através de PCR em tempo real. Sob potente estímulo de TNF- α , as propriedades adesivas dos neutrófilos aumentam significativamente. Inibidores de NO sintase e doadores de NO não alteraram as propriedades adesivas de neutrófilos quando estimulados com TNF- α . Não observamos grande diferença quanto à adesão e expressão das moléculas de adesão na superfície dos neutrófilos usando inibidor de Rac1, porém o composto Y-27632, inibidor de ROCK (*Rho-associated coiled coil forming protein serine/threonine kinase*), proteína efetora de RhoA, mostrou aumentar a adesão dos neutrófilos sob condições basais. O uso da sinvastatina modulou as propriedades adesivas e a expressão de Mac-1 nos

neutrófilos na presença de um estímulo inflamatório, apoiando evidências de seu uso como anti-inflamatório. Em destaque foi observado que o Y-27632 reverteu o efeito da sinvastatina sob estímulo de TNF- α e que o mevalonato e os isoprenóides intermediários da via do colesterol, GGPP e FPP, não foram capazes de reverter o efeito da sinvastatina. Dados indicam que a via de sinalização dependente em NO-GMPc aparentemente não modula as propriedades adesivas dos neutrófilos sob condições inflamatórias. Por outro lado, resultados indicam que as Rho GTPases parecem estar envolvidas na regulação das propriedades adesivas dos neutrófilos sob condições inflamatórias. O envolvimento de ROCK na adesão celular ainda não está completamente compreendido, mas de acordo com nossos resultados podemos sugerir a hipótese de que esta enzima efetora tenha um papel na indução de adesão dos neutrófilos na presença de um estímulo inflamatório. A sinvastatina foi capaz de inibir as propriedades adesivas de neutrófilos quando ativados indicando mais uma utilidade desta classe de drogas no tratamento de doenças inflamatórias. O papel das Rho GTPases nas propriedades adesivas dos neutrófilos sob condições inflamatórias ainda precisa ser melhor elucidado.

ABSTRACT

During the inflammatory response, neutrophils and other leukocytes adhere to the endothelium leaving the blood vessels and actively moving towards the inflammatory focus. The migration of neutrophils to inflammatory sites depends on a variety of chemotactic and adhesive events resulting from the activation of adhesion molecules such as selectins and integrins and chemokine receptors. Due to its properties, neutrophils may be activated by small intracellular signaling proteins, the Rho GTPases, which help neutrophils to fulfill this function by interfering in cytoskeletal changes. These proteins are also involved in cell adhesion and proliferation. The neutrophils are able to synthesize nitric oxide (NO), and this production of NO is an important component of innate immunity during inflammation. Studies have shown that neutrophils play a role in inducing inflammation and generation of efforts to understand the adhesive mechanism exerted by neutrophils in inflammatory processes may be a key point for pharmacological interventions for diseases that are characterized by vascular inflammation with consequent obstruction of blood flow. Thus, this study aimed to evaluate the role of the NO pathway and the Rho GTPases in the mechanism by which inflammatory stimuli increases neutrophil adhesion. We also assessed the effects of simvastatin on neutrophil adhesive properties as a tool to aid in studying the involvement of Rho GTPases, RhoA and Rac1 in these mechanisms. Neutrophils were isolated from peripheral blood and aspects of adhesion studied by static and flow adhesion assays as well as flow cytometry. In addition, we analyzed the gene expression of Rho GTPases, Rac1 and RhoA by real time - PCR. Following a strong stimulation with TNF- α , the adhesive properties of neutrophils increase significantly. NO synthase inhibitors and NO donors did not modify the adhesive properties of neutrophils when stimulated with TNF- α . We did not observe any significant differences in the adhesion of neutrophils and the expression of adhesion molecules on their surface in the presence of a Rac1 inhibitor. However, an inhibitor of ROCK (*Rho-associated coiled coil forming protein serine/threonine kinase*, an effector protein for the RhoA), Y-27632, was shown to increase the adhesion of neutrophils under basal conditions. The use of simvastatin decreased adhesive properties and modulated the expression of Mac-1 of neutrophils in the presence of an inflammatory stimulus, supporting the use of this class of

drugs as anti-inflammatory agents. Importantly, the attenuating effects of simvastatin on TNF- α stimulated neutrophil adhesion were reversed by Y-27632, whereas the cholesterol pathway intermediates, mevalonate, and the isoprenoids, GGPP FPP, were unable to reverse the effects of this drug. Data indicate that the NO-cGMP signaling pathway does not appear to modulate the adhesive properties of neutrophils under inflammatory conditions. Moreover, results suggest that Rho GTPases may be involved in the regulation of the adhesive properties of neutrophils. The involvement of ROCK in cellular adhesion is not yet fully understood but, according to our findings, it may be hypothesized that this protein effector has a role in the induction of neutrophil adhesion. Simvastatin was able to inhibit the adhesive properties of neutrophils when activated, indicating another use of this class of drugs for the treatment of inflammatory diseases. The role of Rho GTPases in the adhesive properties of neutrophils under inflammatory conditions should be further elucidated.

LISTA DE ABREVIATURAS

BAC - beta actina

BSA - albumina sérica bovina

DMSO - dimetilsulfóxido

DPOC - doença pulmonária obstrutiva crônica

FPP - farnesilpirofosfato

FN - fibronectina

GAPs - proteínas ativadoras de GTPases

GCs - guanilato ciclase solúvel

GDIIs - inibidores de dissociação de GDP

GDP - guanosina difosfato

GEFs - fator de troca de guanina-nucleotídeo

GGPP - geranylgeranylpirofosfato

GMPc - guanosina monofosfato cíclica

GTP - guanosina trifosfato

GAPDH - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

HMG-CoA - 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A

HTAB - brometo de amônio hexadeciltrimetil

ICAM-1 - molécula de adesão intercelular

IL - interleucina

kD - kilo Dalton (unidade de medida)

LFA-1 - antígeno funcional linfocitário-1

L-NAME - *N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride*

Mac-1 - antígeno macrofágico 1

MPO - mieloperoxidase

NO - óxido nítrico

NOS - óxido nítrico sintase

PBS - salina tamponada fosfatada

PCR - reação em cadeia da polimerase

RNA - ácido ribonucleic

ROCK - Rho-associated coiled coil forming protein serine/threonine kinase

SNP - nitroprussiato de sódio

TNF- α - fator de necrose tumoral- α

VLA-4 - antígeno muito tardio

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeito de diferentes concentrações de sinvastatina na viabilidade de neutrófilos, de acordo com ensaio de MTT	94
Tabela 2: Expressão das moléculas de adesão celular: CD62L, CD11a e CD11b em neutrófilos tratados com diferentes concentrações de Y-27632.....	101
Tabela 3: Expressão das moléculas de adesão celular: CD62L, CD11a e CD11b em neutrófilos tratados com NSC 23766 na presença e na ausência de TNF- α	102
Tabela 4: Expressão das moléculas de adesão celular: CD62L, CD11a e CD11b em neutrófilos com diferentes concentrações de sinvastatina	103
Tabela 5: Expressão das moléculas de adesão celular: CD62L, CD11a e CD11b em neutrófilos tratados com diferentes concentrações de sinvastatina, sob estímulo inflamatório de TNF- α	104
Tabela 6: Expressão das moléculas de adesão celular: CD62L, CD11a e CD11b em neutrófilos tratados com sinvastatina e com Y-27632, concomitantemente, sob estímulo inflamatório de TNF- α	105

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Sequência dos primers utilizados, tamanho do fragmento amplificado e concentração ótima utilizada para amplificação gênica das Rho GTPases..... 80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Evolução da inflamação (Adaptado Kumar *et al.*, 2005). Resultados da inflamação aguda: resolução, cicatrização por fibrose ou inflamação crônica. 46

Figura 2: Mecanismo de ativação dos neutrófilos a uma resposta inflamatória (Lee & Kubes, 2008). A ligação e rolamento dessas células à camada endotelial são intermediados pelas selectinas e seus ligantes, enquanto que a firme adesão da célula é intermediada principalmente pelas integrinas ativadas por mediadores pró-inflamatórios. A firme adesão permite aos neutrófilos transmigrarem através do endotélio por meio das moléculas de adesão (CAMs) ou por meio de junções celulares pela interação com moléculas de adesão juncional (JAMs). 48

Figura 3: Oxidação da L-Arginina (L-Arg) a L-Citrulina (L-Cit) catalisada pela NOS (Dusse *et al.*, 2005)...... 51

Figura 4: Ciclo de ativação das RhoGTPases (Adaptado Vega & Ridley, 2008). A ligação das Rho GTPases com GTP e subsequente ativação é catalisada por GEFs. Quando ligadas ao GTP interagem com diferentes efetores para executar suas funções. As GAPs promovem a hidrólise de GTP para inativar a proteína. GDIs constituem mais um passo da regulação, o sequestro de proteínas no citoplasma. 55

Figura 5: A via do mevalonato (Adaptado Mason, 2005). Estatinas agem inibindo a enzima HMG-CoA redutase, que por sua vez inibem a biossíntese do colesterol impedindo a formação de isoprenoides intermediários, incluindo o farnesilpirofosfato e geranylgeranylpirofosfato. Geranylgeranyl e farnesil são fixadores lipídicos importantes na modificação pós-translocacional e sinalização de proteínas, como as pequenas GTPases Rho, Rac e Cdc42, e proteínas G. Interferências nestas vias estão por trás de muitos efeitos pleiotrópicos das estatinas. 59

Figura 6: Curva de dissociação do primer da RhoA. 82

Figura 7: Adesão de neutrófilos após incubação com diferentes concentrações de estímulos inflamatórios: IL-8 (A) e TNF- α (B), n=6. Neutrófilos foram incubados por 30 minutos a 37°C, em estufa a 5% CO₂, em placas previamente cobertas com FN (20 μ g/mL). Resultados expressos em média \pm erro da média. **p<0,01; ***p<0,001 comparado ao basal determinado por ANOVA (*repeated measures*) seguido de *Bonferroni Multiple Comparisons Test*. 87

Figura 8: Adesão de neutrófilos após incubação com inibidores de NOS, L-NAME, n=8 (A), e 1400W, n=12 (B); na presença de IL-8 (500 ng/mL) (C e E), n=9 e 15, respectivamente; ou TNF- α (200 ng/mL) (D e F), n=9 e 13, respectivamente. Após os tratamentos neutrófilos foram incubados por 30 minutos a 37°C, em estufa a 5% CO₂, em placas previamente cobertas com FN (20 μ g/mL). Resultados expressos em média \pm erro da média. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 comparado ao basal determinado por ANOVA (*repeated measures*) seguido de *Bonferroni Multiple Comparisons Test*. 89

Figura 9: Adesão de neutrófilos após adição de SNP (10 e 100 μ M) na presença e ausência de TNF- α (200 ng/mL) (n=7). Neutrófilos foram incubados por 30 minutos a 37°C, em estufa a 5% CO₂, em placas previamente cobertas com FN (20 μ g/mL). Resultados expressos em média \pm erro da média. ***p<0,01 comparado com a adesão basal determinado por ANOVA (*repeated measures*) seguido de *Bonferroni Multiple Comparisons Test*. 90

Figura 10: Adesão de neutrófilos após incubação com BAY 41- 2272, n=12 (A); na presença de IL-8 (500 ng/mL), n=3 (B); ou TNF- α (200 ng/mL), n=7 (C). Neutrófilos foram incubados por 30 minutos a 37°C, em estufa a 5% CO₂, em placas previamente cobertas com FN (20 μ g/mL). Resultados expressos em média \pm erro da média. *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001 comparado ao basal determinado por ANOVA (*repeated measures*) seguido de *Bonferroni Multiple Comparisons Test*. 91

Figura 11: Efeito do Y-27632 na adesão de neutrófilos, n=5 (A) e sob estímulo de TNF- α , n=4 (B). Neutrófilos foram incubados por 30 minutos a 37°C, em estufa a 5% CO₂, em placas previamente cobertas com FN (20 μ g/mL). Resultados expressos em média \pm erro da média. **p<0,01; ***p<0,001 comparado com o basal determinado por ANOVA (*repeated measures*) seguido de *Bonferroni Multiple Comparisons Test* comparado ao basal. 92

Figura 12: Adesão de neutrófilos após incubação com NSC-23766, n=15 (A); e sob estímulos inflamatórios com IL-8 (500 ng/mL), n=14 (C); ou de TNF- α (200 ng/mL), n=19 (B). Neutrófilos foram incubados por 30 minutos a 37°C, em estufa a 5% CO₂, em placas previamente cobertas com FN (20 μ g/mL). Resultados expressos em média \pm erro da média. *p<0,05; ***p<0,001 comparado ao basal e ###p<0,001 comparado ao TNF- α determinado por ANOVA (*repeated measures*) seguido de *Bonferroni Multiple Comparisons Test*. 93

Figura 13: Adesão de neutrófilos incubados com sinvastatina (sinv), n=7 (A); e sob estímulo de TNF- α (200 ng/mL), n=7 (B). Neutrófilos foram incubados por 30 minutos a 37°C, em estufa a 5% CO₂, em placas previamente cobertas com FN (20 μ g/mL). Resultados expressos em média \pm erro da média. ***p<0,001 comparado ao basal e ###p<0,001 comparado ao TNF- α determinado por ANOVA (*repeated measures*) seguido por *Bonferroni Multiple Comparisons Test* quando comparado ao TNF- α 95

Figura 14: Adesão de neutrófilos incubados com mevalonato (Mev) (250 μ M), GGPP (10 μ M) e FPP (10 μ M) sob condições basais, n= 3 (A); incubados com sinvastatina (Sinv) (10 μ M) e co-incubados com mevalonato, GGPP e FPP sob estímulo inflamatório de TNF- α (200ng/mL), n=5 (B). Neutrófilos foram incubados por 30 minutos à 37°C, em estufa a 5% CO₂, em placas previamente cobertas com FN (20 μ g/mL). Resultados expressos em média \pm erro da média. ***p<0,001 comparado ao basal; \otimes , p<0,05 comparado a sinvastatina com estímulo de TNF- α determinado por ANOVA (*repeated measures*) seguido de *Bonferroni Multiple Comparisons Test*..... 97

Figura 15: Adesão de neutrófilos de indivíduos saudáveis pré-tratados com sinvastatina (sinv) 10 μ M e co-incubados com Y-27632 (20 μ M) sob estímulo inflamatório de TNF- α (200 ng/mL), n=8 (A) e IL-8 (500 ng/mL), n= 6 (B). Neutrófilos foram incubados por 30 minutos a 37°C, em estufa a 5% CO₂, em placas previamente cobertas com FN (20 μ g/mL). Resultados expressos em média \pm erro da média. ***p<0,001 comparado ao basal; ##p<0,01 comparado ao TNF- α ; $\otimes\otimes$ p<0,01 comparado ao grupo tratado com sinvastatina e TNF- α determinado por ANOVA (*repeated measures*) seguido de *Bonferroni Multiple Comparisons Test*..... 98

Figura 16: Adesão de neutrófilos de indivíduos saudáveis tratados com sinvastatina 10 μ M e co-incubados com L-NAME (1 mM) (A) n= 7; ou 1400W (100 μ M) (B) n= 6; sob estímulo inflamatório de TNF- α (200 ng/mL). Neutrófilos foram incubados por 30 minutos a 37°C, em estufa a 5% CO₂, em placas previamente cobertas com FN (20 μ g/mL). Resultados expressos em média \pm erro da média. **p<0,01; ***p<0,001 determinado comparado ao basal; #p< 0,05; ###p<0,001 quando comparado ao TNF- α determinado por ANOVA (*repeated measures*) seguido de *Bonferroni Multiple Comparisons Test*. 99

Figura 17. Adesão de neutrófilos de indivíduos saudáveis (5x10⁶ células/mL) à FN (20 μ g/mL) por 3 minutos, sob força de cisalhamento de 0,5 d/cm² e 37°C. Neutrófilos foram tratados com sinvastatina (Sinv) (10 μ M) (A); Y-27632 (20 μ M) (B) e co-tratados com sinvastatina e Y-27632 sob estímulo de TNF- α (200 ng/mL) (C), n = 6. O número de células aderidas foi determinado num campo de visão de 94 mm² (265 μ m x 353 μ m). ...100

Figura 18: Expressão relativa dos genes da Rho A e Rac 1, em relação aos genes de BAC e GAPDH (controles endógenos), determinada por PCR quantitativo em tempo real, n= 13. RNAm obtido de neutrófilos de indivíduos saudáveis. Valores expressos em unidades arbitrárias de expressão \pm erro médio padrão.106

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	xi
RESUMO	xv
ABSTRACT	xix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxiii
LISTA DE TABELAS	xxvii
LISTA DE QUADROS.....	xxix
LISTA DE FIGURAS	xxxii
SUMÁRIO.....	xxxvii
1. INTRODUÇÃO	43
1.1. Inflamação - Aspectos Gerais	45
1.2. Os neutrófilos e suas funções.....	46
1.3. Mecanismo de adesão dos neutrófilos	47
1.4. Moléculas de Adesão.....	49
1.5. Óxido Nítrico e a enzima NOS.....	51
1.6. Papel do óxido nítrico na expressão e função das moléculas de adesão.....	52
1.7. Rho GTPases.....	53
1.8. Estatinas.....	57
1.9. Drogas moduladoras da via de sinalização do NO	60
1.10. Drogas moduladoras da via de sinalização de Rho-GTPases	60
1.11. Mediadores Inflamatórios	60
1.11.1. Interleucina 8 (IL-8)	60
1.11.2. Fator de necrose tumoral α (TNF- α).....	61
1.12. Justificativa.....	62
2. OBJETIVOS.....	63
2.1. Objetivo Geral.....	65
2.2. Objetivos Específicos	65
3. CASUÍSTICA E ASPECTOS ÉTICOS	67
3.1. Voluntários.....	69
3.2. Aspectos éticos da pesquisa	69
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	71
4.1. Materiais.....	73
4.2. Métodos.....	73
4.2.1. Separação de neutrófilos do sangue periférico.....	73
4.2.2. Contagem de neutrófilos do sangue periférico	73
4.2.3. Determinação da viabilidade e pureza.....	74

4.2.4. Tratamento de neutrófilos com drogas moduladoras da via do NO-GMPc e de Rho GTPases e mediadores inflamatórios.....	74
4.2.5. Ensaio de adesão estática <i>in vitro</i>	75
4.2.6. Ensaio de adesão em fluxo – Sistema <i>Cellix VenaFlux™</i>	76
4.2.7. Ensaio de viabilidade celular usando MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; <i>Thiazolyl blue</i>).....	77
4.2.8. Citometria de fluxo.....	78
4.2.9. PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR).....	79
4.2.9.1. Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA).....	79
4.2.9.2 Desenho dos primers para qRT-PCR, Padronização das Reações e Eficiência da Reação.....	79
4.2.9.3. Técnica da reação da cadeia polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR).....	81
4.2.9.4. Análise dos dados da qRT-PCR.....	82
4.3. Análise estatística.....	83
5. RESULTADOS.....	85
5.1. Efeito dos estímulos inflamatórios na adesão dos neutrófilos.....	87
5.2. Avaliação do papel da via de sinalização dependente de óxido nítrico no mecanismo de adesão de neutrófilos sob estímulos inflamatórios.....	88
5.2.1. Efeito dos inibidores de NOS na adesão de neutrófilos na presença e ausência de estímulos inflamatórios.....	88
5.2.2. Efeito do doador de NO, nitroprussiato de sódio, nas propriedades adesivas dos neutrófilos sob estímulo inflamatório de TNF- α	90
5.2.3. Efeito do estimulador de guanilato ciclase, BAY 41-2272 na adesão de neutrófilos sob estímulos inflamatórios.....	90
5.3. Avaliação do papel das Rho GTPases no mecanismo de adesão dos neutrófilos sob estímulos inflamatórios.....	91
5.3.1. Efeito do inibidor de ROCK, Y-27632, na adesão de neutrófilos sob estímulos inflamatórios.....	91
5.3.2. Efeito do inibidor de Rac1, NSC 23766, na adesão de neutrófilos sob estímulos inflamatórios.....	92
5.4. Efeito da sinvastatina nas propriedades adesivas dos neutrófilos na presença e na ausência de estímulos inflamatórios.....	93
5.4.1. Efeito da sinvastatina na viabilidade celular.....	93
5.4.2. Efeito da sinvastatina nas propriedades adesivas dos neutrófilos na presença e ausência de estímulos inflamatórios.....	94
5.4.3. Efeito do mevalonato, GGPP e FPP na inibição adesão de neutrófilos pela sinvastatina na presença de TNF- α	96
5.4.4. Efeito da sinvastatina e do Y-27632 na adesão de neutrófilos sob condições inflamatórias.....	97

5.4.5. Efeito da sinvastatina e dos inibidores de NOS, L-NAME ou 1400W, na adesão de neutrófilos sob estímulo inflamatório do TNF- α	99
5.5. Efeito da sinvastatina e do Y-27632, na adesão de neutrófilos, na ausência e na presença de TNF- α , sob condições de fluxo	99
5.6. Avaliação da expressão, na superfície de neutrófilos, das moléculas de adesão L-selectina, LFA-1 e Mac-1 por citometria de fluxo	101
5.6.1. Efeito do Y-27632 na expressão das moléculas de adesão L-selectina, LFA-1 e Mac-1.....	101
5.6.2. Efeito do NSC23766 na expressão das moléculas de adesão L-selectina, LFA-1 e Mac-1 na ausência e na presença de TNF- α	102
5.6.3. Efeito da sinvastatina na ausência e na presença de estímulo inflamatório na expressão das moléculas de adesão L-selectina, LFA-1 e Mac-1.....	102
5.6.4 Efeito da sinvastatina e do Y-27632, na presença de estímulo inflamatório, na expressão das moléculas de adesão L-selectina, LFA-1 e Mac-1.....	104
5.7. Expressão gênica de Rho A e Rac 1 em neutrófilos determinada por PCR quantitativa em tempo real.....	105
6. DISCUSSÃO	107
7. CONCLUSÃO	115
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119
9. APÊNDICES	133
APÊNDICE I.....	135
APÊNDICE II.....	137
APÊNDICE III.....	139
APÊNDICE IV.....	141

1. INTRODUÇÃO

1.1. Inflamação - Aspectos Gerais

A inflamação é um conjunto de interações de fatores solúveis e celulares que surgem nos tecidos em resposta a processos traumáticos, infecciosos, lesivos ou auto-ímmunes, levando a uma reação de defesa do organismo (Nathan, 2002). No local da lesão tecidual, esta reação do organismo envolve fenômenos vasculares, como vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, e fenômenos celulares, como a infiltração celular, que decorrem da liberação de mediadores químicos no local da lesão, como por exemplo, citocinas, prostaglandinas, leucotrienos, histamina entre outros (Ferencík & Stvrtinová, 1996; Nathan, 2002; Medzhitov, 2008).

Uma das principais características da resposta inflamatória é representada pelo recrutamento de células, como os leucócitos. As citocinas têm efeitos importantes sobre as propriedades adesivas do endotélio, fazendo os leucócitos circulantes aderir às células endoteliais dos vasos sanguíneos e migrarem por elas para o local da inflamação, uma vez atraídos por quimiocinas. A resposta à inflamação aguda ocorre em minutos ou horas e envolve o influxo principalmente dos neutrófilos. Por outro lado, a inflamação crônica é caracterizada como uma resposta que se estende continuamente, com um processo ativo, destruição dos tecidos e reparação dos mesmos (Figura 1). Todos estes mecanismos ocorrem simultaneamente e envolvem o influxo de outros leucócitos, como os monócitos do sangue, macrófagos teciduais e linfócitos (Alcaide *et al.*, 2009).

O recrutamento dos neutrófilos é um episódio comum nas inflamações tanto para aquelas que ocorrem como uma consequência da invasão tecidual por microrganismos, como aquelas causadas por distúrbios imunes ou tecidos lesados (Henson *et al.*, 1987; Kadl & Leitinger, 2005). Essas condições incluem muitas doenças inflamatórias humanas tais como colite ulcerativa, artrite reumatóide, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e também algumas dermatites como psoríase ou algumas vasculites. Nessas doenças não infecciosas, os neutrófilos desempenham um papel essencial no tecido danificado, entretanto, um recrutamento excessivo de células inflamatórias ou ativação de células inapropriadas leva ao desenvolvimento de inflamação crônica e favorece a fibrose e, mais tardiamente, a perda da função orgânica (Weiss, 1989).

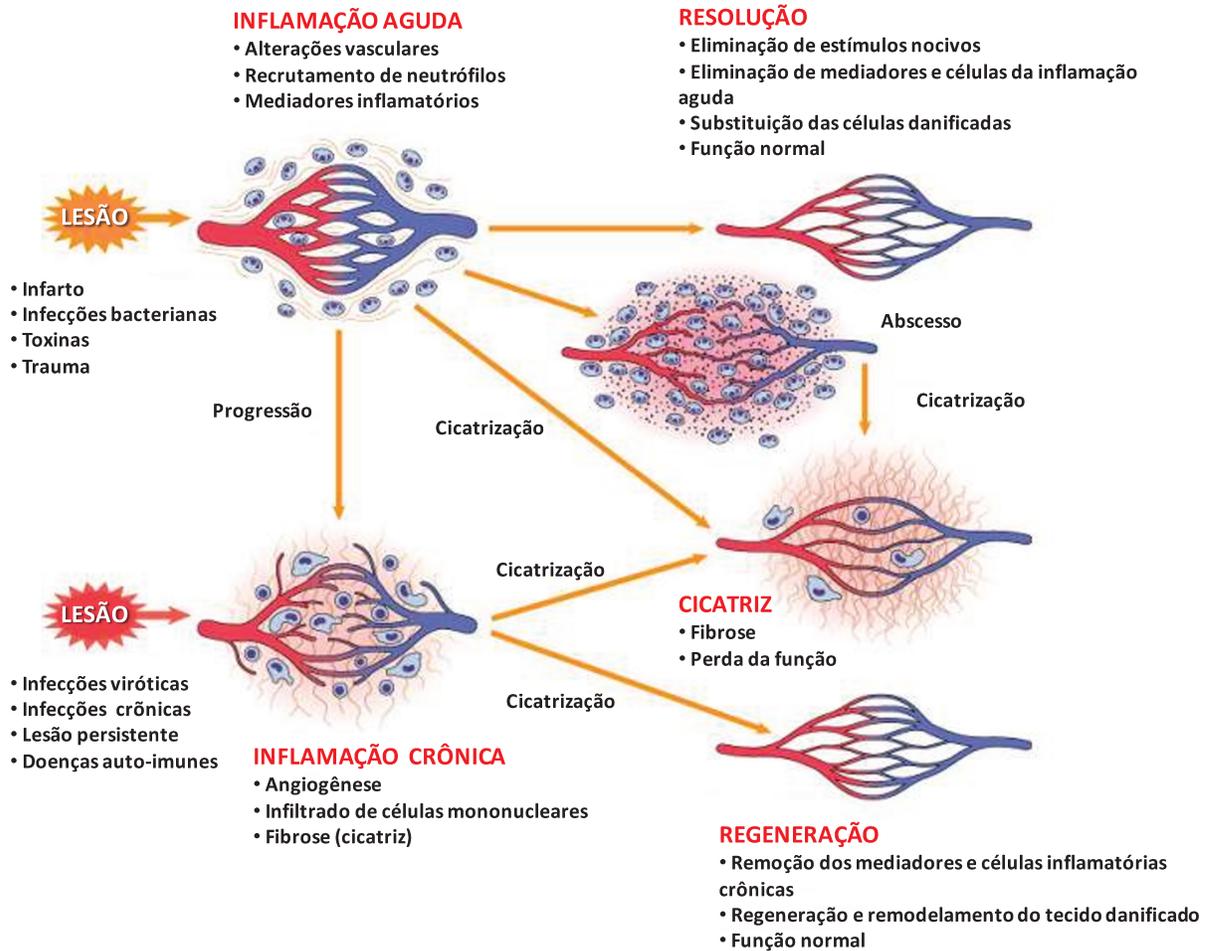


Figura 1: Evolução da inflamação (Adaptado Kumar *et al.*, 2005). Resultados da inflamação aguda: resolução, cicatrização por fibrose ou inflamação crônica.

1.2. Os neutrófilos e suas funções

Os neutrófilos são os mais abundantes leucócitos, são produzidos na medula óssea e circulam no sangue por poucas horas antes de serem seletivamente recrutados para tecidos lesionados por infecções, traumas, reações autoimunes ou sofrerem apoptose (Zarbock & Ley, 2009).

Os neutrófilos participam da primeira linha de defesa do organismo, desencadeando um papel central na resposta imune inata (Nathan, 2006). Estas células são participantes cruciais no processo inflamatório devido a sua rápida ativação e resposta ao estímulo quimiotático. Os neutrófilos especializados em fagocitose são capazes de fagocitar micro-

organismos devido à formação de fagossomos por meio da ligação da membrana com o citoesqueleto, onde os micro-organismos são digeridos por proteases e são destruídos (Valerius *et al.*, 1981). A ativação dos neutrófilos por diferentes estímulos produz mudanças no citoesqueleto de actina, e acredita-se que as Rho GTPases como Rac, Rho e Cdc42, proteínas de sinalização intracelular, desempenham um papel essencial nestas mudanças (Scita *et al.*, 2000).

Além do seu envolvimento em doenças inflamatórias, atualmente há um grande interesse no papel da ativação e adesão dos leucócitos às células endoteliais, pois estes eventos podem induzir um processo inflamatório vascular que resultam em disfunção endotelial e obstrução de vasos observado em doenças vasculares, como as associadas à anemia falciforme e aterosclerose.

1.3. Mecanismo de adesão dos neutrófilos

Nas proximidades de uma lesão inflamatória, os neutrófilos deixam os vasos sanguíneos e movimentam-se ativamente em direção ao foco inflamatório onde aderem ao endotélio. De uma maneira simplificada, este processo de migração dos neutrófilos é ocasionado por uma sequência de eventos incluindo: rolamento, ligação, adesão, polarização e transmigração (Rose *et al.*, 2007; Ley *et al.*, 2007), que são controlados por interações de moléculas de adesão presentes nos neutrófilos e nas células endoteliais ou ligantes na matriz extracelular, como mostra a Figura 2.

A regulação das moléculas de adesão no endotélio é essencial para iniciar o recrutamento dos neutrófilos. As L-selectinas são responsáveis pela ligação inicial destas células ao endotélio. Com o recrutamento dos neutrófilos para sítios inflamatórios, as selectinas P e E, são translocadas para a membrana celular das células endoteliais, onde se ligam à receptores presentes nos neutrófilos, incluindo PSGL-1 (glicoproteína ligante de P-selectina-1) e ESL-1 (E-selectina ligante-1). As interações entre as selectinas e seus ligantes são os primeiros passos do recrutamento dos neutrófilos ao tecido inflamado (Phillipson & Kubes, 2011).

Durante a inflamação, diferentes tipos de células, incluindo células endoteliais, leucócitos e plaquetas, liberam quimiocinas e quimioatraentes pró-inflamatórios (Zarbock & Ley, 2009). A ligação de quimiocinas a receptores acoplados a proteína G em

neutrófilos, induz ativação de vias de sinalização intracelular que ativam as integrinas, principalmente as do tipo β_2 , Mac-1 (antígeno macrofágico 1) e LFA-1 (antígeno funcional linfocitário 1), presentes nos neutrófilos, que intermedeiam a firme adesão do neutrófilo ao endotélio (Crane & Liversidge, 2008; Zarbock & Ley 2009). O principal ligante das integrinas Mac-1 e LFA-1 é o receptor endotelial ICAM-1 (molécula de adesão intracelular 1); no entanto, essas integrinas também têm afinidade por outros ligantes encontrados na matriz extracelular, tais como a fibronectina (FN) e o fibrinogênio (Assis *et al.*, 2004). Após ativação das integrinas, novos pontos de adesão são formados, levando à polarização do leucócito através da participação de diversas proteínas, como as Rho GTPases (Ridley *et al.*, 2003).

A firme adesão permite os neutrófilos transmigrarem através do endotélio e chegar ao tecido inflamado, através de junções paracelulares pela interação com moléculas de adesão juncional (JAMs), CD99, PECAM-1 (molécula de adesão endotelial plaquetária-1) (Wagner & Frenette, 2008).

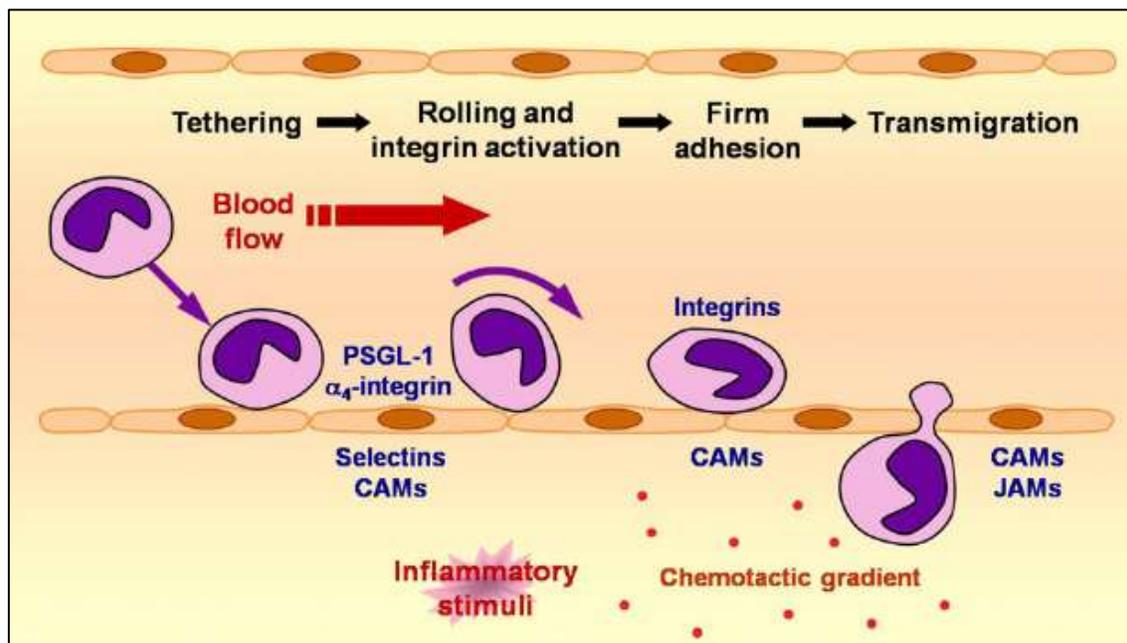


Figura 2: Mecanismo de ativação dos neutrófilos a uma resposta inflamatória (Lee & Kubes, 2008). A ligação e rolamento dessas células na camada endotelial são intermediados pelas selectinas e seus ligantes, enquanto que a firme adesão da célula é intermediada principalmente pelas integrinas ativadas por mediadores pró-inflamatórios. A firme adesão permite aos neutrófilos transmigrarem através do endotélio por meio das moléculas de adesão (CAMs) ou por meio de junções celulares pela interação com moléculas de adesão juncional (JAMs).

1.4. Moléculas de Adesão

A adesão que ocorre entre os leucócitos e a parede do endotélio, durante um determinado processo inflamatório, envolve processos específicos entre moléculas de adesão presentes na superfície destas células (Mackay & Imhof, 1993). As moléculas de adesão são divididas em três grupos classificados de acordo com sua estrutura molecular: a) família das selectinas; b) família das integrinas; c) e moléculas da superfamília das imunoglobulinas, que inclui as moléculas de adesão vascular (VCAM-1), intercelular (ICAM-1) e endotelial-plaquetária (PECAM) (Shimizu & Sham, 1991; Cronstein & Weissman, 1993).

As selectinas incluem membros como a L-selectina, E-selectina e P-selectina. A L-selectina é expressa constitutivamente em todos os leucócitos e seu nível de expressão de superfície é modulado por metaloproteases. A E-selectina é expressa em células endoteliais e a P-selectina em plaquetas e também no endotélio; estas proteínas são mobilizadas rapidamente após ativação celular por citocinas, histamina, ou estímulo da trombina de plaquetas. Durante o processo inflamatório, os neutrófilos expõem a L-selectina na sua superfície quando são ativados por substâncias quimiotáticas, do mesmo modo que a expressão de E e P-selectina aumentam na membrana das células endoteliais após estímulo por mediadores inflamatórios.

As integrinas são proteínas de superfície celular heterodímeras, constituídas por duas cadeias polipeptídicas α e β , que atuam como mediadoras no processo inflamatório, exercendo um importante papel nas etapas de adesão leucocitária, quimiotaxia, fagocitose, adesão endotelial e agregação. São responsáveis pela adesão célula-célula e pela adesão matriz celular-célula. Existem inúmeras subfamílias de integrinas e todos os membros de cada família possuem em comum uma cadeia β e uma cadeia α singular. As integrinas são classificadas em três subfamílias: as β_1 integrinas ou VLA, β_2 integrinas e β_3 integrinas ou citoadesivas. São conhecidas até hoje dezesseis subunidades α , oito subunidades β e várias combinações entre estas subunidades. Como resultado dessas combinações foram descritos vinte diferentes tipos de integrinas, subclassificados dentro de oito famílias estruturalmente distintas (Yusuf-Makagiansar *et al.*, 2001).

A integrina β_1 (subfamília VLA) exerce importante função de adesão, sinalização de moléculas e migração de células durante a embriogênese. A subfamília VLA é composta

por seis membros VLA-1 (CD49a/CD29), VLA-2 (CD49b/CD29), VLA-3 (CD49c/CD29), VLA-4 (CD49d/CD29), VLA-5 (CD49e/CD29) e VLA-6 (CD49f/CD29). As moléculas da subfamília VLA são expressas em diferentes tecidos e interagem predominantemente com as proteínas da matriz extracelular, tais como a laminina, colágeno e fibronectina. O VLA-4 é expresso em monócitos, linfócitos T e B, basófilos e eosinófilos. Alguns trabalhos demonstraram que neutrófilos humanos e de ratos também podem expressar esta integrina quando ativados (Davenpeck *et al.*, 1998; Conran *et al.*, 2003). Uma vez ativados, os neutrófilos podem expressar a integrina VLA-4 cuja função é ancorar a célula ao endotélio por se ligar ao VCAM-1 (French *et al.*, 1997; Yusuf-Makagiansar *et al.*, 2001).

Os leucócitos também expressam integrinas da subfamília β_2 , a qual é composta por três distintas moléculas LFA-1 (CD11a/CD18; $\alpha L\beta_2$), Mac-1 (CD11b/CD18; $\alpha M\beta_2$) e p150/95 (CD11c/CD18; CR3). Os receptores para a integrina β_2 são membros da superfamília de imunoglobulinas, incluindo os ICAMs, VCAM-1 e PECAM. O LFA-1 está presente predominantemente em linfócitos. Por outro lado, evidências indicam que a Mac-1 seja a mais importante integrina do grupo CD18, encontrada em respostas inflamatórias dependentes de neutrófilos. Esta integrina é armazenada em três compartimentos no neutrófilo: vesículas secretoras, grânulos específicos e grânulos de gelatinase (Boregaard & Cowland, 1997).

Moléculas da superfamília das imunoglobulinas estão envolvidas na adesão célula-célula. A ICAM-1 apresenta pequena expressão constitutiva nos monócitos e nas células endoteliais, mas sua expressão é aumentada durante os processos inflamatórios; as integrinas Mac-1 e LFA-1 são seus ligantes (Cronstein & Weissmann 1993; Muller & Randolph, 1999). Três outras ICAMs foram identificadas posteriormente: ICAM-2, expressa em células endoteliais e células T; ICAM-3, expresso em todos os leucócitos e ICAM-4. A VCAM-1 está envolvida nas interações leucócitos-endotélio e o ligante para essa molécula é a integrina VLA-4. Outra molécula da família das imunoglobulinas, a PECAM-1, é expressa em células endoteliais, plaquetas e neutrófilos (Muller & Randolph, 1999).

1.5. Óxido Nítrico e a enzima NOS

O óxido nítrico (NO) é a menor molécula biologicamente ativa do organismo, é um sinalizador gasoso responsável por uma variedade de fenômenos fisiológicos, sendo que os mais importantes são o seu mecanismo de ação parácrino no relaxamento da musculatura lisa, sua atividade neurotransmissora em vários sistemas e seu envolvimento no processo inflamatório, sendo assim produzido em condições fisiológicas e patológicas a partir do aminoácido L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS).

Esta reação envolve a transferência de cinco elétrons e ocorre em duas etapas: na primeira, um produto intermediário N^G-hidroxi-L-arginina é formado pela transferência de dois elétrons, e na segunda, este produto é oxidado por transferência de mais três elétrons, formando o NO e a L-citrulina, como mostra a Figura 3 (Dusse *et al.*, 2003; Barreto *et al.*, 2005).

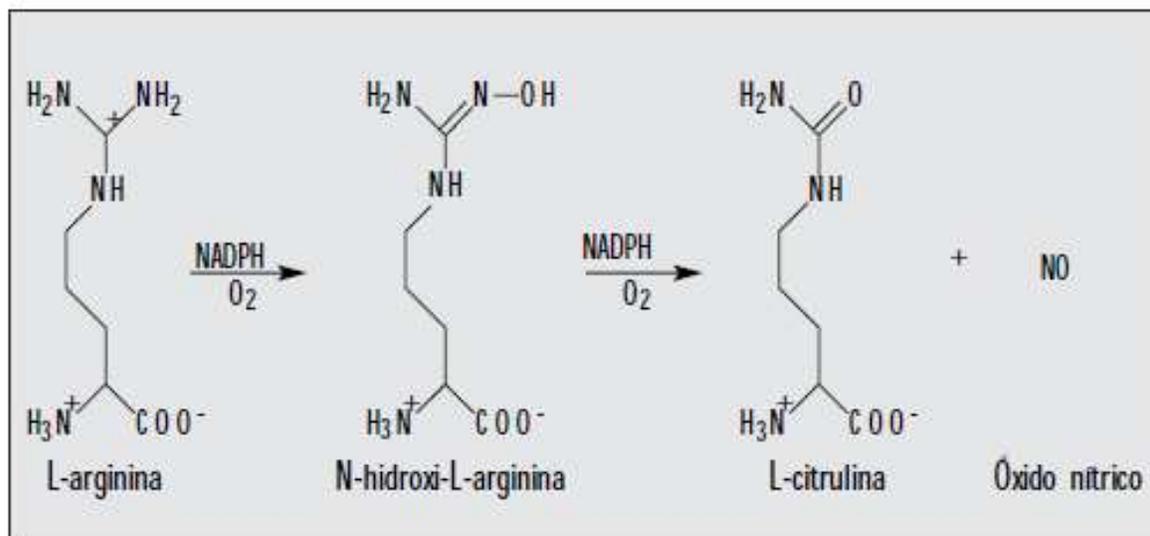


Figura 3: Oxidação da L-Arginina (L-Arg) a L-Citrulina (L-Cit) catalisada pela NOS (Dusse *et al.*, 2003).

Três isoformas de NOS já foram identificadas, sendo duas delas expressas constitutivamente, enquanto a outra se expressa somente em células ativadas. Uma das formas constitutivas foi originalmente caracterizada em neurônios, enquanto a outra foi caracterizada em células endoteliais, sendo denominadas NOS neuronal (nNOS) e NOS endotelial (eNOS) respectivamente. A terceira isoforma de NOS, conhecida como NOS

induzível (iNOS), é apenas sintetizada em consequência da ativação celular. Tanto a nNOS como a eNOS são cálcio/calmodulina dependentes e liberam NO por períodos curtos, enquanto que a iNOS é independente de cálcio e, uma vez expressa, sintetiza NO por longos períodos (Moncada *et al.*, 1991).

A nNOS é encontrada no sistema nervoso central e periférico, sendo que o NO derivado desta isoforma tem importante papel fisiológico como neurotransmissor e mediador do metabolismo e do fluxo sanguíneo no cérebro. A nNOS também pode ser encontrada em células não neuronais, como mastócitos, macrófagos, neutrófilos e células endoteliais (Schmidt *et al.*, 1993). A eNOS está presente nas células endoteliais e o NO produzido por esta enzima está envolvido na regulação da pressão arterial, distribuição do fluxo sanguíneo aos órgãos, inibição da adesão e agregação plaquetária e inibição de certas funções leucocitárias (Southan & Szabó, 1996; Ignarro, 2002). A iNOS é sintetizada em macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, hepatócitos, entre outros tipos celulares, em resposta à citocinas e endotoxinas. Esta isoforma está essencialmente presente em reações inflamatórias diversas, tanto agudas como crônicas (Clancy & Abramson, 1995).

Quando liberado pelo endotélio, o NO difunde-se rapidamente da célula geradora para a célula alvo, onde estimula a atividade catalítica da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), resultando no aumento intracelular de guanosina monofosfato cíclica (GMPc), sendo este segundo mensageiro o responsável pela maioria das funções fisiológicas regulatórias do NO (Moncada & Higgs, 1993; Ignarro, 2002). Ao nível celular, o NO exerce variados efeitos na função de leucócitos, incluindo a indução de apoptose de macrófagos, o estímulo da motilidade citoplasmática de macrófagos, a modulação da adesão de neutrófilos e da regulação diferencial da síntese de citocinas por leucócitos (Liew, 1995; Madan & Rao, 1996; Bogdan, 1997).

1.6. Papel do óxido nítrico na expressão e função das moléculas de adesão

A produção de NO pelos neutrófilos é um importante elemento da resposta imune inata. Evidências sugerem que o NO desempenha um papel na regulação da adesão e migração de leucócitos, que em geral, acredita-se ter um efeito anti-inflamatório (Harrison *et al.*, 2010), embora um efeito duplo e regulatório desta molécula sinalizadora na inflamação tem sido sugerido (Leite *et al.*, 2009).

Estudos utilizando camundongos nocautes para eNOS demonstraram que os leucócitos destes animais têm uma adesão basal maior dentro do vaso quando comparado com camundongos controle (Lefer *et al.*, 1999; Sanz *et al.*, 2001), e o uso de inibidor da NOS, L-NAME, demonstrou diminuir a migração de leucócitos *in vitro* (Moilanen *et al.*, 1993) e *in vivo* (Franco-Penteado *et al.*, 2001). Outras pesquisas também demonstraram que o NO pode ter um papel regulador na função da integrina Mac-1 e na expressão e função da integrina VLA-4 em neutrófilos humanos (Conran *et al.*, 2003), bem como pode alterar a expressão e a função de integrinas na superfície dos eosinófilos (Conran *et al.*, 2001).

Adicionalmente, estudos *in vivo* utilizando microscopia intravital em camundongos selvagens usados como controle e nocautes para eNOS, estimulados com BAY 41-2272, um ativador de GCs, e Deano (Dietilamina-NONOato), um doador de NO, mostraram redução do rolamento e aderência de leucócitos aos vasos em camundongos WT. Por outro lado, estudos *in vitro*, evidenciaram que a redução da expressão de P-selectina em células endoteliais induzida pela IL-1 é intermediada pela ativação da GC juntamente com a produção de GMPc (Ahluwalia *et al.*, 2004).

Acredita-se que a diminuição da biodisponibilidade de NO vascular seja um dos principais contribuintes para o início da aterosclerose, devido à indução da expressão das moléculas de adesão endotelial e um consequente recrutamento de células inflamatórias à parede do vaso (Harrison *et al.*, 2010). Outras pesquisas também indicam que a diminuição da biodisponibilidade de NO, observada na anemia falciforme, pode participar no aumento das propriedades adesivas de neutrófilos para a parede vascular, contribuindo para o processo vaso-oclusivo, e que terapias baseadas na via NO / GMPc podem ser uma opção futura para a redução ou prevenção da vaso-oclusão (Canalli *et al.*, 2008; Almeida *et al.*, 2008; Conran & Costa, 2009).

1.7. Rho GTPases

As Rho GTPases constituem uma família distinta dentro da superfamília Ras GTPases e são encontradas em todas as células eucarióticas. Este grupo compreende proteínas de sinalização intracelular que regulam diversas vias envolvidas na organização do citoesqueleto, adesão e proliferação celular integrando sinais de quimiocinas e moléculas de adesão (Hall, 1998; Mulloy *et al.*, 2010).

As GTPases são proteínas que ciclam entre dois estados conformacionais: um estado ativo, ligado a GTP (guanosina trifosfato), e um estado inativo, ligado a GDP (guanosina difosfato). Quando estão no estado ativo, as GTPases reconhecem proteínas efetoras nas membranas celulares e geram uma resposta biológica até retornarem ao estado inativo. Células de mamíferos contêm centenas de GTPases. A superfamília Ras GTPases é particularmente importante pois seus membros são reguladores de muitos aspectos do comportamento celular. Esta superfamília é composta por aproximadamente 60 proteínas pequenas, monoméricas, que são divididas em cinco grupos principais: Ras, Rho, Rab, Arf e Ran (Vega & Ridley, 2008; Roja *et al.*, 2012).

O ciclo de ativação das GTPases é regulado por três grupos de proteínas, os fatores de troca guanina-nucleotídeo (GEFs – *guanine-nucleotide exchange factors*), que leva à ativação das Rho GTPases, através da catalisação da troca de GDP para GTP (Schmidt & Hall, 2002); as proteínas ativadoras de GTPases (GAPs – *GTPases-activating proteins*), por sua vez, estimulam a atividade GTPase intrínseca para inativação das Rho GTPases (Bernards, 2003); e a terceira família é a das proteínas Rho GDIs (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*), composta apenas por 3 membros ainda pouco estudados (GDI1, GDI2 e GDI3), cujas funções parecem ser antagonizar as ações tanto de GEFs quanto de GAPs. Proteínas Rho GDIs podem bloquear a dissociação das Rho GTPases ao GDP, mantendo-as no estado inativo (Fukumoto *et al.*, 1990) ou inibindo a hidrólise de GTP intrínseca e catalisada por GAPs (Hart *et al.*, 1992), sendo capazes de agir nos dois pontos do ciclo de ativação/inativação das Rho GTPases. Uma terceira habilidade das Rho GDIs é estimular a liberação das Rho GTPases das membranas celulares (Nomanbhoy, 1999), impedindo sua interação com efetores. O ciclo de ativação/inativação das Rho GTPases está representado na Figura 4. Uma vez ativas quando ligadas ao GTP, as Rho GTPases se ligam a diferentes proteínas efetoras, as quais incluem proteínas quinases, ativadores de polimerização de actina assim como adaptadores de proteínas, e desencadeiam uma cascata de sinalização para direcionar a resposta celular (Ridley, 2008; Vega & Ridley, 2008).

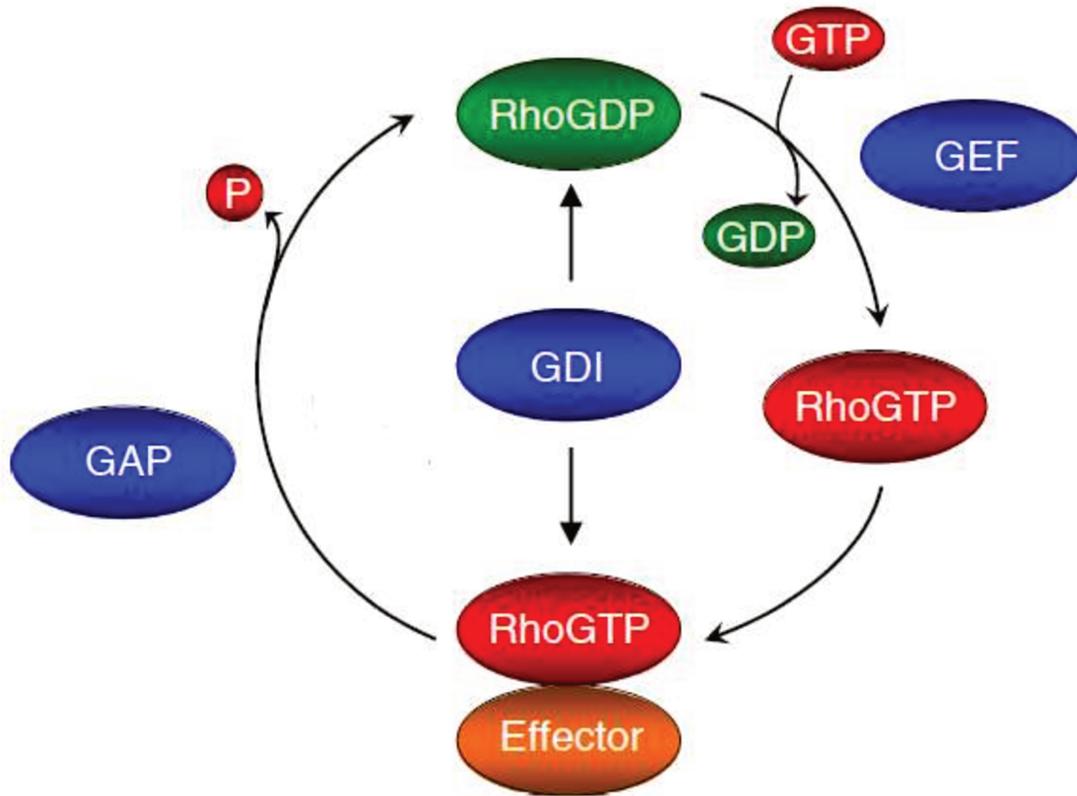


Figura 4: Ciclo de ativação das Rho GTPases (Adaptado Vega & Ridley, 2008). A ligação das Rho GTPases com GTP e subsequente ativação é catalisada por GEFs. Quando ligadas ao GTP interagem com diferentes efetores para executar suas funções. As GAPs promovem a hidrólise de GTP para inativar a proteína. GDIs constituem mais um passo da regulação, o sequestro de proteínas no citoplasma.

Em relação à família das Rho GTPases há até o momento 22 genes que codificam pelo menos 25 proteínas em humanos: três isoformas de Rho (RhoA, RhoB e RhoC), três isoformas de Rac (Rac1, Rac2 e Rac3), Cdc42, RhoD, Rnd1, Rnd2, Rnd3 (ou RhoE), RhoG, TC10, TCL, RhoH, Chp, Wrch, Rif, RhoBTBT1, RhoBTBT2, Miro-1 e Miro-2 (Aspentrom *et al.*, 2004). Entre os membros mais estudados estão a RhoA, Rac1 e Cdc42, pois foram os primeiros a serem reportados com importantes funções celulares relacionadas ao citoesqueleto de actina. A expressão da forma constitutivamente ativa de RhoA induz a organização dos filamentos de actina e miosina contráteis (formação de fibras de estresse) (Ridley *et al.*, 1992). Rac1 induz a formação de protrusões de actina na superfície celular (lamelipódia) (Ridley *et al.*, 1992) e Cdc42 induz a formação de extensões membranares também ricas em actina (filopódia) (Kozma *et al.*, 1995).

Os neutrófilos direcionados a sítios inflamatórios sofrem rearranjo do citoesqueleto e alterações nos complexos de adesão que permitem que as células migrem dentro da matriz extracelular para altas concentrações de quimioatraentes. Rho GTPases são importantes para a migração celular, pois regulam a contração do citoesqueleto e a polarização da actina (Ridley *et al.*, 2003). Portanto proteínas como Rac1, RhoA e Cdc42 são importantes reguladoras da migração de neutrófilos, integrando os sinais de receptores de quimiocinas e de moléculas de adesão (Filippi *et al.*, 2007).

A Rac1 é um transdutor intracelular que regula diversas vias sinalizadoras na organização do citoesqueleto, transcrição e proliferação celular. Diversos trabalhos sugerem o envolvimento da Rac1 na reorganização do citoesqueleto de actina, especificamente na formação da lamelipódia, que pode contribuir para o movimento das células (Ridley *et al.*, 1992). Em neutrófilos, Rac1 afeta a adesão celular (Konstantinidis *et al.*, 2010) e um estudo *in vivo*, utilizando um modelo inflamatório pulmonar induzido pelo fMLP (peptídeo derivado de certas bactérias), demonstrou que Rac1 é importante para transmigração dos neutrófilos no tecido pulmonar e intersticial e nos espaços alveolares (Fillipi *et al.*, 2007). A RhoA e seu efetor, *Rho-associated coiled coil forming protein serine/threonine kinase* (Rho quinase; ROCK), que por sua vez, é uma quinase capaz de fosforilar uma variedade de substratos em serina e treonina (Riento *et al.*, 2003), regulam a adesão e migração celular através da contração celular e do controle da manutenção do citoesqueleto de actina.

As Rho GTPases regulam muitas outras vias de transdução de sinais além das vias relacionadas ao citoesqueleto de actina, incluindo a via dos fatores de transcrição NFκB (fator nuclear κB) e SRF (Fator de Resposta ao Soro) (Hill *et al.*, 1995; Perona *et al.*, 1997) e da quinase C-Jun N-terminal (JNK) (Coso *et al.*, 1995). Portanto, elas participam da polaridade celular, transcrição gênica, progressão do ciclo celular, dinâmica de microtúbulos, adesão célula-célula, transporte de vesículas e uma variedade de atividades enzimáticas (Van Aelst & D'Souza-Schorey 1997; Braga, 1999; Daub *et al.*, 2001; Etienne-Manneville & Hall 2001). Esta enorme quantidade de funções está relacionada ao grande número de proteínas efetoras já identificadas (Van Aelst & D'souza Schorey, 1997). As proteínas efetoras interagem especificamente com as Rho GTPases na sua forma ativa,

ligadas a GTP, levando à ativação de diversas vias de sinalização que culminam na resposta celular. Mais de trinta potenciais efetores para RhoA, Rac e Cdc42 já foram identificados.

1.8. Estatinas

As estatinas formam um grupo de drogas usadas há pouco mais de 30 anos no tratamento da hipercolesterolemia. Em 1976 foi descoberta a primeira estatina, a Compactina, derivada do fungo *Penicillium brevicopatum*, porém seu uso foi descontinuado devido à sua alta toxicidade hepática em ratos. Entretanto, em 1980 foi aprovada a primeira estatina para uso humano, a lovastatina, derivada do fungo *Aspergillus terreus*, sendo esta muito usada na prática clínica (Alberts *et al.*, 1980).

As estatinas diferem entre si particularmente quanto à permeabilidade tecidual (lipossolubilidade) e metabolismo, levando a diferentes potenciais da inibição da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase extra-hepática. Estatinas como a sinvastatina, fluvastatina e atorvastatina são lipofílicas e capazes de atravessar passivamente a membrana das células, exercendo efeito em uma grande variedade de tecidos, incluindo células endoteliais e musculares. Por outro lado, estatinas hidrofílicas como a lovastatina e principalmente, a pravastatina e rosuvastatina não atravessam passivamente a membrana celular, atuando principalmente em nível hepático onde existe um transporte de ânions orgânicos que permite às estatinas hidrofílicas entrarem nos hepatócitos (Mason *et al.*, 2005).

A partir das estatinas “naturais” ou derivadas de fungos, muitas outras moléculas têm sido desenvolvidas de forma sintética por modificações químicas, com potência cada vez maior. De fato, as estatinas se tornaram a principal classe de drogas hipolipemiantes, porém novos efeitos têm sido descritos que vão além da redução lipídica, são os chamados efeitos não lipídeos relacionados ou efeitos pleiotrópicos das estatinas. Entre alguns, podemos citar os efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e imunomoduladores (Campo & Carvalho, 2007).

O colesterol é um componente essencial para a membrana celular e precursor de hormônios esteroides e ácidos biliares. As estatinas inibem competitivamente e de forma dose dependente e reversível a enzima HMG-CoA redutase, que catalisa a conversão da Acetil-CoA em mevalonato, um intermediário essencial na síntese do colesterol (Figura 5).

A HMG-CoA é uma enzima limitante na síntese do mevalonato e, conseqüentemente, da produção de colesterol (Mason, 2005).

Através da inibição da síntese do mevalonato, as estatinas reduzem não só a síntese do colesterol, mas também a síntese de isoprenoides intermediários envolvidos nesta síntese, incluindo o farnesilpirofosfato (FPP) e o geranylgeranylpirofosfato (GGPP). Esses isoprenoides servem como lipídeos fixadores para uma variedade de moléculas sinalizadoras, como as proteínas G e GTPases como Ras e Rho. Além do ciclo de ligação a GDP/GTP, a atividade das Rho GTPases é dependente de modificações pós-translacionais chamadas prenilação, que é a adição de lipídios isoprenoides na porção C-terminal das proteínas. As reações de prenilação podem ser de dois tipos: farnesilação ou geranylgeranilação. A isoprenilação de proteínas facilita a ligação covalente, a localização subcelular e o tráfego intracelular destas proteínas relacionadas à membrana e relevantes nas vias de sinalização celular (Mason, 2005). A translocação de Ras para a membrana é necessária para sua atividade e é dependente da farnesilação. Da mesma forma, a fixação de Rho e Rac na membrana é necessária para suas atividades, mas em contraste com Ras, estes fatores sofrem geranylgeranilação, como mostra o esquema da Figura 5 (Jain & Ridker, 2005; Maher *et al.*, 2009). Estas modificações permitem a interação entre proteínas e também a associação das Rho GTPases com as membranas plasmática e intracelulares, sendo, portanto, importantes para a sua localização correta (Marshall, 1993; Seabra, 1998). Em resposta a uma série de fatores de crescimento e citocinas, estas proteínas são ativadas, e desencadeiam um leque de efeitos celulares, Rac com geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e Rho com ativação de vias pró-inflamatórias (Jain & Ridker, 2005; Mason, 2005).

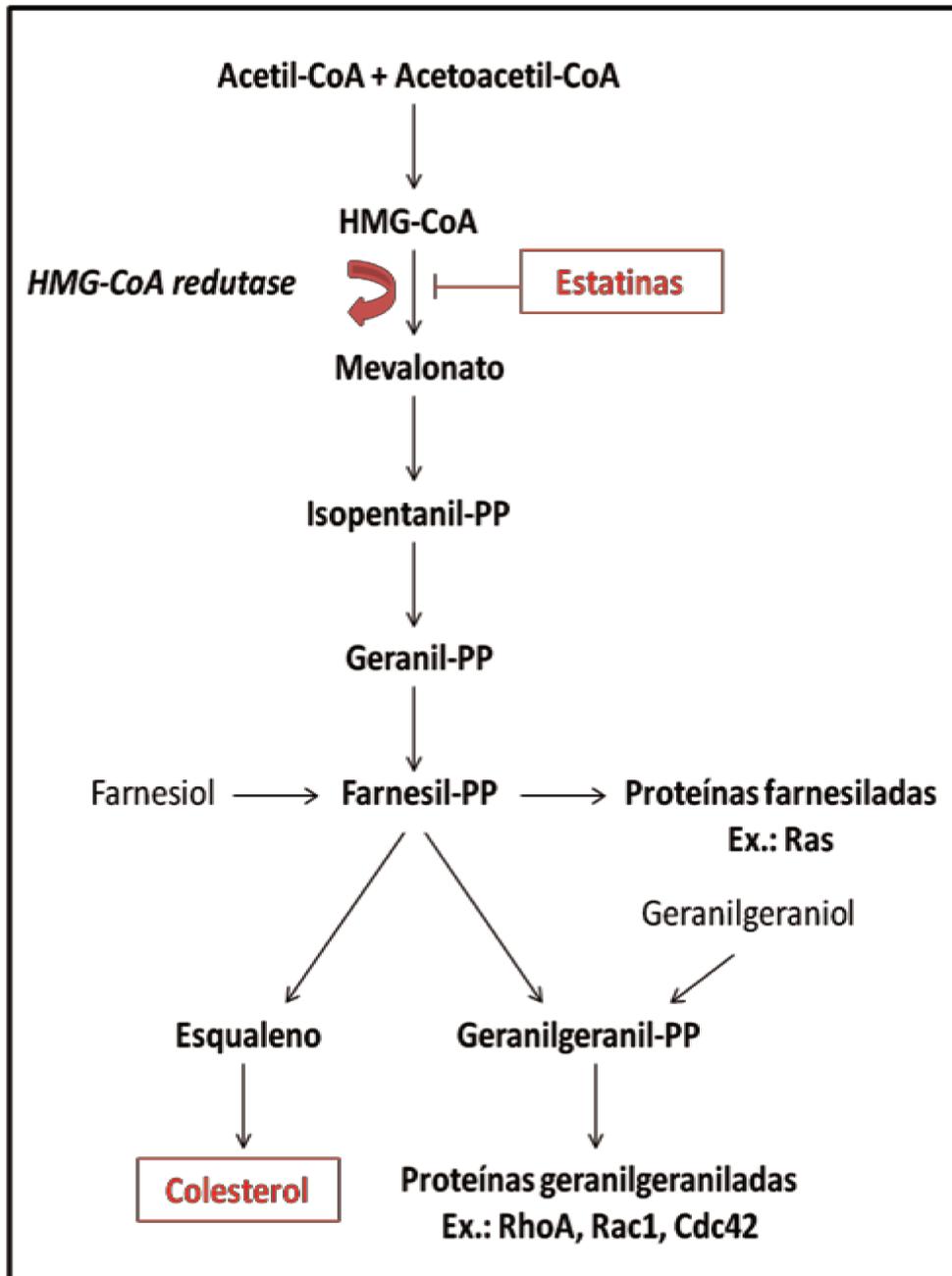


Figura 5: A via do mevalonato (Adaptado Mason, 2005). Estatinas agem inibindo a enzima HMG-CoA redutase, que por sua vez inibe a biossíntese do colesterol impedindo a formação de isoprenoides intermediários, incluindo o farnesilpirofosfato e geranylgeranylpirofosfato. Geranylgeranyl e farnesil são fixadores lipídicos importantes na modificação pós-translocacional e sinalização de proteínas, como as pequenas GTPases Rho, Rac e Cdc42, e proteínas G. Interferências nestas vias estão por trás de muitos efeitos pleiotrópicos das estatinas.

Deste modo, a inibição da isoprenilação resulta no acúmulo de Rho citoplasmático, levando a mudanças no citoesqueleto que alteram a sinalização celular, a estabilidade da membrana e o tráfego através da mesma, e por fim, a própria transcrição gênica. Aparentemente, a inibição da isoprenilação de Rho é o principal mecanismo dos efeitos pleiotrópicos das estatinas (Mason, 2005).

1.9. Drogas moduladoras da via de sinalização do NO

Através do uso de inibidores de NOS, tem sido possível estudar o papel do NO endógeno em diversos eventos fisiopatológicos. Dentre os inibidores de NOS, destacam os análogos de L-arginina, os quais são inibidores competitivos e não seletivos das isoformas de NOS, como podemos citar o *N_ω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride* (L-NAME) (Moncada *et al.*, 1997). Outros compostos não derivados de arginina também são descritos como inibidores da NOS, tais como 7-nitroindazol que inibe preferencialmente a nNOS (Moore *et al.*, 1993) e o 1400W que inibe seletivamente a iNOS (Garvey *et al.*, 1997). O nitroprussiato de sódio (SNP) é um doador exógeno de NO e atua aumentando a concentração de GMPc celular. Os ativadores da GCs representam grande inovação na investigação de novas drogas para esta via, entre um destes componentes está o BAY41-2272. Estudos *in vitro* e *in vivo* já evidenciaram um prévio efeito dessa droga na modulação da resposta inflamatória (Ahluwalia *et al.*, 2004).

1.10. Drogas moduladoras da via de sinalização de Rho-GTPases

Rho GTPases regulam uma grande variedade de funções celulares e as vias de sinalização relacionadas a estas proteínas têm sido implicadas em várias condições patológicas nos seres humanos. Existem drogas que atuam diretamente na via de sinalização da família das Rho GTPases, como por exemplo o Y27632, um inibidor da ROCK, a qual é uma efetora da RhoA e o NSC23766 um inibidor específico de Rac-1.

1.11. Mediadores Inflamatórios

1.11.1. Interleucina 8 (IL-8)

A IL-8, ou CXCL8, é uma citocina inflamatória pertencente à família das CXC-quimiocinas. Foi originalmente descoberta como uma das primeiras quimiocinas

ativadoras de neutrófilos. Está envolvida em variados processos fisiológicos e fisiopatológicos que vão desde a defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas e fagocitose de tecidos necróticos de inúmeras doenças autoimunes, incluindo artrite reumatoide, psoríase e a aterosclerose (Baggiolini, *et al.*, 1992).

A IL-8 é produzida por monócitos/macrófagos, células T, neutrófilos, fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos, hepatócitos, condrócitos e astrócitos, em resposta a estímulos inflamatórios como IL-1, TNF- α e LPS (Matsushima *et al.*, 1992; Miller & Krangel, 1992). Esta proteína provoca a modificação da conformação de integrinas na superfície do neutrófilo, promovendo sua ligação com as moléculas receptoras na superfície das células endoteliais. Além disso, a IL-8 desencadeia a firme adesão do neutrófilo à célula endotelial (Lum *et al.*, 2004), promove sua migração para os tecidos e ativa localmente o seu mecanismo efetor (Mukaida, 2000).

1.11.2. Fator de necrose tumoral α (TNF- α)

O TNF- α também é uma citocina inflamatória liberada por uma variedade de tipos celulares incluindo macrófagos, monócitos, linfócitos e neutrófilos. A principal função fisiológica do TNF- α é estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para os sítios de infecção. Durante um processo inflamatório, o TNF- α induz a expressão de moléculas de adesão na superfície celular em neutrófilos e células endoteliais, tornando a superfície endotelial adesiva, sendo assim, importante para a migração e aderência do neutrófilo ao endotélio. Esta citocina também estimula as células endoteliais e os macrófagos a secretarem as citocinas chamadas quimiocinas que induzem quimiotaxia e recrutamento dos leucócitos. Além disso, sob certas condições, o TNF- α tem a capacidade de induzir a apoptose das células endoteliais (Clark, 2007).

Essa citocina apresenta grande importância em diversas doenças inflamatórias, como septicemia, artrite reumatoide e anemia falciforme, onde participa provavelmente da regulação da cascata de citocinas responsáveis pela inflamação (Lanaro *et al.*, 2009).

Muitas pesquisas têm evidenciado que o bloqueio desta citocina é um potente tratamento em numerosas doenças inflamatórias (Mazza *et al.*, 2010). As terapias anti-TNF- α podem ser uma importante abordagem terapêutica adicional às terapias já existentes,

relacionadas à redução das propriedades quimiotáticas e adesivas dos neutrófilos durante um processo inflamatório estabelecido.

1.12. Justificativa

A ativação e o recrutamento de neutrófilos para sítios inflamatórios em resposta a ferimentos ou infecções são altamente regulados. Em condições inflamatórias, os neutrófilos aderem ao endotélio ativado, levando a eventos fisiopatológicos que podem alterar o fluxo sanguíneo. No momento, os mecanismos intracelulares que regulam a expressão e função das moléculas de adesão na superfície de neutrófilos durante o processo adesivo destas células na presença de estímulos inflamatórios ainda não estão bem compreendidos e precisam ser explorados.

Pesquisas anteriores indicam que vias de sinalização dependente de NO podem modular a capacidade adesiva de leucócitos humanos (Conran *et al.*, 2001; Conran *et al.*, 2003). Visto a importância de estímulos inflamatórios no processo adesivo e migratório leucocitário e o papel central da inflamação na indução de várias doenças, caracterizadas por inflamação vascular com consequente obstrução de fluxo sanguíneo (como na aterosclerose e anemia falciforme) (Conran & Costa, 2009; Hansson *et al.*, 2006) estudos que investigam o papel de sinalização pelo NO na presença de estímulos inflamatórios adicionará informações para o conhecimento atual. Além disso, pouco se sabe a respeito do papel das proteínas Rho GTPases na expressão e função de moléculas de adesão na superfície de neutrófilos durante processos inflamatórios. Assim sendo, é de extrema importância entender o papel do NO e das Rho GTPases nas propriedades adesivas dos neutrófilos sob condições inflamatórias. Um melhor conhecimento destas vias de sinalização pode ser importante para indicar alvos terapêuticos para doenças em que a fisiopatologia é caracterizada por inflamação vascular crônica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar o papel das vias de sinalização dependente de NO e de Rho GTPases nas propriedades adesivas de neutrófilos sob condições inflamatórias.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o papel do NO e o seu segundo mensageiro, GMPc, no mecanismo adesivo de neutrófilos sob condições de inflamação, utilizando fibronectina como ligante.
- Avaliar o papel das proteínas, Rac1 e ROCK, no mecanismo adesivo de neutrófilos sob condições de inflamação, utilizando fibronectina como ligante.
- Avaliar o efeito da sinvastatina no mecanismo adesivo de neutrófilos sob condição de inflamação, e usá-la como ferramenta para avaliação do envolvimento das Rho GTPases neste mecanismo, utilizando fibronectina como ligante.
- Avaliar a expressão gênica das Rho GTPases, Rac1 e RhoA, em neutrófilos sob condições de inflamação.

3. CASUÍSTICA E ASPECTOS ÉTICOS

3.1. Voluntários

Foram selecionados voluntários saudáveis de ambos os sexos, com idade entre 18 e 60 anos e que não faziam uso de nenhuma medicação da classe das estatinas ou anti-inflamatórios. Estes voluntários foram abordados para coleta da amostra de sangue no setor de doação de sangue do Hemocentro da UNICAMP, Campinas-SP. A amostra de sangue foi coletada, por um enfermeiro do setor, previamente antes da doação da bolsa de sangue.

3.2. Aspectos éticos da pesquisa

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (CEP). Aprovado pelo CEP em 27 de Julho de 2010 durante a VII Reunião Ordinária de CEP/FCM com o parecer de número 602/2010.

Todos os indivíduos foram informados sobre os procedimentos da coleta e seus riscos e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para a autorização da mesma (Apêndice I).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

As citocinas IL-8 recombinante humana (rhCXCL8/IL-8) e o TNF- α (rhTNF- α) foram adquiridos da empresa R&D Systems (Minneapolis, USA). Os anticorpos para citometria anti-CD62L, anti-CD11a e o anti-CD11b foram adquiridos da empresa BD PharmingenTM (California, USA). O NSC 23766 foi adquirido da empresa Calbiochem (San Diego, CA, USA). A fibronectina (FN), os reagentes de ficoll-hypaque®, L-NAME (*N_ω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride*), 1400W, BAY41-2272, SNP, GGPP (*Geranylgeranyl pyrophosphate ammonium salt*), FPP (*Farnesyl pyrophosphate ammonium salt*), (\pm) mevalonalactone, sinvastatina e o Y-27632 foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich (St. Louis, USA).

4.2. Métodos

4.2.1. Separação de neutrófilos do sangue periférico

O sangue periférico (6 mL) foi coletado em tubo contendo citrato de sódio (3,2%) (BD vacutainer, Brasil), pelos métodos convencionais de flebotomia e, em seguida, colocado sobre 2 camadas de Ficoll-paque® com densidades iguais a 1.119 g/L e 1.077 g/L, respectivamente. Após a centrifugação a 700g por 30 minutos à temperatura ambiente, a camada de células granulocíticas foi separada, transferida e lavada com PBS 1X (salina tamponada fosfatada, pH=7,4). Em seguida, uma lise hipotônica (Solução de amônia – 155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃) foi realizada por 15 minutos, a fim de romper hemácias contaminantes, e novamente as células foram lavadas com PBS 1X. Após as lavagens, essas células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 (pH=7,2) nas concentrações ideais para a realização dos experimentos.

4.2.2. Contagem de neutrófilos do sangue periférico

A contagem das células foi feita através de uma câmara de Neubauer (Peres & Curi, 2005). Posteriormente foram realizados os cálculos a partir dos neutrófilos contados para deixá-los na concentração desejada de acordo com cada tipo de experimento.

4.2.3. Determinação da viabilidade e pureza

Após a contagem das células, foram feitas lâminas usando cito centrífuga para verificar a pureza da suspensão celular. Para isto, 100 µL de suspensão celular (10^6 células/mL), provenientes de experimentos aleatórios, foram colocados no recipiente da cito centrífuga (Shandon Cytospin 3) e submetidos à centrifugação a 400 rpm durante 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram secas em temperatura ambiente, coradas com corante Panótico Rápido (Laborclin, Pinhais-Brasil) e a pureza da suspensão de neutrófilos confirmada. As lâminas foram visualizadas em microscopia óptica comum, em imersão (aumento de 1000x).

Para análise da viabilidade celular através de câmara de Neubauer, utilizou-se o reagente azul de tripan (Peres & Curi, 2005). Para isso 10 µL da suspensão celular (4×10^6 células/mL) foi diluída em 140 µL de meio RPMI e 50 µL de azul de tripan. Os cálculos foram feitos a partir do número de neutrófilos viáveis em relação ao número total de neutrófilos contados na câmara de Neubauer. A média da viabilidade celular e pureza, das suspensões de neutrófilos utilizados nos experimentos, foi $\geq 97\%$.

4.2.4. Tratamento de neutrófilos com drogas moduladoras da via do NO-GMPc e de Rho GTPases e mediadores inflamatórios

Os neutrófilos foram tratados com diversas drogas moduladoras da via de sinalização do NO/GMPc e de Rho GTPases e mediadores inflamatórios antes dos experimentos de ensaio de adesão.

Os neutrófilos foram pré-incubados com L-NAME (0.01, 0.1 e 1 mM), 1400W (1, 10 e 100 µM), nitroprussiato de sódio (SNP- 10 e 100 µM) e BAY 41-2272 (10, 60, 150 e 200 nM) por 15 minutos, 37°C, 5% CO₂.

Em relação ao estudo da via de sinalização da Rho GTPases foram feitas pré-incubações usando Y-27632 (5, 10, 20, 50 e 100 µM) e NSC 23766 (10, 50 e 100 µM). A sinvastatina (1, 10 e 100 µM) foi usada como ferramenta para auxiliar na investigação dos possíveis mecanismos celulares envolvendo as Rho GTPases na adesão de neutrófilos. Posteriormente, concomitantes ao uso da sinvastatina foram usados o mevalonato (250 µM), o GGPP (10 µM) e o FPP (10 µM).

Decorrido o tempo das pré-incubações, as células foram co-incubadas com IL-8 (500 ng/mL) ou TNF- α (200 ng/mL), cujas concentrações foram previamente padronizadas.

4.2.5. Ensaio de adesão estática *in vitro*

Esses ensaios são utilizados para avaliar propriedades adesivas dos neutrófilos conforme descrito por Canalli *et al.*, 2007 e Dominical *et al.*, 2011. Placas de 96 poços foram previamente revestidas com de fibronectina (FN), uma proteína da matriz extracelular, na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$. Para o revestimento, foram adicionados 60 μL de fibronectina por poço e as placas foram incubadas *overnight* a 4°C. No dia seguinte, dia do ensaio, os poços foram lavados duas vezes com 160 μL PBS 1X e adicionou-se 100 μL , em cada poço, de BSA 0,5% (albumina sérica bovina) para bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação. Esta placa foi incubada em estufa a 37°C por 60 minutos e em seguida, os poços foram novamente lavados duas vezes com 160 μL PBS 1X e aguardou-se a secagem. Após este procedimento, a placa coberta de FN torna-se pronta para receber os neutrófilos (2×10^6 células/mL) pré-tratados conforme o experimento.

Os neutrófilos ressuspensos em RPMI (2×10^6 células/mL) foram preparados na presença ou ausência de drogas moduladoras da via de sinalização do NO e das Rho GTPases e/ou mediadores inflamatórios, cujas concentrações foram previamente padronizadas. Em seguida, os neutrófilos tratados (50 μL /poço) foram pipetados em triplicata nos poços revestidos com FN e foi permitido às células aderirem por 30 minutos à 37°C, 5% de CO₂. Após o tempo de incubação, as células não aderentes foram desprezadas lavando-se a placa mais três vezes com PBS. Foram adicionados 50 μL de RPMI em cada poço contendo os neutrófilos tratados.

A quantificação de neutrófilos aderidos foi feita através da leitura por um espectrofotômetro (Multiscan MS, Labsystems, EUA) a 492nm, que quantifica a densidade óptica emitida pela reação do substrato de O-dianisidina (Sigma®), na presença de peróxido de hidrogênio, com o conteúdo de mieloperoxidase (MPO), enzima presente nos grânulos dos neutrófilos, e comparada à curva padrão de cada indivíduo.

A curva padrão foi realizada com porcentagens de células pré-determinadas de cada amostra e comparada aos resultados obtidos. Foi feita uma curva para cada amostra, pois o conteúdo de MPO presente no interior dos neutrófilos pode variar para cada indivíduo.

4.2.6. Ensaio de adesão em fluxo – Sistema *Cellix VenaFlux*TM

O *Cellix VenaFlux*TM é um sistema semiautomatizado, constituído de uma plataforma de microfluidos, biochips e um software de análise celular, que fornece um ensaio celular baseado em situações fisiológicas de fluxo contínuo, permitindo a realização de ensaios *in vitro* e mimetizando situações *in vivo* que ocorrem no fluxo sanguíneo. O campo da tecnologia de microfluidos tem despertado o interesse de biólogos, bioquímicos e biofísicos, pois esta tecnologia realiza experimentos *in vitro* com configurações realistas que são suficientemente simples para ser utilizada na prática laboratorial diária e permite aumentar a escala levando a uma maior compreensão em fisiologia celular e tecidual. Além disso, são necessárias menores quantidades de células e reagentes (Van der Meer *et al.*, 2009).

A plataforma utiliza um sistema de biochips com até oito canais (20 mm de comprimento e 400 a 800 µm de largura) que podem ser revestidos com moléculas de adesão recombinantes, proteínas da matriz extracelular (ex. fibronectina) ou monocamadas de células endoteliais (ex. HUVECs). Uma nanobomba é utilizada para emitir um fluxo contínuo, produzindo um cisalhamento (*shear stress* – que é a força exercida pelo fluxo sanguíneo em cada unidade de área de superfície endotelial (Toetsch *et al.*, 2009) de 0,01 – 20 dynes/cm², que desloca suspensões celulares pelo canal. Suspensões de diferentes tipos celulares ou até sangue total, podem ser aplicadas a cada canal sob um “*shear stress*” determinado e a adesão destas células ao canal pode ser observada através de um microscópio invertido.

A aquisição de imagens das células é feita por uma câmara fotográfica acoplada ao microscópio óptico invertido (*Carl Zeiss Axiovert CFL*), que permite também a visualização de células com marcação fluorescente e contraste de fase. Portanto, a plataforma oferece um meio de avaliar a adesão celular sob condições mais relevantes fisiologicamente e permite uma reprodução mais fidedigna dos mecanismos *in vivo*. A análise das imagens adquiridas pode ser feita através de um software (*DucoCell*TM) que quantifica parâmetros morfométricos das células.

Primeiramente para a realização dos experimentos de adesão em fluxo foi preciso preparar os biochips. Para o preparo do biochip com oito canais, adicionou-se 10µL de fibronectina (20 µg/mL) em cada canal, de forma que o canal ficasse completamente

preenchido e não formasse bolhas e em seguida, incuba-se este chip em uma câmara úmida à temperatura ambiente por duas horas. Decorrido este tempo, adicionou-se 10 µL em cada canal de BSA 1% (albumina sérica bovina) por 30 minutos, para bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação. Em seguida, o biochip foi acoplado à plataforma *Cellix VenaFlux* e os canais foram lavados duas vezes, automaticamente, com PBS 1X para que o excesso de BSA fosse retirado. Após todos estes processos, o biochip torna-se pronto para a passagem das suspensões de neutrófilos previamente tratados e para a avaliação da adesão das células.

Para o início do ensaio de adesão em fluxo foi dispensado 35 µL da suspensão celular (5×10^6 células/mL) de neutrófilos nos poços do biochip, e em seguida um fluxo (força de cisalhamento) de 0,5 dyne/cm² foi aplicado para a passagem da suspensão celular e deixou-se as células aderirem por 3 minutos.

Para a análise da adesão, as células foram fotografadas nos 10 segundos iniciais do fluxo e no tempo de 2 minutos e 40 segundos durante o fluxo produzido. Para a quantificação do número de células aderidas, foi feita uma média da quantidade total de células avaliando três diferentes posições do canal em um campo de visão de 94 mm² (265 µm x 353 µm).

4.2.7. Ensaio de viabilidade celular usando MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue)

Este método foi originalmente descrito por Mosman em 1983, e pode ser utilizado para medir citotoxicidade, proliferação e ativação celular. É um ensaio colorimétrico que se baseia na redução do MTT pelas desidrogenases mitocondriais de células vivas e tem sido usado como uma alternativa para as técnicas radioativas. A reação produz o sal formazan que é insolúvel em água, mas é solúvel em solventes orgânicos.

Inicialmente, as células (2×10^6 células/mL) foram pré-incubadas à 37°C, 5% CO₂ e ar úmido com a droga cuja citotoxicidade foi avaliada. Foi usado a sinvastatina nas concentrações de 1, 10 e 100 µM ou DMSO (veículo usado na diluição da sinvastatina) nas concentrações de 0.1 e 1%, por 30 minutos à 37°C, 5% de CO₂. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (10 minutos; 500g e temperatura ambiente) e os sobrenadantes desprezados para que a droga fosse retirada do meio e não provocasse

oxidação e foram ressuspensas em igual volume de meio. Como controle positivo, foi usada uma suspensão celular viável sem nenhum tipo de tratamento, e como controle negativo (células não viáveis), foi usada uma suspensão celular lisada por congelamento à 80°C negativos.

Em seguida 100 µL das amostras e 10 µL de MTT (5 mg/mL em PBS; concentração inicial; 1 parte para cada 9 partes da suspensão celular; filtrado em filtro 0,22 µm; protegido da luz), foram adicionados em duplicata, a uma placa de 96 poços (placa comum de ELISA). Essa placa foi incubada por 3 horas à 37°C, 5% CO₂, ar úmido, após a qual foi adicionado 100 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10% em HCl 0,01 M. Após a adição de SDS 10% foi realizada mais uma incubação de 18 horas à 37°C, 5% CO₂, ar úmido, e no final desta, foi realizado a leitura por um espectrofotômetro (Multiscan MS, Labsystems, EUA) a 540 nm.

4.2.8. Citometria de fluxo

A expressão da molécula de adesão L-selectina (CD62L) e das subunidades alfas das integrinas β₂: CD11a (LFA-1) e CD11b (Mac-1), foi detectada na superfície dos neutrófilos por citometria de fluxo. Foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais humanos: anti-CD62L conjugado ao fluorocromo PE, anti-CD11a conjugado ao fluorocromo FITC e o anti-CD11b conjugado ao fluorocromo PE-Cy7.

Para todos os anticorpos de superfície celular citados, o número de células foi de 1x10⁶ células por tubo num volume final de 100 µL de PBS. As células foram tratadas nas mesmas condições dos ensaios de adesão estática descrito anteriormente. Posteriormente as amostras foram centrifugadas (10 minutos, 1600 rpm e temperatura ambiente) para retirada das drogas e em seguida as células foram ressuspensas em igual volume de PBS. Os neutrófilos foram incubados com 3-5 µL dos anticorpos por 30 minutos a 4°C, na ausência de luz. Em seguida, estas células foram lavadas com 500 µL de PBS, fixadas em 500 µL de paraformaldeído 1% e conservadas a 4°C, ao abrigo de luz, até a aquisição pelo citômetro.

Estas células foram analisadas no aparelho *FACScalibur Becton-Dickinson* em comprimento de onda igual a 488nm. SSC/FSC (*side scatter/forward scatter*), *dot plots* foram usados para identificar a população de neutrófilos. A intensidade da fluorescência de

cada célula foi comparada com as células incubadas com um controle de isotipo negativo para quantificar a expressão das subunidades das moléculas de adesão.

Os resultados foram expressos como média de intensidade de fluorescência (MIF) que demonstra a média da quantidade, em unidades de fluorescência, da subunidade de integrina e da selectina expressa na superfície de cada célula, relativa às células incubadas com o anticorpo controle negativo e % de células positivas para cada marcador celular.

4.2.9. PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

4.2.9.1. Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA)

A extração do RNA das amostras celulares (5×10^6 à 1×10^7 células/mL) foi realizada com o RNeasy[®] mini kit (QIAGEN GmbH, Hilden), apropriado para extração de RNA de poucas células e foi realizado segundo as instruções do fabricante. As amostras de RNA obtidas foram submetidas à síntese de DNA complementar utilizando-se o kit *RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis kit* (Fermentas Life Sciences). Primeiramente 1µg de RNA que foi tratado com de 1U DNase I em 1x DNase *Reaction Buffer* (200mM Tris-HCl; pH7.5; 25mM MgCl₂; 1mM CaCl₂) e água suficiente para um volume final de 10µL de reação. As amostras foram incubadas por 30 minutos a 37°C e a reação bloqueada com a adição de 2,27mM EDTA, com posterior incubação por 5 minutos a 65°C. Após este tratamento, foi realizada a síntese de cDNA de acordo com as instruções do fabricante.

4.2.9.2 Desenho dos primers para qRT-PCR, Padronização das Reações e Eficiência da Reação

Os *primers* utilizados nas reações de PCR quantitativo em tempo real foram desenhados com o uso do site www.invitrogen.com e com o *software* “Primer Express” (Applied Biosystems). Os fragmentos desenhados foram submetidos ao programa *Blast* (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) para confirmar homologia com o gene de interesse. A formação de estruturas como *hairpins* e *dimers* também foram avaliadas através do programa Gene Runner. Os *primers* utilizados neste estudo estão listados no quadro abaixo (Quadro 1).

Quadro 1. Sequência dos primers utilizados, tamanho do fragmento amplificado e concentração ótima utilizada para amplificação gênica das Rho GTPases

Gene	Primers	Tamanho do fragmento amplificado	Concentração ótima
<i>RhoA – F</i> <i>RhoA – R</i>	5' AGGCTGGACTCGGATTCGTT 3' 5' TTCCACAGGCTCCATCACC 3'	81pb	300 nM
<i>Rac-1 – F</i> <i>Rac-1 – R</i>	5' AATGTCCGTGCAAAGTGGTATC 3' 5' CTTCAGTTTCTCGATCGTGTCTT 3'	117pb	150 nM
<i>BAC – F</i> <i>BAC – R</i>	5' AGGCCAACC GCGAGAAG 3' 5' ACAGCCTGGATAGCAACGTACA 3'	79pb	70 nM
<i>GAPDH – F</i> <i>GAPDH – R</i>	5' GCACCGTCAAGGCTGAGAAC 3' 5' CCACTTGATTTTGGAGGGATCT 3'	89pb	70 nM

Legenda: *F- primer forward, R- primer reverse, BAC- beta actina, GAPDH- gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase*

Em qRT-PCR, a concentração ideal de *primer* a ser utilizada deve ser a mínima suficiente para permitir a duplicação de todas as cópias do material a cada ciclo de reação. Para isso, utilizando a mesma quantidade de amostra, foram feitas reações contendo cada um dos *primers* (sense e anti-sense) nas concentrações finais de 70 nM, 150 nM, 300 nM. A concentração ideal foi aquela em que o gene de interesse obteve o menor valor de Ct (ciclo *threshold*), ou seja, foi a concentração em que o gene foi amplificado mais precocemente. No Quadro 1 estão listadas as concentrações dos *primers* utilizados na amplificação dos genes de estudo.

A confiabilidade e reprodutibilidade da PCR em tempo real estão diretamente relacionadas com a eficiência de reação. Assim, uma reação é realizada utilizando a concentração de *primer* selecionada e diluições seriadas de uma amostra, obtendo-se uma

curva cujo valor da inclinação (*slope*) é aplicado à fórmula $[10(-1/slope) - 1] \times 100 = 100\%$, resultando no valor percentual de eficiência de reação.

4.2.9.3. Técnica da reação da cadeia polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

A PCR em tempo real é uma técnica utilizada para a avaliação da expressão gênica. A expressão é dita relativa porque leva em consideração também a expressão de controles endógenos como *BAC* (gene constitutivo para beta actina) e *GAPDH*. A técnica consiste no monitoramento óptico da fluorescência emitida durante a reação de PCR, através da ligação de uma sonda específica ou um corante, na fita recém sintetizada.

As amostras de cDNAs utilizadas na reação de qRT-PCR foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoDrop[®], 260 nm). As reações foram feitas em duplicatas utilizando como sistema de detecção o reagente Platinum[®]SYBR[®]Green qPCR Super Mix-UDG with ROX (Applied Biosystems, USA), que além de conter todos os reagentes necessários para PCR (dNTP's, MgCl₂, tampão, Taq Dna-polimerase), contém o corante SYBR Green: uma molécula que emite maior quantidade de sinal fluorescente ao intercalar com DNA dupla fita, e com ROX: um estabilizador de fluorescência. Para cada gene analisado foram utilizados *primers* específicos.

A detecção da amplificação em tempo real foi realizada no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) em gráficos de fluorescência versus número de ciclos. Quanto maior a expressão de um determinado gene, isto é, quanto mais cópias existirem dele no início da reação, mais precocemente ocorrerá a amplificação e consequentemente, menor será o Ct.

Todas as amostras foram ensaiadas em 12 µL de volume final, sendo 6 µL do reagente SYBR Green with ROX[®], 10 ng para os genes de interesse e a concentração ótima de *primer* determinada. Todas as placas continham controles negativos (NTC) para cada *primer* avaliado, que são poços contendo água estéril em substituição à amostra. As reações foram realizadas em placas de 96 poços (Sorenson, BioScience Inc.) com tampas plásticas que permitem a passagem da luz. O programa foi iniciado a 95°C/10 minutos, seguido de 40 ciclos: 95°C/15 segundos e 60°C/1 minuto.

Ao final de uma aplicação normal adiciona-se um passo de 20 minutos, em que a temperatura aumenta gradualmente de 60° para 95°C. À medida que os produtos gerados por PCR desnaturam com o aumento de temperatura, cai o sinal fluorescente do SYBR Green. O gráfico resultante permite verificar se há um ou mais produtos de PCR presentes em cada reação, devido a diferenças de Tm (temperatura de *melting*) entre os produtos de PCR causadas pelo número e composição de bases de cada produto. A representação da curva de dissociação está apresentada na figura 6.

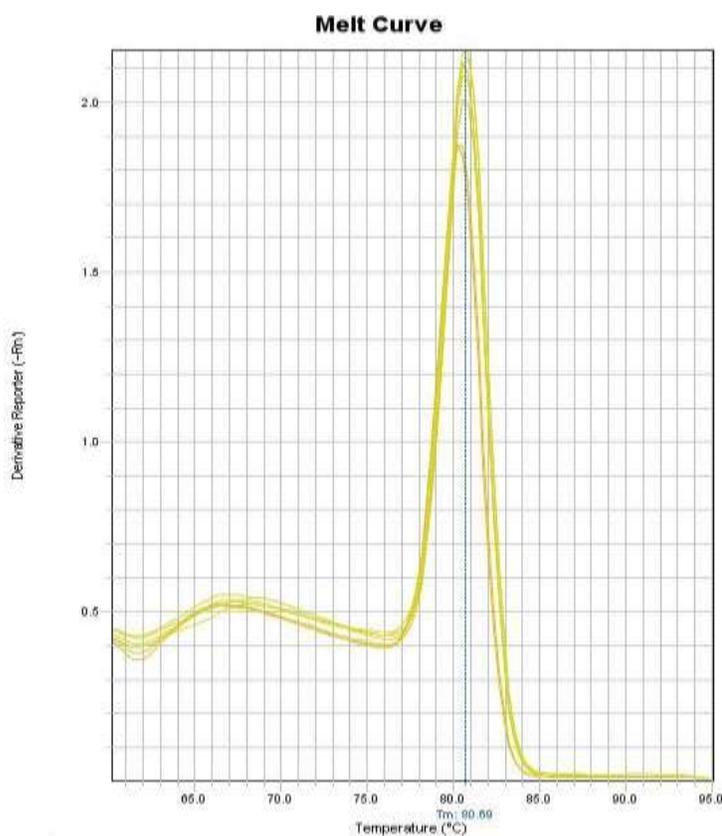


Figura 6: Curva de dissociação do primer da RhoA.

4.2.9.4. Análise dos dados da qRT-PCR

A expressão dos genes de interesse foi determinada de forma relativa, ou seja, os valores de expressão são normalizados em relação a genes chamados de “controles endógenos”. Neste trabalho foi utilizado o gene da Beta actina (β -actina) e GAPDH, que são genes cuja expressão é dita constitutiva, ou seja, apresentam pouca variação entre diversas condições (Vandesompele *et al.*, 2002).

Os valores de Ct de cada gene foram obtidos em duplicata, dessa forma, foram calculadas as médias aritméticas destas, para cada amostra que teve um determinado gene estudado. Em seguida foi obtido o valor de delta Ct (ΔCt), que consistiu na subtração do menor Ct de um gene de uma determinada amostra com os demais Cts desse mesmo gene de outras amostras estudadas. O próximo cálculo foi o de “Q”, valor que corresponde a $2^{\Delta Ct}$.

Os valores de Q dos genes Beta actina e GAPDH de cada amostra analisada foram submetidos ao programa geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002), que calculou a média geométrica entre eles, valor este denominado de Fator de Normalização da amostra. A expressão normalizada de um dado gene de interesse em uma determinada amostra foi dada pela razão entre o valor de Q do gene de interesse da amostra pelo fator de normalização da amostra. O valor obtido foi expresso em unidades arbitrárias (UA) ou valor absoluto de expressão.

4.3. Análise estatística

Os dados foram expressos pelas médias \pm erro da média (SEM) de *N* de indivíduos. As médias foram comparadas, utilizando o teste paramétrico *ANOVA “repeated measures”* seguido de *Bonferroni Multiple Comparisons Test*. Os gráficos e os cálculos foram obtidos utilizando o programa *GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.)*. Os valores de *p* menores ou igual a 0,05 foram considerados como estatisticamente significantes.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito dos estímulos inflamatórios na adesão dos neutrófilos

Previamente aos ensaios de adesão de neutrófilos usando drogas moduladoras da via do NO-GMPC e de Rho GTPases foi realizada a padronização dos estímulos inflamatórios utilizados IL-8 e TNF- α . Ambos os estímulos mostraram-se potentes em aumentar as propriedades adesivas dos neutrófilos à FN. Como pode ser visto o estímulo com IL-8 (Figura 7A) aparentemente induz uma adesão menos acentuada do que o TNF- α (Figura 7B). Este achado pode indicar que estas duas citocinas possivelmente modulam a adesão de neutrófilos por vias distintas. Para a realização de todos os experimentos deste projeto, envolvendo estímulos com estas citocinas, foram usadas as concentrações de 500 ng/mL e 200 ng/mL de IL-8 e TNF- α , respectivamente.

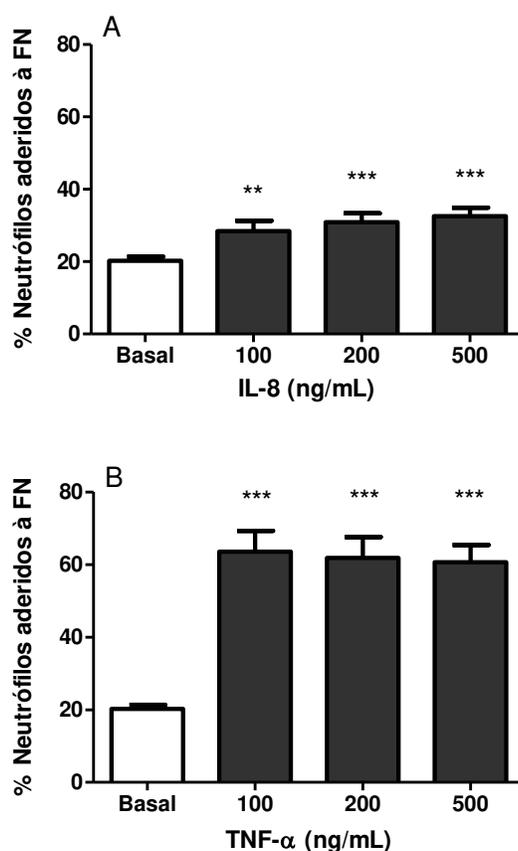


Figura 7: Adesão de neutrófilos após incubação com diferentes concentrações de estímulos inflamatórios de IL-8 (A) e TNF- α (B), n=6. Neutrófilos foram incubados por 30 minutos a 37°C, em estufa a 5% CO₂, em placas previamente cobertas com FN (20 μ g/mL). Resultados expressos em média \pm erro da média. **p<0,01; ***p<0,001 comparado ao basal determinado por ANOVA (*repeated measures*) seguido de *Bonferroni Multiple Comparisons Test*.

5.2. Avaliação do papel da via de sinalização dependente de óxido nítrico no mecanismo de adesão de neutrófilos sob estímulos inflamatórios

5.2.1. Efeito dos inibidores de NOS na adesão de neutrófilos na presença e ausência de estímulos inflamatórios

As propriedades adesivas dos neutrófilos foram avaliadas em indivíduos saudáveis, através do ensaio de adesão celular estática *in vitro*, utilizando fibronectina (FN) como ligante. Foi comparada a adesão de neutrófilos (2×10^6 células/mL) previamente tratados com L-NAME (0,01, 0,1 e 1 mM), um inibidor de NOS, e com o 1400W (1, 10, e 100 μ M), um inibidor específico de iNOS, na presença e ausência de estímulos inflamatórios de TNF- α (200ng/mL) ou IL-8 (500ng/mL).

O L-NAME (Figura 8A) e o 1400W (Figura 8B) foram capazes de aumentar significativamente a adesão dos neutrófilos na ausência de estímulo inflamatório, quando comparado a adesão basal. O veículo da droga 1400W, o DMSO (dimetilsulfóxido), não teve efeito significativo sobre a adesão dos neutrófilos.

Também foi avaliada a adesão dos neutrófilos com L-NAME, sob estimulação inflamatória com IL-8 (Figura 8C) e TNF- α (Figura 8D) e com 1400W nas mesmas condições (Figura 8E e Figura 8F). Observou-se aumento da adesão dos neutrófilos sob condições inflamatórias e na presença dos inibidores de NOS (aumento similar ao observado na ausência destes inibidores). Desta forma estes resultados indicam que as citocinas IL-8 ou TNF- α aparentemente não aumentam a adesão dos neutrófilos por aumentar a atividade de NOS.

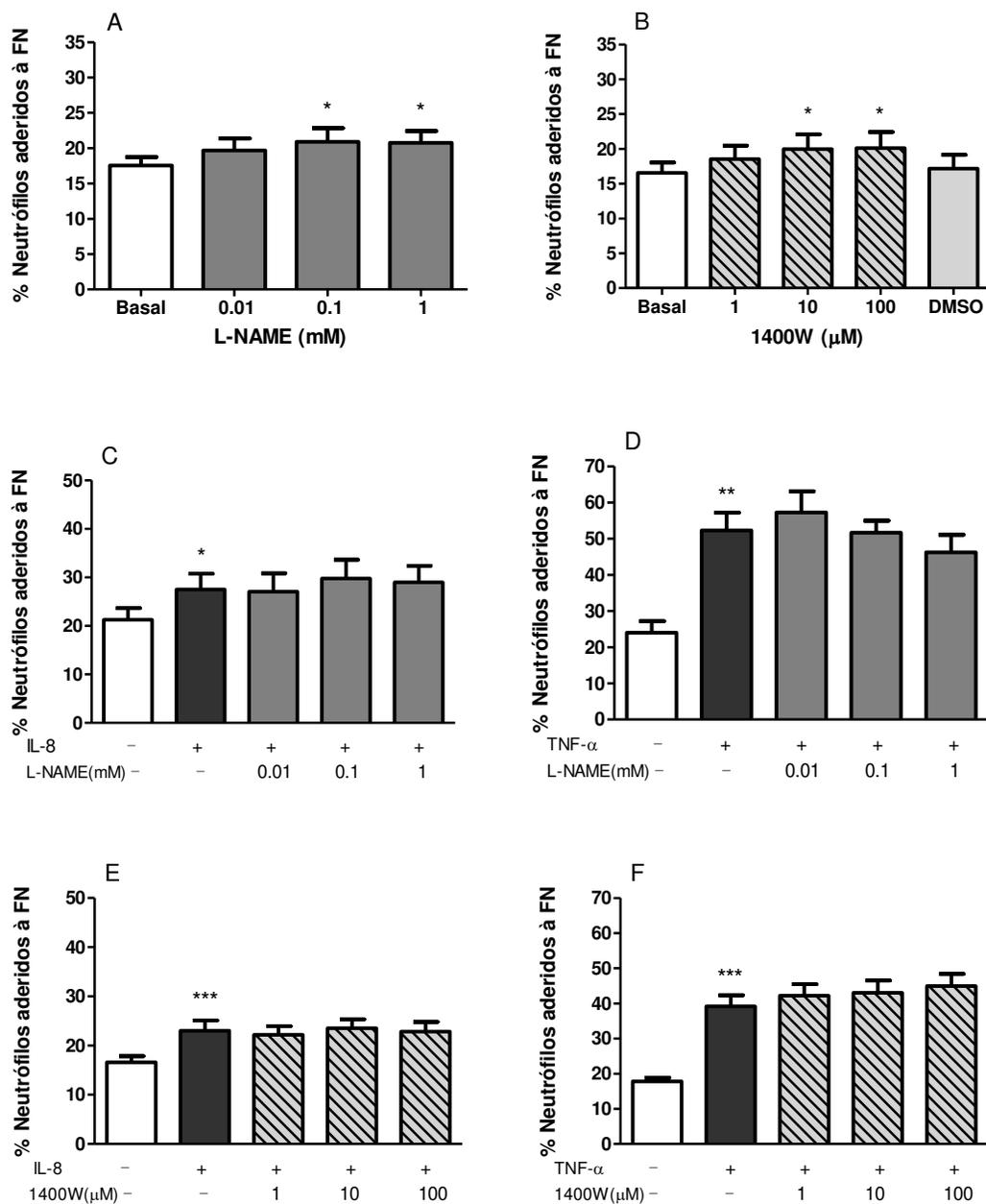


Figura 8: Adesão de neutrófilos após incubação com inibidores de NOS, L-NAME, n=8 (A), e 1400W, n=12 (B); na presença de IL-8 (500 ng/mL) (C e E), n=9 e 15, respectivamente; ou TNF-α (200 ng/mL) (D e F), n=9 e 13, respectivamente. Neutrófilos foram incubados por 30 minutos a 37°C, em estufa a 5% CO₂, em placas previamente cobertas com FN (20 μg/mL). Resultados expressos em média ± erro da média. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 comparado ao basal determinado por ANOVA (*repeated measures*) seguido de *Bonferroni Multiple Comparisons Test*.

5.2.2. Efeito do doador de NO, nitroprussiato de sódio, nas propriedades adesivas dos neutrófilos sob estímulo inflamatório de TNF- α

As propriedades adesivas dos neutrófilos também foram avaliadas tratando as células com o nitroprussiato de sódio (SNP), um doador de óxido nítrico, na presença ou ausência de TNF- α (200 ng/mL). Não foi observada nenhuma alteração nas propriedades adesivas dos neutrófilos, mesmo sob estímulo inflamatório, na presença das concentrações de SNP utilizadas (Figura 9).

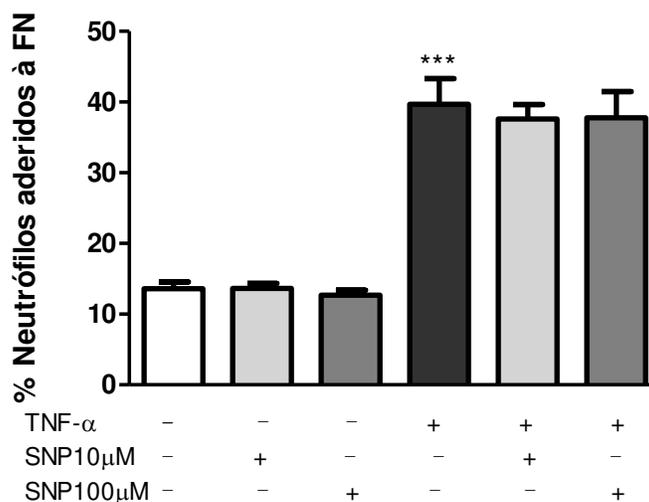


Figura 9: Adesão de neutrófilos após adição de SNP (10 e 100 μ M) na presença e ausência de TNF- α (200 ng/mL) (n=7). Neutrófilos foram incubados por 30 minutos a 37°C, em estufa a 5% CO₂, em placas previamente cobertas com FN (20 μ g/mL). Resultados expressos em média \pm erro da média. ***p<0,01 comparado com a adesão basal determinado por ANOVA (*repeated measures*) seguido de *Bonferroni Multiple Comparisons Test*.

5.2.3. Efeito do estimulador de guanilato ciclase, BAY 41-2272 na adesão de neutrófilos sob estímulos inflamatórios

Para avaliar se a via NO-GMPc participa do mecanismo pelo qual as citocinas, IL-8 e TNF- α , aumentam as propriedades adesivas dos neutrófilos, estas células foram incubadas com BAY 41-2272, um estimulador de guanilato ciclase. O uso das concentrações de 150 e 200 nM de BAY 41-2272 reduziu significativamente as propriedades adesivas dos neutrófilos (Figura 10A), sob condições basais. O veículo usado na diluição da droga, o DMSO, não teve efeito significativo sobre a adesão dos neutrófilos. No entanto esta droga

não alterou a adesão de neutrófilos na presença de estímulos inflamatórios de IL-8 (Figura 10B) e TNF- α (Figura 10C) *in vitro*.

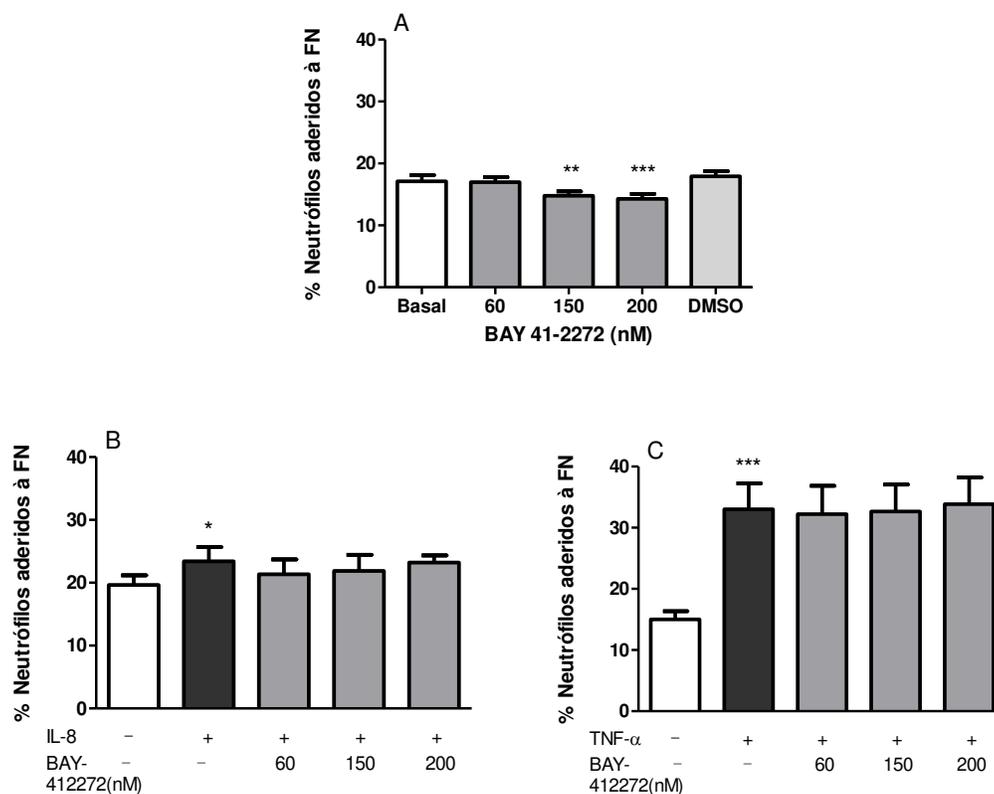


Figura 10: Adesão de neutrófilos após incubação com BAY 41- 2272, n=12 (A); na presença de IL-8 (500 ng/mL), n=3 (B); ou TNF- α (200 ng/mL), n=7 (C). Neutrófilos foram incubados por 30 minutos a 37°C, em estufa a 5% CO₂, em placas previamente cobertas com FN (20 μ g/mL). Resultados expressos em média \pm erro da média. *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001 comparado ao basal determinado por ANOVA (*repeated measures*) seguido de *Bonferroni Multiple Comparisons Test*.

5.3. Avaliação do papel das Rho GTPases no mecanismo de adesão dos neutrófilos sob estímulos inflamatórios

5.3.1. Efeito do inibidor de ROCK, Y-27632, na adesão de neutrófilos sob estímulos inflamatórios

Neutrófilos foram incubados com Y-27632 nas concentrações de 10, 20, 50 e 100 μ M na ausência e presença do estímulo de TNF- α . Sob condições basais este composto aumentou significativamente a adesão dos neutrófilos à fibronectina (Figura 11A). No entanto na presença do estímulo de TNF- α o tratamento com o Y-27632 mostrou não

modular a adesão dos neutrófilos (Figura 11B). Este resultado sugere que a enzima ROCK, um efetor de RhoA, tenha um papel na regulação e inibição da adesão dos neutrófilos.

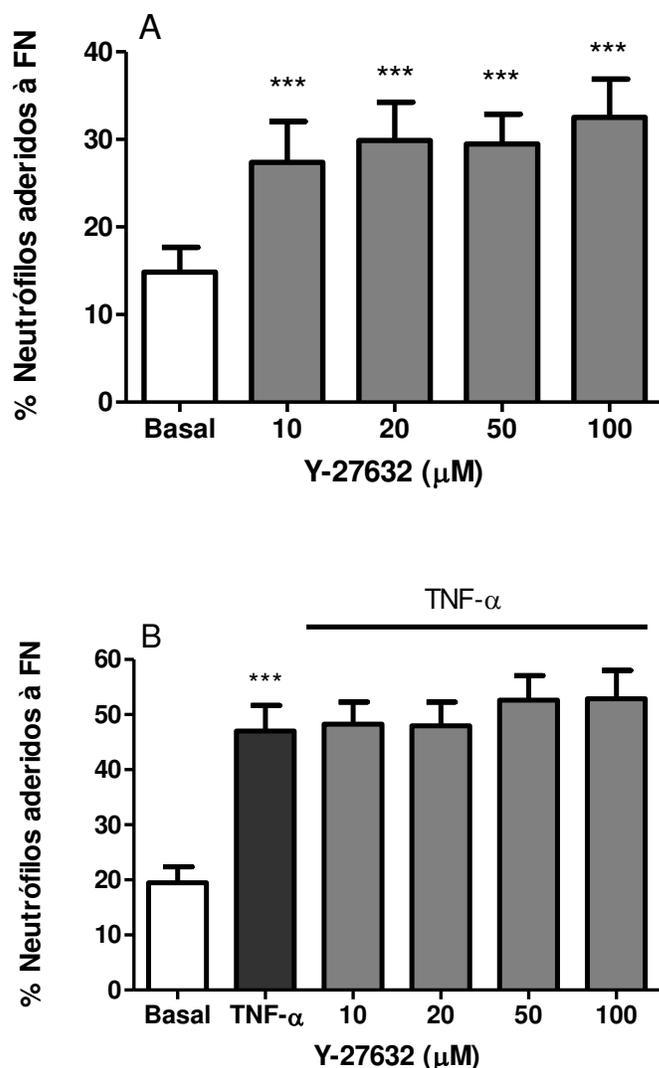


Figura 11: Efeito do Y-27632 na adesão de neutrófilos, n=5 (A) e sob estímulo de TNF- α , n=4 (B). Neutrófilos foram incubados por 30 minutos a 37°C, em estufa a 5% CO₂, em placas previamente cobertas com FN (20 μ g/mL). Resultados expressos em média \pm erro da média. **p<0,01; ***p<0,001 comparado com o basal determinado por ANOVA (*repeated measures*) seguido de *Bonferroni Multiple Comparisons Test* comparado ao basal.

5.3.2. Efeito do inibidor de Rac1, NSC 23766, na adesão de neutrófilos sob estímulos inflamatórios

Os neutrófilos foram tratados com NSC 23766 (10, 50 e 100 μ M) e foi observado que a concentração de 100 μ M aumentou levemente a adesão dos neutrófilos quando

comparado ao basal (Figura 12A) e, de modo interessante, o uso desta droga sob estímulo de TNF- α diminuiu minimamente a porcentagem de adesão nos neutrófilos (Figura 12B), entretanto o mesmo não foi observado com o estímulo de IL-8 (Figura 12C).

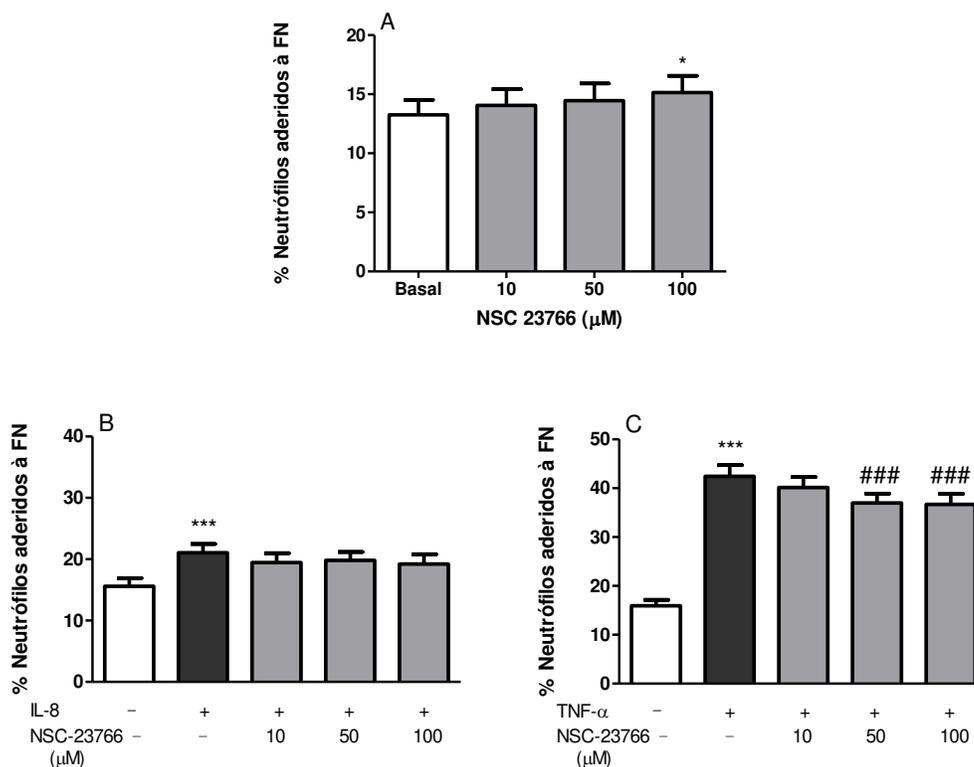


Figura 12: Adesão de neutrófilos após incubação com NSC-23766, n=15 (A); e sob estímulos inflamatórios com IL-8 (500 ng/mL), n=14 (C); ou de TNF- α (200 ng/mL), n=19 (B). Neutrófilos foram incubados por 30 minutos a 37°C, em estufa a 5% CO₂, em placas previamente cobertas com FN (20 μ g/mL). Resultados expressos em média \pm erro da média. *p<0,05; ***p<0,001 comparado ao basal e ###p<0,001 comparado ao TNF- α determinado por ANOVA (*repeated measures*) seguido de *Bonferroni Multiple Comparisons Test*.

5.4. Efeito da sinvastatina nas propriedades adesivas dos neutrófilos na presença e na ausência de estímulos inflamatórios

5.4.1. Efeito da sinvastatina na viabilidade celular

Como não foi observado nenhum efeito de drogas ativadoras/inibidoras da via do NO-GMPc nos mecanismos de adesão de neutrófilos sob estímulo inflamatório, decidimos investigar o efeito da droga sinvastatina, nestas propriedades, pois esta droga, da classe das estatinas, possui efeitos pleiotrópicos que podem ser intermediados pelas proteínas Rho

GTPases e também possivelmente pela via do NO. Antes da realização do ensaio de adesão estática, utilizando neutrófilos tratados com sinvastatina, foi realizado o ensaio de viabilidade celular para verificar quais concentrações da sinvastatina não afetariam a viabilidade celular e conseqüentemente poderiam ser utilizadas no ensaio.

O ensaio de redução do MTT (*3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue*) mostrou que a sinvastatina nas concentrações de 1 e 10 μM e o veículo usado da diluição da droga, o DMSO, não causaram nenhum efeito tóxico aos neutrófilos quando comparado aos neutrófilos viáveis, que não receberam nenhum tratamento. No entanto, o mesmo não aconteceu com a concentração de 100 μM , que conferiu alta toxicidade as células. Os resultados do ensaio são apresentados a seguir, veja Tabela 1.

Tabela 1: Efeito de diferentes concentrações de sinvastatina na viabilidade de neutrófilos, de acordo com ensaio de MTT

<i>Droga</i>	<i>Concentração</i>	<i>"Redução de MTT"</i> <i>(OD/4 \times 10⁶ cel.ml⁻¹)</i>
Neutrófilos viáveis		0.161 \pm 0.013
Veículo (DMSO)	0.1%	0.159 \pm 0.010
Veículo (DMSO)	1%	0.146 \pm 0.012
Sinvastatina	1 μM	0.165 \pm 0.019
Sinvastatina	10 μM	0.132 \pm 0.015
Sinvastatina	100 μM	0.055 \pm 0.001***

Dados representam média dos valores \pm EPM de 5 experimentos (em duplicata). *** $p < 0,001$ comparado aos neutrófilos viáveis determinado por ANOVA (*repeated measures*) seguido de Bonferroni Multiple Comparisons Test comparado ao basal.

5.4.2. Efeito da sinvastatina nas propriedades adesivas dos neutrófilos na presença e ausência de estímulos inflamatórios

Foram avaliadas as propriedades adesivas dos neutrófilos após o tratamento com sinvastatina (0,1, 1, 10 μM) sob condição basal e na presença ou ausência de estímulos

inflamatórios. Foi observado que sob condições basais a sinvastatina não alterou a adesão dos neutrófilos (Figura 13A). A sinvastatina foi capaz de diminuir significativamente a adesão dos neutrófilos na presença do estímulo de TNF- α , quando comparado à incubação com TNF- α apenas (Figura 13B).

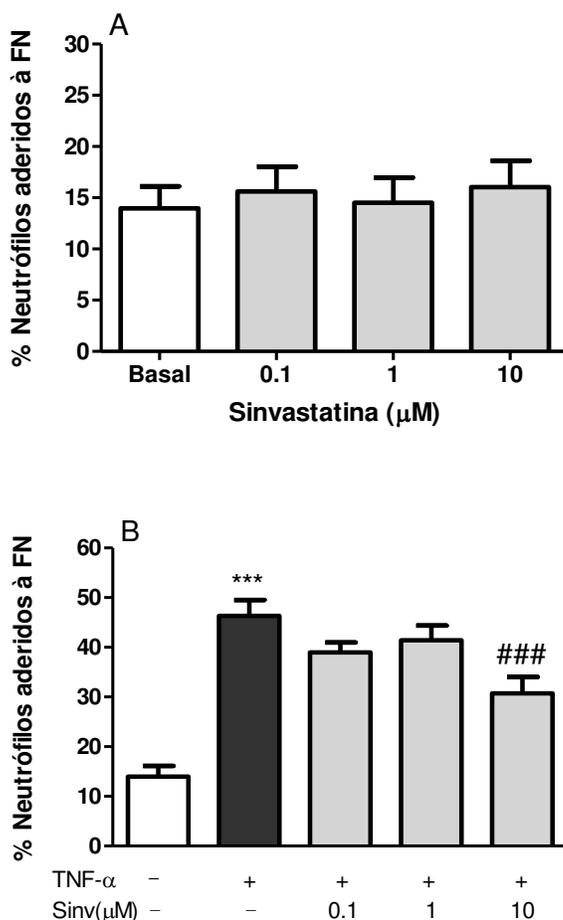


Figura 13: Adesão de neutrófilos incubados com sinvastatina (sinv), n=7 (A); e sob estímulo de TNF- α (200 ng/mL), n=7 (B). Neutrófilos foram incubados por 30 minutos a 37°C, em estufa a 5% CO₂, em placas previamente cobertas com FN (20 $\mu\text{g/mL}$). Resultados expressos em média \pm erro da média. ***p<0,001 comparado ao basal e ###p<0,001 comparado ao TNF- α determinado por ANOVA (*repeated measures*) seguido por *Bonferroni Multiple Comparisons Test* quando comparado ao TNF- α .

5.4.3. Efeito do mevalonato, GGPP e FPP na inibição adesão de neutrófilos pela sinvastatina na presença de TNF- α

Como mostrado anteriormente, a sinvastatina tem a capacidade de diminuir as propriedades adesivas dos neutrófilos quando estes são estimulados com TNF- α . Para determinar se o mecanismo pelo qual a sinvastatina inibe a adesão dos neutrófilos sob estímulo inflamatório é intermediado pela inibição da via do mevalonato e consequentemente dos isoprenóides desta via, as células foram incubadas com sinvastatina (10 μ M) e coincubadas com mevalonato (250 μ M) e com GGPP (10 μ M) ou FPP (10 μ M).

Os resultados mostram que em condições basais o mevalonato, o GGPP e o FPP não alteram as propriedades adesivas dos neutrófilos (Figura 14A). Por outro lado, mediante incubação com sinvastatina (10 μ M) e estímulo com TNF- α , o mevalonato diminuiu a adesão dos neutrófilos quando comparado ao efeito da sinvastatina sob condição de inflamação, porém nenhuma alteração significativa foi observada quando as células foram coincubadas com sinvastatina, GGPP e FPP sob estímulo de TNF- α (Figura 14B).

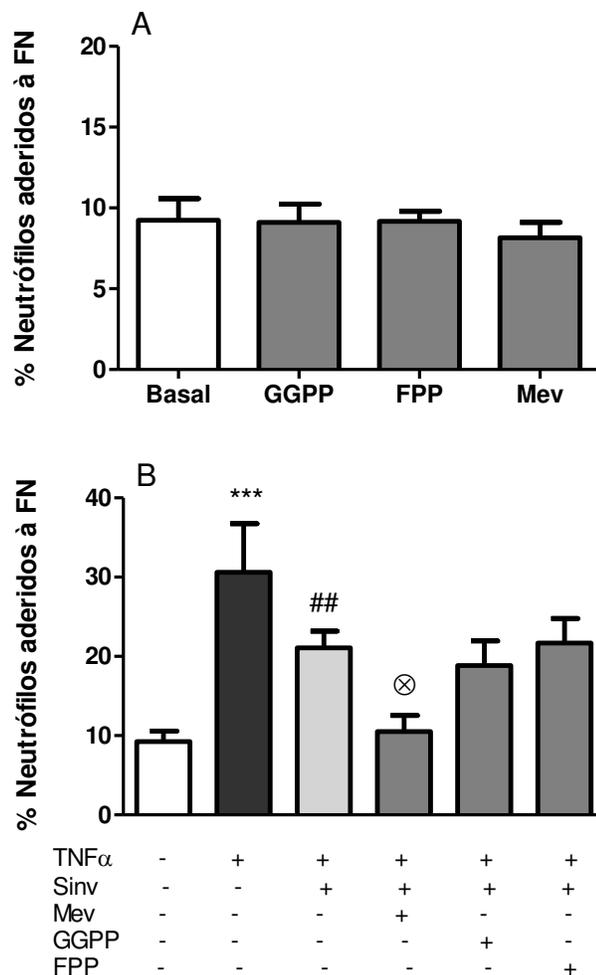


Figura 14: Adesão de neutrófilos incubados com mevalonato (Mev) (250 μ M), GGPP (10 μ M) e FPP (10 μ M) sob condições basais, n= 3 (A); incubados com sinvastatina (Sinv) (10 μ M) e co-incubados com mevalonato, GGPP e FPP sob estímulo inflamatório de TNF- α (200ng/mL), n=5 (B). Neutrófilos foram incubados por 30 minutos à 37°C, em estufa a 5% CO₂, em placas previamente cobertas com FN (20 μ g/mL). Resultados expressos em média \pm erro da média. *p<0,001 comparado ao basal; ##p<0,01 comparado ao TNF- α ; ⊗, p<0,05 comparado a sinvastatina com estímulo de TNF- α determinado por ANOVA (*repeated measures*) seguido de *Bonferroni Multiple Comparisons Test*.**

5.4.4. Efeito da sinvastatina e do Y-27632 na adesão de neutrófilos sob condições inflamatórias

A fim de avaliar outra possível via de sinalização envolvendo o efeito da sinvastatina testamos o tratamento combinado de Y-27632 com a sinvastatina. Foi

observado que o Y-27632 (20 μ M) foi capaz de aumentar significativamente a adesão dos neutrófilos uma vez diminuída pelo efeito da sinvastatina (10 μ M) sob estímulo de TNF- α 200 ng/mL (Figura 15A), porém o mesmo não foi observado com o estímulo de IL-8 500 ng/mL (Figura 15B).

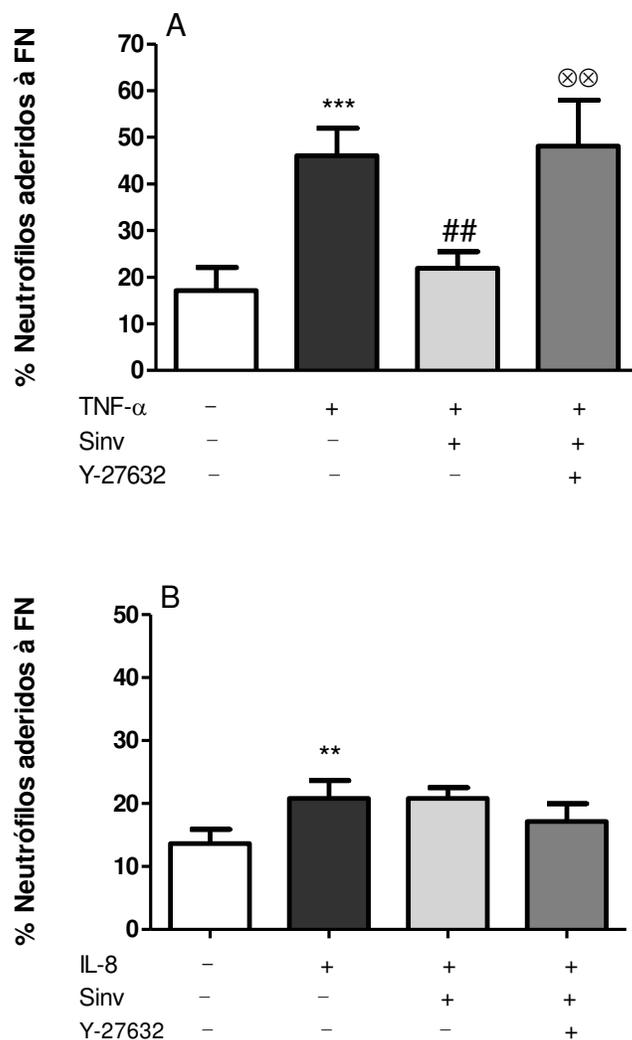


Figura 15: Adesão de neutrófilos de indivíduos saudáveis pré-tratados com sinvastatina (sinv) 10 μ M e co-incubados com Y-27632 (20 μ M) sob estímulo inflamatório de TNF- α (200 ng/mL), n=8 (A) e IL-8 (500 ng/mL), n= 6 (B). Neutrófilos foram incubados por 30 minutos a 37°C, em estufa a 5% CO₂, em placas previamente cobertas com FN (20 μ g/mL). Resultados expressos em média \pm erro da média. *p<0,001 comparado ao basal; ##p<0,01 comparado ao TNF- α ; ⊗⊗p<0,01 comparado ao grupo tratado com sinvastatina e TNF- α determinado por ANOVA (repeated measures) seguido de Bonferroni Multiple Comparisons Test.**

5.4.5. Efeito da sinvastatina e dos inibidores de NOS, L-NAME ou 1400W, na adesão de neutrófilos sob estímulo inflamatório do TNF- α

Adicionalmente foi avaliado se inibidores de NOS, podem reverter o efeito da diminuição da adesão mediado pela sinvastatina. Foi observado que sob o estímulo de TNF- α , o L-NAME, não aumenta a porcentagem de adesão celular quando comparado ao efeito da sinvastatina (Figura 16A). O 1400W tende a ter um aumento da adesão celular quando comparado a sinvastatina, porém este aumento não é estatisticamente significativo (Figura 16B).

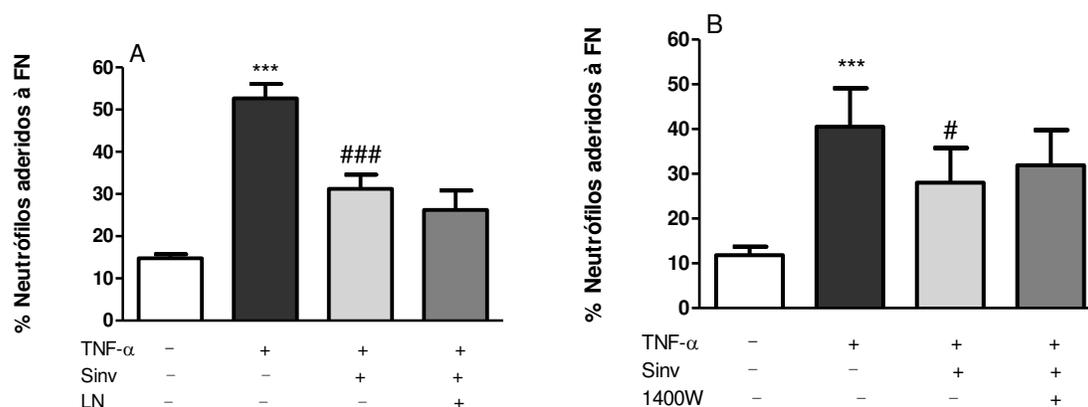


Figura 16: Adesão de neutrófilos de indivíduos saudáveis tratados com sinvastatina 10 μ M e co-incubados com L-NAME (1 mM) (A) n= 7; ou 1400W (100 μ M) (B) n= 6; sob estímulo inflamatório de TNF- α (200 ng/mL). Neutrófilos foram incubados por 30 minutos a 37°C, em estufa a 5% CO₂, em placas previamente cobertas com FN (20 μ g/mL). Resultados expressos em média \pm erro da média. **p<0,01; *p<0,001 determinado comparado ao basal; #p< 0,05; ###p<0,001 quando comparado ao TNF- α determinado por ANOVA (*repeated measures*) seguido de *Bonferroni Multiple Comparisons Test*.**

5.5. Efeito da sinvastatina e do Y-27632, na adesão de neutrófilos, na ausência e na presença de TNF- α , sob condições de fluxo

Ensaio de adesão em fluxo foram realizados usando as mesmas condições de tratamento dos ensaios de adesão estática, com a finalidade de avaliar a reprodutibilidade de alguns experimentos em fluxo. Os ensaios de adesão em fluxo são considerados mais relevantes fisiologicamente, pois mimetizam as condições de fluxo, o diâmetro do canal (400 μ m) do chip é proporcional ao calibre dos vasos pequeno e pode promover ligações de alta afinidade.

Os resultados mostram que a adesão dos neutrófilos sob fluxo reproduz parcialmente os resultados obtidos nos ensaios de adesão estática, *in vitro*. Pode-se observar que, em condição basal, a sinvastatina (10 μ M) não altera as propriedades adesivas dos neutrófilos (Figura 17A). Observou-se também que o uso do inibidor de ROCK, Y-27632 (20 μ M) aumentou significativamente a adesão dos neutrófilos à fibronectina (Figura 17B), corroborando os resultados de adesão estática. Quando os neutrófilos são submetidos ao estímulo de TNF- α a adesão aumenta significativamente e com o uso da sinvastatina a adesão tende a diminuir, porém essa diminuição não foi significativa. A cocubação da sinvastatina e do Y-27632 sob estímulo de TNF- α não manteve o mesmo perfil do observado nos ensaios de adesão estática, ou seja, o Y-27632 não foi capaz de reverter o efeito da sinvastatina sob estimulação inflamatória sob condição de fluxo (Figura 17C).

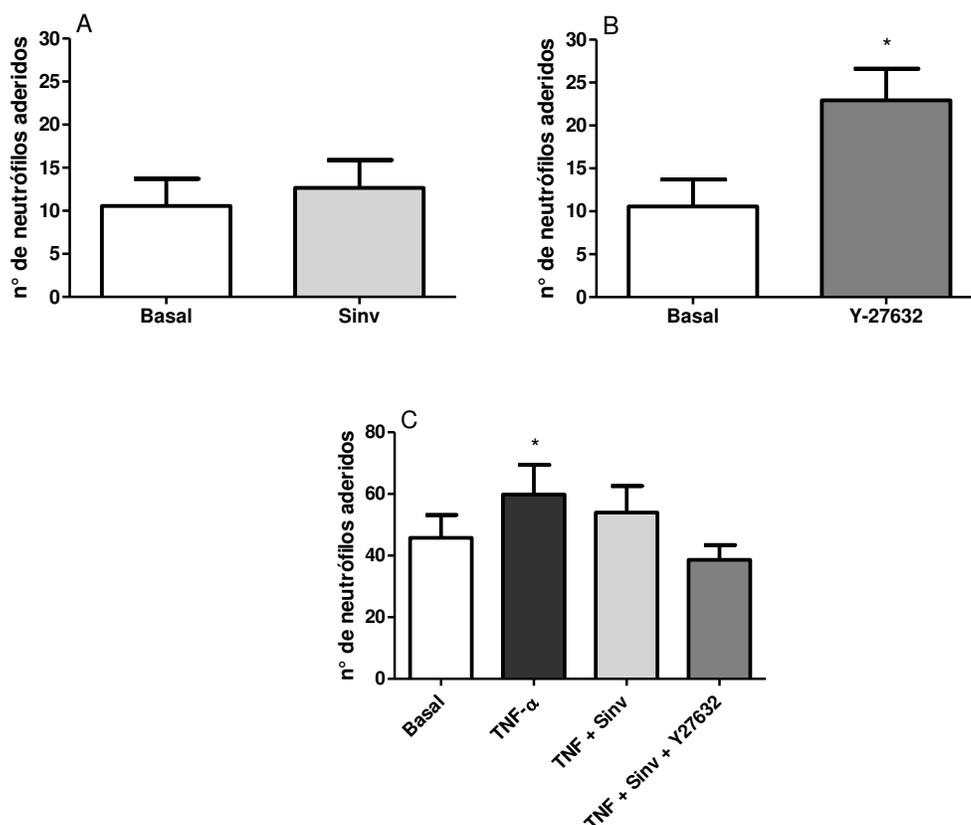


Figura 17. Adesão de neutrófilos de indivíduos saudáveis (5×10^6 células/mL) à FN (20 μ g/mL) por 3 minutos, sob força de cisalhamento de 0,5 d/cm² e 37°C. Neutrófilos foram tratados com sinvastatina (Sinv) (10 μ M) (A); Y-27632 (20 μ M) (B) e co-tratados com sinvastatina e Y-27632 sob estímulo de TNF- α (200 ng/mL) (C), n = 6. O número de células aderidas foi determinado num campo de visão de 94 mm² (265 μ m x 353 μ m).

5.6. Avaliação da expressão, na superfície de neutrófilos, das moléculas de adesão L-selectina, LFA-1 e Mac-1 por citometria de fluxo

5.6.1. Efeito do Y-27632 na expressão das moléculas de adesão L-selectina, LFA-1 e Mac-1

A expressão de L-selectina (CD62L) e das subunidades alfa das integrinas LFA-1 (CD11a/CD18) e Mac-1 (CD11b/CD18) na superfície de neutrófilos, foi determinada por citometria de fluxo. O resultado foi expresso como média de intensidade de fluorescência (MIF) dos neutrófilos positivos para o marcador fluorescente destas proteínas e a porcentagem de células positivas foi de aproximadamente 70% para L-selectina e 99,9% para LFA-1 e Mac-1 em todos os experimentos (representação através de um histograma da citometria de fluxo no Apêndice II).

O tratamento com diferentes concentrações (10, 20, 50 e 100 μM) do inibidor de ROCK, o Y-27632, não alterou a expressão de L-selectina e LFA-1. Porém, pode-se notar um pequeno aumento na expressão de Mac-1, que foi estatisticamente significativo quando os neutrófilos foram tratados com Y-27632 na concentração de 100 μM ($p < 0,01$) como mostra a Tabela 2.

Tabela 2: Expressão das moléculas de adesão celular: CD62L, CD11a e CD11b em neutrófilos tratados com diferentes concentrações de Y-27632

	CD62L	CD11a	CD11b
Basal (n=7)	5951 \pm 1132	1564 \pm 177.1	5800 \pm 556.3
Y-27632 10 μM (n=7)	6085 \pm 1077	1546 \pm 166.7	5976 \pm 505.8
Y-27632 20 μM (n=7)	6077 \pm 994	1552 \pm 165.9	5930 \pm 357.3
Y-27632 50 μM (n=7)	6495 \pm 1118	1586 \pm 172.5	6514 \pm 525.6
Y-27632 100 μM (n=7)	6050 \pm 1213	1613 \pm 185.8	7364 \pm 682.7**

Os resultados da expressão das moléculas de adesão estão representados como média de intensidade de fluorescência (MIF) de anticorpo ligado para cada neutrófilo \pm erro médio padrão (SEM). As comparações em cada coluna foram feitas com o grupo marcado com símbolo em vermelho. ** $p < 0,01$ determinado por ANOVA (*repeated measures*) seguido de Bonferroni Multiple Comparisons Test quando comparado ao basal.

5.6.2. Efeito do NSC23766 na expressão das moléculas de adesão L-selectina, LFA-1 e Mac-1 na ausência e na presença de TNF- α

Quando os neutrófilos foram tratados com o NSC 23766 (50 μ M), não observou-se diferença na expressão das moléculas de adesão na superfície dos neutrófilos em condições basais. Também não foi observada alteração da expressão das moléculas de adesão quando os neutrófilos foram incubados com o NSC23766 sob estímulo inflamatório de TNF- α (200 ng/mL) (Tabela 3). Esses resultados possivelmente indicam que Rac1 não modula a expressão destas moléculas no processo adesivo dos neutrófilos.

Tabela 3: Expressão das moléculas de adesão celular: CD62L, CD11a e CD11b em neutrófilos tratados com NSC 23766 na presença e na ausência de TNF- α

	CD62L <i>MIF\pmSEM</i>	CD11a <i>MIF\pmSEM</i>	CD11b <i>MIF\pmSEM</i>
Basal	6162 \pm 1327 (n=6)	1444 \pm 29.43 (n=4)	6195 \pm 374.9 (n=6)
TNF- α	4197 \pm 9127* (n=6)	1577 \pm 107.7 (n=4)	8361 \pm 435.5* (n=6)
NSC 23766	5815 \pm 1284 (n=6)	1466 \pm 103.1 (n=4)	6450 \pm 690.4 (n=6)
NSC23766 + TNF- α	3612 \pm 933 (n=6)	1546 \pm 76.78 (n=4)	10246 \pm 1188 (n=6)

Os resultados da expressão das moléculas de adesão estão representados como média de intensidade de fluorescência (MIF) de anticorpo ligado para cada neutrófilo \pm erro médio padrão (SEM). As comparações em cada coluna foram feitas com o grupo marcado com símbolo em vermelho. *p<0,05 determinado por ANOVA (*repeated measures*) seguido de Bonferroni Multiple Comparisons Test quando comparado ao basal.

5.6.3. Efeito da sinvastatina na ausência e na presença de estímulo inflamatório na expressão das moléculas de adesão L-selectina, LFA-1 e Mac-1

A expressão das moléculas de adesão na superfície dos neutrófilos tratados com diferentes concentrações de sinvastatina (Sinv) não demonstraram diferenças na expressão das proteínas L-selectina, LFA-1 e Mac-1 na superfície dos neutrófilos, quando comparados às células sem tratamento (grupo basal) (Tabela 4). Esses resultados indicam

que a sinvastatina não modula a expressão de moléculas de adesão na superfície dos neutrófilos na ausência de estímulo inflamatório.

Tabela 4: Expressão das moléculas de adesão celular: CD62L, CD11a e CD11b em neutrófilos com diferentes concentrações de sinvastatina

	CD62L <i>MIF±SEM</i>	CD11a <i>MIF±SEM</i>	CD11b <i>MIF±SEM</i>
Basal	6048 ± 1128 (n=7)	1425 ± 29.39 (n=5)	6178 ± 317.4 (n=7)
Sinv 0.1 µM	6085 ± 1169 (n=7)	1396 ± 39.03 (n=5)	6369 ± 504.3 (n=7)
Sinv 1 µM	5438 ± 1139 (n=7)	1385 ± 47.37 (n=5)	6112 ± 436 (n=7)
Sinv 10 µM	4245 ± 574 (n=7)	1368 ± 19.36 (n=5)	5735 ± 459.9 (n=7)

Os resultados da expressão das moléculas de adesão estão representados como média de intensidade de fluorescência (MIF) de anticorpo ligado para cada neutrófilo ± erro médio padrão (SEM).

Por outro lado a sinvastatina parece modular a expressão das moléculas de adesão quando os neutrófilos são estimulados com TNF- α . A expressão de CD62L diminuiu e que a expressão de LFA-1 ($p < 0,05$) e Mac-1 ($p < 0,01$) aumentam significativamente quando os neutrófilos são incubados com TNF- α (200 ng/mL). Em contraste, a expressão de Mac-1 foi inibida significativamente quando os neutrófilos foram tratados com sinvastatina, na concentração de 10 µM, sob potente estímulo inflamatório de TNF- α , evidenciando que esta molécula de adesão participa ativamente no processo adesivo dos neutrófilos nas condições descritas. Veja Tabela 5.

Tabela 5: Expressão das moléculas de adesão celular: CD62L, CD11a e CD11b em neutrófilos tratados com diferentes concentrações de sinvastatina, sob estímulo inflamatório de TNF- α

	CD62L <i>MIF\pmSEM</i>	CD11a <i>MIF\pmSEM</i>	CD11b <i>MIF\pmSEM</i>
Basal	6105 \pm 897.5 (n=12)	1538 \pm 121.7 (n=10)	6510 \pm 543.2 (n=11)
TNF- α	3291 \pm 535.9* (n=12)	1629 \pm 125.5* (n=10)	9322 \pm 360.2*** (n=11)
Sinv 0.1 μ M +TNF- α	3134 \pm 547.2 (n=12)	1447 \pm 166.2 (n=10)	9357 \pm 432.5 (n=11)
Sinv 1 μ M +TNF- α	2876 \pm 519.3 (n=12)	1420 \pm 166.1 (n=10)	9141 \pm 260.4 (n=11)
Sinv10 μ M +TNF- α	2353 \pm 310.2 (n=12)	1407 \pm 169.7 (n=10)	7984 \pm 390.8## (n=11)

Os resultados da expressão das moléculas de adesão estão representados como média de intensidade de fluorescência (MIF) de anticorpo ligado para cada neutrófilo \pm erro médio padrão (SEM). As comparações em cada coluna foram feitas com o grupo marcado com símbolo em vermelho. *p<0,05 e ***p<0,001 comparado ao basal. ## p<0,01 comparado ao TNF- α , determinado por ANOVA (*repeated measures*) seguido de *Bonferroni Multiple Comparisons Test*.

5.6.4 Efeito da sinvastatina e do Y-27632, na presença de estímulo inflamatório, na expressão das moléculas de adesão L-selectina, LFA-1 e Mac-1

A expressão destas proteínas também foi avaliada quando os neutrófilos foram tratados concomitantemente com sinvastatina e Y-27632 sob condições inflamatórias (Tabela 6). Foi observado que o tratamento com Y-27632 (20 μ M) foi capaz de aumentar significativamente a expressão de Mac-1 (p<0.001) revertendo o efeito da sinvastatina, uma vez que esta diminuiu a expressão de Mac-1 (10 μ M) (p<0,01) sob estímulo de TNF- α (200 ng/mL) (p<0,001). Estes resultados indicam que as mudanças nas propriedades adesivas dos neutrófilos frente a estes tratamentos podem estar associadas à expressão de Mac-1.

Tabela 6: Expressão das moléculas de adesão celular: CD62L, CD11a e CD11b em neutrófilos tratados com sinvastatina e com Y-27632, concomitantemente, sob estímulo inflamatório de TNF- α

	CD62L <i>MIF</i> ± <i>SEM</i>	CD11a <i>MIF</i> ± <i>SEM</i>	CD11b <i>MIF</i> ± <i>SEM</i>
Basal	4076 ± 681.3 (n=8)	1694 ± 76.50 (n=9)	8222 ± 987.5 (n=9)
TNF- α	2225 ± 224.7*** (n=8)	1749 ± 85.05 (n=9)	10834 ± 649.9*** (n=9)
Sinv + TNF- α	1832 ± 148.2 (n=8)	1747 ± 91.46 (n=9)	9297 ± 833.3## (n=9)
Sinv +Y-27632 + TNF- α	2065 ± 125.3 (n=4)	1773 ± 78.55 (n=9)	11247 ± 995.6⊗⊗⊗ (n=9)

Os resultados da expressão das moléculas de adesão estão representados como média de intensidade de fluorescência (MIF) de anticorpo ligado para cada neutrófilo \pm erro médio padrão (SEM). ***p<0,001 comparado ao basal; ##p<0,01 comparado ao TNF- α e ⊗⊗⊗ p<0,001 comparado ao grupo SIM 10 μ M + TNF- α . Resultados determinado por ANOVA (*repeated measures*) seguido de *Bonferroni Multiple Comparisons Test*.

5.7. Expressão gênica de Rho A e Rac 1 em neutrófilos determinada por PCR quantitativa em tempo real

A expressão relativa dos genes das Rho GTPases em estudo, RhoA e Rac1 foram determinadas por PCR quantitativo em tempo real, que quantificou o RNA mensageiro nos neutrófilos de indivíduos saudáveis em relação à expressão dos RNAm de genes endógenos constitutivos: *BAC* (gene constitutivo beta actina) e *GAPDH* (gene constitutivo gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase). Foi observado que os genes das Rho GTPases, RhoA e Rac1 são expressos em neutrófilos (Figura 18).

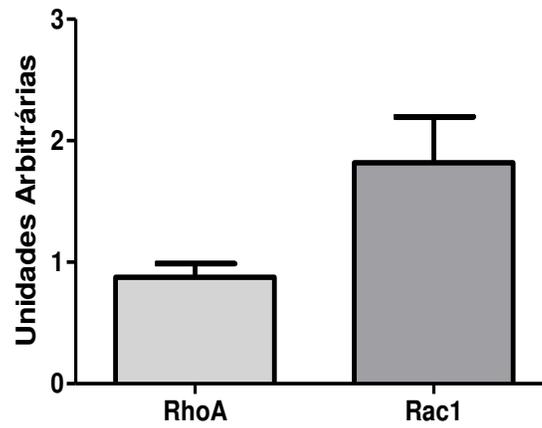


Figura 18: Expressão relativa dos genes da Rho A e Rac 1, em relação aos genes de BAC e GAPDH (controles endógenos), determinada por PCR quantitativo em tempo real, n= 13. RNAm obtido de neutrófilos de indivíduos saudáveis. Valores expressos em unidades arbitrárias de expressão \pm erro médio padrão.

6. DISCUSSÃO

Os neutrófilos são o primeiro tipo celular a chegar aos sítios de inflamação, apesar disso, pouco se sabe sobre as vias de sinalização que contribuem para alterações na adesão destas células em resposta aos estímulos inflamatórios. Assim, este estudo buscou verificar o papel do NO e de Rho GTPases nas propriedades adesivas dos neutrófilos, sob estímulo inflamatório. De modo geral, a estimulação dos neutrófilos por potentes citocinas, como o TNF- α e a IL-8, levou a um aumento rápido e significativo nas propriedades adesivas dos neutrófilos, portanto decidimos investigar as possíveis vias de sinalização e moléculas envolvidas nesta indução de ativação sob estímulo inflamatório. Na avaliação das proteínas na superfície dos neutrófilos foi observado um perfil de expressão condizente com os resultados obtidos nos ensaios de adesão de neutrófilos. Primeiramente, as subunidades alfa das integrinas LFA-1 (CD11a) e Mac-1 (CD11b), envolvidas principalmente no processo de adesão firme do leucócito ao endotélio (De Clerck *et al.*, 1995), mostraram-se aumentadas na superfície dos neutrófilos após estímulo com TNF- α . Todavia, a expressão da L-selectina, molécula envolvida no rolamento inicial do processo de adesão leucocitária (Ley & Tedder, 1995), mostrou-se diminuída com este potente estímulo inflamatório. É conhecido que a L-selectina é liberada da superfície dos neutrófilos para a circulação após a sua ativação, indicando assim que provavelmente o TNF- α ative as células resultando num aumento na expressão de integrinas na membrana e na liberação da L-selectina (Smalley & Ley, 2005).

Conran e colaboradores mostraram o efeito do L-NAME, um inibidor de NOS e, portanto um inibidor da produção de NO, na adesão de leucócitos à fibronectina (Conran *et al.*, 2001, Conran *et al.*, 2003). Em condições basais, nossos resultados mostram que há um aumento da adesão dos neutrófilos com a inibição da NOS pelo L-NAME e de iNOS pelo 1400W, sugerindo mais uma vez, que a produção de NO intracelular pode ter um papel na regulação das propriedades adesivas de neutrófilos sob condições basais. Sob condições de inflamação, os inibidores de NOS em estudo não mostraram nenhuma alteração nas propriedades adesivas dos neutrófilos. Alguns estudos já observaram que o SNP, um doador de NO, e o BAY412272, um ativador de guanilato ciclase, podem diminuir as propriedades adesivas dos neutrófilos de indivíduos com anemia falciforme (Miguel *et al.*, 2011), doença associada à um aumento de mediadores inflamatórios. Entretanto os efeitos destas drogas sob potentes estímulos inflamatórios *in vitro* ainda não

foram muito explorados. Não observamos diferença na adesão dos neutrófilos na presença do SNP, com o BAY412272 notamos uma pequena diminuição na adesão e sob condições inflamatórias também não observamos diferença na adesão nos neutrófilos. Os nossos dados indicam que outros mecanismos, independentes da produção (ou inibição da produção) de NO, provavelmente participam na adesão acentuada que observamos quando neutrófilos encontram um estímulo inflamatório forte.

O NSC 23766, um inibidor seletivo da Rac 1, mostrou não modular a adesão dos neutrófilos sob condições basal, porém sob estímulo inflamatório de TNF- α diminuiu as propriedades adesivas destas células. No entanto, após incubação com este inibidor não observamos nenhuma alteração na expressão das moléculas de adesão de superfície de neutrófilos em condições basais nem sob estimulação inflamatória. Estes resultados sugerem que possivelmente a Rac1 pode ter alguma participação (mas independente das alterações na expressão das moléculas de adesão aqui avaliadas), de forma muito pequena na ativação da adesão celular sob forte estimulação inflamatória.

Estudos da ROCK e seus inibidores, em diversas vias de sinalização, ganharam consideráveis interesses uma vez que estudos mostraram o envolvimento desta enzima, efetora de Rho GTPases, na função vascular e inflamação (Rikitake & Liao, 2005; Santen *et al.*, 2010). Evidências indicam que a ROCK intermedeia diversas vias envolvidas em todas as fases do processo inflamatório. Nossos resultados mostram que o inibidor de ROCK, o Y-27632, aumenta significativamente as propriedades adesivas dos neutrófilos, indicando, que esta enzima possa estar envolvida na ativação ou a expressão das moléculas de adesão, como as integrinas, na superfície celular, durante a fase basal. Foi observado que o Y-27632 não foi capaz de modular a expressão das moléculas de adesão, com isto podemos sugerir que este inibidor esteja associado ao aumento da atividade das moléculas de adesão nos neutrófilos sendo coerente com o aumento da adesão a fibronectina. Alguns trabalhos já mostraram que o Y-27632 pode diminuir a migração dos neutrófilos *in vivo* (Maher *et al.*, 2009) e que também diminui o rolamento e adesão de leucócitos, *in vivo*, submetidos à hipóxia e reperfusão (Santen *et al.*, 2010). No entanto é possível que o aumento da adesão celular possa levar a diminuição da migração das células.

Nos últimos anos, muitos estudos têm explorado os efeitos pleiotrópicos das estatinas em diversas doenças. Muitos destes efeitos estão relacionados ao bloqueio da isoprenilação

das GTPases (Pedersen & Tobert, 2004; Pozo *et al.*, 2006; Maher *et al.*, 2009). A habilidade das estatinas de modular a adesão de neutrófilos é um passo importante no tratamento da patogênese de muitas condições inflamatórias, porém é relativamente inexplorado. Diversos estudos na literatura evidenciam a capacidade das estatinas diminuir a adesão de diferentes tipos celulares a determinados ligantes (Pozo *et al.*, 2006; Asai *et al.*, 2011). Em condições basais nossos resultados mostram que a sinvastatina não altera a adesão dos neutrófilos a fibronectina, porém sob estímulo inflamatório de TNF- α a adesão das células diminui significativamente.

Sabe-se que as estatinas podem inibir a sinalização de Rho GTPases por inibir a síntese de mevalonato, necessário para síntese de isoprenóides, como FPP e o GGPP. Asai *et al.*, em 2011, mostrou que diferentes concentrações de fluvastatina, uma droga da classe das estatinas, diminuiu a adesão de células THP-1, uma linhagem de células monocíticas, ao ICAM-1 após estímulo destas células com hidroperóxido de fosfatidilcolina. Neste mesmo trabalho os autores mostraram que a adesão das células THP-1 é dependente de geranylgeranilação, uma vez que o mevalonato e o GGPP foram capazes de reverter a diminuição da adesão ocasionada pelo efeito da fluvastatina. Pesquisas também mostraram que a migração de neutrófilos uma vez diminuída por diferentes estatinas, sinvastatina, pravastatina e atorvastatina e revertida com o GGPP, mas não com o FPP; e que também quando o GGPP é reconstituído às células o nível de Rho GTPases ativas aumentam (Maher *et al.*, 2009). De modo muito interessante, nossos resultados mostram que o mevalonato, o GGPP e o FPP não foram capazes de reverter o efeito da sinvastatina, uma vez que esta diminui as propriedades adesivas dos neutrófilos, sugerindo que a inibição da isoprenilação das Rho GTPases não está envolvida no efeito da sinvastatina sob estas condições.

Outra hipótese estudada foi verificar se a NOS poderia estar envolvida na inibição da adesão intermediada pela sinvastatina, uma vez que inibidores da NOS, como o L-NAME, mostrou reverter o efeito da sinvastatina na adesão de neutrófilos, de indivíduos com anemia falciforme estimulados com TNF- α , às células endoteliais (Canalli *et al.*, 2011). Nossos resultados mostraram que a NOS, aparentemente, não está envolvida diretamente no efeito da sinvastatina, pois o L-NAME não foi capaz de reverter os efeitos da sinvastatina na adesão de neutrófilos.

Em 2009, Maher e colaboradores mostraram que diferentes estatinas como a sinvastatina, a pravastatina e a atorvastatina, não alteram a expressão de Mac-1 na superfície dos neutrófilos. Adicionalmente nossos dados também evidenciam que a sinvastatina não altera os níveis de expressão das moléculas de adesão LFA-1, Mac-1 e L-seletina. Nossos resultados mostram uma redução significativa na expressão de Mac-1 sob tratamento com sinvastatina sob forte estímulo de TNF- α e isto pode estar em concordância com o efeito desta classe de medicamento. Estudos indicam que as estatinas podem inibir diretamente a integrina, LFA-1; portanto não podemos descartar esta hipótese (Weitz *et al.*, 2001), porém nossos resultados não mostram uma diminuição significativa na expressão desta integrina sob o tratamento com sinvastatina com o estímulo de TNF- α . Como de modo surpreendente o inibidor de ROCK mostrou modular a adesão dos neutrófilos, concomitante ao tratamento com sinvastatina sob condições inflamatórias, também foi avaliado a expressão das moléculas de adesão presentes nos neutrófilos nesta condição. Foi observado que a expressão de Mac-1 aumentou com o tratamento com o Y-27632, uma vez que esta tinha sido diminuída pela sinvastatina sob condição de inflamação. De modo surpreendente estes resultados dão sentido aos obtidos no ensaio de adesão sob estes mesmos tratamentos. Pode ser postulado que a sinvastatina aumenta a atividade de ROCK, portanto é possível que o efeito do Y-27632 reverta o efeito da sinvastatina na adesão dos neutrófilos sob potente condição de inflamação, indicando que a sinvastatina tem algum efeito estimulador nesta enzima, porém esta ideia precisa ser melhor estudada.

Nossos dados indicam que há expressão gênica de Rac1 e RhoA nos neutrófilos e futuras pesquisas investigarão se a expressão gênica e a atividade da Rac1 e de RhoA pode ser alterada sob condições de inflamação e na presença de sinvastatina. Estes dados poderão ajudar a esclarecer o mecanismo pelo qual as Rho GTPases estão envolvidas nas propriedades adesivas dos neutrófilos.

Em resumo, inibidores diretos da via de sinalização dependente em NO-GMPc não alteram as propriedades adesivas de neutrófilos sob potente estímulo inflamatório. O envolvimento de ROCKs na adesão celular ainda não está completamente elucidado, no entanto o fato de que a inibição da ROCK (pelo Y-27632) levou a uma estimulação elevada nas propriedades adesivas de neutrófilos enquanto o uso do inibidor Y-27632 concomitante a

sinvastatina reverteu seu efeito sob o estímulo de TNF- α , podemos sugerir que a enzima ROCK tenha um papel na adesão dos neutrófilos. Embora as estatinas permaneçam em primeiro lugar como agentes hipolipemiantes altamente eficazes, observações clínicas e experimentais sugerem fortemente que a inibição da inflamação contribui para os efeitos benéficos desta classe de drogas, sugerindo que esta droga pode ser uma potencial candidata associada ao tratamento de doenças inflamatórias.

7. CONCLUSÃO

O TNF- α exerce forte efeito na expressão e função das moléculas de adesão na superfície dos neutrófilos, diante do estabelecimento do processo inflamatório, levando a alterações significantes nas propriedades adesivas destas células.

A via do NO/GMPc parece não modular as propriedades adesivas dos neutrófilos sob condições de inflamação.

Rac1 parece não modular significativamente a expressão das moléculas de adesão na superfície dos neutrófilos sob condições inflamatórias, *in vitro*.

Dados indicam que a modulação da atividade da enzima ROCK, efetora do RhoA, possa ter uma participação em alterar as propriedades adesivas de neutrófilos sob condições inflamatórias.

A sinvastatina mostra capaz de inibir a adesão de neutrófilos após estímulo inflamatório; este efeito não é intermediado pela prenilação das Rho GTPases. No entanto a sinvastatina diminui as propriedades adesivas e modula a expressão de Mac-1 na superfície dos neutrófilos sob condições inflamatórias e de modo interessante este efeito anti-inflamatório da sinvastatina pode ser mediado pela ativação de ROCK.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahluwalia A, Foster P, Scotland RS, Mclean PG, Mathur A, Perretti M, Moncada S, Hobbs AJ. Antiinflammatory activity of soluble guanylate cyclase: cGMP-dependent down-regulation of P-selectin expression and leukocyte recruitment. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.** 2004; 1386–1391.

Alberts AW, Chen J, Kuron G, Hunt V, Huff J, Hoffman C, Rothrock J, Lopez M, Joshua H, Harris E, Patchett A, Monaghan R, Currie S, Stapley E, Albers-Schonberg G, Hensens O, Hirshfield J, Hoogsteen K, Liesch J, Springer J. Mevionolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and cholesterol lowering agent. **Proc Nat Acad Sci USA.** 1980; 77 (7): 3957-3961.

Alcaide P, Auerbach S, Lusinskas FW. Neutrophil recruitment under shear flow: it's all about endothelial cell rings and gaps. **Microcirculation.** 2009; 16(1): 43–57.

Almeida CB, Traina F, Lanaro, C. *et al.* High expression of the cGMP-specific phosphodiesterase, PDE9A, in sickle cell disease (SCD) and the effects of its inhibition in erythroid cells and SCD neutrophils. **Br J Haematol.** 2008; 142: 836-44.

Asai A, Okajima F, Nakajima Y, Nagao M, Nakagawa K, Miyazawa T, Oikawa S. Involvement of Rac GTPase activation in phosphatidylcholine hydroperoxide-induced THP-1 cell adhesion to ICAM-1. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** 2011; 406: 273-277.

Assis A, Conran N, Canalli AA, Lorand-Metze I, Saad STO, Costa FF. Effect o cytokines on sickle neutrophil adhesion to fibronectin. **Acta Haematol.** 2004; 481.

Aspenstrom P, Fransson A, Saras J. Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. **Biochem. J.** 2004; 377:327–37.

Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. **FEBS Letters.** 1992; 307 (1): 97-101.

Barreto RL, Correia CRD, Muscará MN. Óxido Nitrico: Propriedades e potencias terapêuticos. **Quim. Nova.** 2005; Vol. 28, No. 6, 1046-1054.

Bernards A. GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and Drosophila. **Biochim. Biophys. Acta.** 2003; 1603:47–82.

Bogdan C. Of microbes, macrophages and nitric oxide. **Behring Inst Mitt.** 1997; 99: 58–72.

Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. **Blood.** 1997; 89(10):3503-21.

Braga VMM. Small GTPases and regulation of cadherin dependent cell±cell adhesion. **Mol. Pathol.** 1999; 52:97-202.

Campo VL; Carvalho I. Estatinas hipolipemicas e novas tendências terapêuticas. **Quim. Nova.** 2007; (30) 2:425-430.

Canalli AA; Franco-Penteado CF; Saad STO; Conran N; Costa FF. Increased Adhesive Properties of Neutrophils in Sickle Cell Disease May Be Reversed by Pharmacological Nitric Oxide Donation. **Haematologia.** 2008; 93: 605-09.

Canalli AA, Franco-Penteado CF, Traina F, Saad STO, Costa FF, Conran N. Role for cAMP-protein kinase A signalling in augmented neutrophil adhesion and chemotaxis in sickle cell disease. **European Journal fo Haematology.** 2007; 79: 330-7.

Canalli AA, Proença RF, Franco-Penteado CF, Traina F, Sakamoto TM, Saad STO, Conran N, Costa FF. Participation of Mac-1, LFA-1 and VLA-4 integrins in the *in vitro* adhesion of sickle cell disease neutrophils to endothelial layers, and reversal of adhesion by simvastatin. **Haematologica.** 2011; 96(4): 526-533.

Clancy RM, Abramson SB. Nitric oxide: a novel mediator of inflammation. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 1995; 210:93-101.

Clark, I. A. How TNF was recognized as a key mechanism of disease. **Cytokine Growth Factor Rev.** 2007; 18, 335–343.

Conran N, Ferreira HH, Lorand-Metze I, Thomazzi SM, Antunes E, De Nucci G. Nitric oxide regulates human eosinophil adhesion mechanisms in vitro by changing integrin expression and activity on the eosinophil cell surface. **Br J Pharmacol.** 2001; 134: 632-8.

Conran N, Gambero A, Ferreira HH, Antunes E, De Nucci G. Nitric oxide has a role in regulating VLA-4-integrin expression on the human neutrophil cell surface. **Biochem Pharmacol.** 2003; 66(1): 43-50.

Conran, N e Costa, FF. Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions. **Clin Biochem.** 2009; 42: 1824-38.

Coso OA, Chiariello M, Yu JC, Teramoto H, Crespo P, Xu N, Miki T, Gutkind JS. The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. **Cell.** 1995; 81:1137-1146.

Crane CJ, Liversidge J. Mechanisms of leukocyte migration across the blood–retina barrier. **Semin Immunopathol.** 2008; 30:165–177.

Cronstein BN, Weissmann G. The adhesion molecules of inflammation. **Arthritis Rheum.** 1993; 36(2): 147-57.

Daub H, Gevaert K, Vandekerckhove J, Sobel A, Hall A. Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16. **J. Biol. Chem.** 2001; 276:1677–1680.

Davenpeck KL, Sterbinsky SA, Bochner BS. Rat neutrophils express alpha4 and beta1 integrins and bind to vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1). **Blood.** 1998; 91(7):2341-6.

De Clerck LS, De Gendt CM, Bridts CH, Van Osselaer N, Stevens WJ. Expression of neutrophil activation markers and neutrophil adhesion to chondrocytes in rheumatoid arthritis patients: relationship with disease activity. **Research in Immunology.** 1995; 146: 81-7.

Dominical VM, Bertolo MB, Almeida CB, Garrido VT, Miguel LI, Costa FF; Conran N. Neutrophils of Rheumatoid Arthritis Patients on Anti-TNF-a Therapy and in Disease

Remission Present Reduced Adhesive Functions in Association with Decreased Circulating Neutrophil-Attractant Chemokine Levels. **Scandinavian Journal of Immunology**. 2011; 73: 309–318.

Dusse LMSA, Vieira LM, Carvalho MG. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro. 2003; 39: 343-350.

Etienne-Manneville S, Hall A. Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKC ζ . **Cell**. 2001; 106:489–498.

Fillipi MD, Szczur K, Harris CE, Berclaz PY. Rho GTPase Rac1 is critical for neutrophil migration into the lung. **Blood**. 2007; 109 (3): 1257-1264.

Franco-Penteado CF, De Souza I, Teixeira SA. *et al.* Role of nitric oxide on the increased vascular permeability and neutrophil accumulation induced by staphylococcal enterotoxin B into the mouse paw. **Biochemical pharmacology**. 2001; 61: 1305-11.

Ferencík M, Stvrtinová V. Endogenous control and modulation of inflammation. **Folia Biol. Praha**. 1996; 42: 47-55.

French JA, Kenny D, Scott JP, Hoffmann RG, Wood JD, Hudetz AG. *et al.* Mechanism of stroke in sickle cell disease: Sick erythrocytes decrease cerebral blood flow in rats after nitric oxide synthase inhibition. **Blood**. 1997; 89:4591-4599.

Fukumoto Y, Kaibuchi K, Hori Y, Fujioka H, Araki S, Ueda T, Kikuchi A, Takai Y. Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins. **Oncogene**. 1990; 5:1321–1328.

Garvey EP, Oplinger JA, Furfine ES, Kiff RJ, Laszlo F, Whittle JR, Knowles RG. 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. **J. Biol. Chem**. 1997; 272, 4959-4963.

Hall, A. G proteins and small GTPases: distant relatives keep in touch. **Science**. 1998; 280: 2074-2075.

Hansson GK, Robertson AKL, Söderberg-Nauclér C. Inflammation and atherosclerosis. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.** 2006; 1:297–329.

Harrison CB, Drummond GR, Sobey CG, Selemidis S. Evidence that nitric oxide inhibits vascular inflammation and superoxide production via a p47phox-dependent mechanism in mice. **Clinical and experimental pharmacology & physiology.** 2010; 37: 429-34.

Hart MJ, Maru Y, Leonard D, Witte ON, Evans T, Cerione RA. A GDP dissociation inhibitor that serves as a GTPase inhibitor of the Ras-like protein CDC42Hs. **Science.** 1992; 258, 812–815.

Henson PM, Johnston RB. Tissue injury in inflammation: oxidants, proteases and cationic proteins. **J Clin Invest.** 1987; 79: 669-674.

Hill CS, Wynne J, Treisman R. The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. **Cell.** 1995; 81: 1159-1170.

Ignarro, L.J. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. **J Physiol Pharmacol.** 2002; 53:503-514.

Jain MK, Ridker PM. Anti-inflammatory effects of statins: clinical evidence and basic mechanisms. **Nature Reviews.** 2005, 4: 977-987.

Kadl A, Leitinger N. The Role of Endothelial Cells in the Resolution of Acute Inflammation. **Antioxidants and redox signaling.** 2005; 7:1744-54.

Konstantinides DG, George A, Kalfa TA. Rac GTPases in erythroid biology. **Transfusion Clinique et Biologique.** 2010; 17: 126-130.

Kozma R, Ahmed S, Best A, Lim L. The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. **Mol. Cell. Biol.** 1995; 15, 1942–1952.

Kummar V, Abbas AK, Fausto N. Bases patológicas das doenças. 7ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 1592 p. Bibliografía: p.78.

Lanaro C, Franco-Penteado CF, Albuquerque DM, Saad STO, Conran N, Costa FF. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. **Journal of Leukocyte Biology**. 2009; 85: 235-242.

Lee WT, Kubes P. Leukocyte adhesion in the liver: Distinct adhesion paradigm from other organs. *Journal of Hepatology*. 2008, 48: 504–512.

Lefer DJ, Jones SP, Girod WG *et al*. Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. **The American journal of physiology**. 1999; 276: H1943-50.

Leite AC, Cunha FQ, Dal-Secco D. *et al*. Effects of nitric oxide on neutrophil influx depends on the tissue: role of leukotriene B4 and adhesion molecules. **British journal of pharmacology**. 2009; 156: 818-25.

Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade update. **Nature Reviews**. 2007; 7: 678-688.

Ley K, Tedder TF. Leukocyte interactions with vascular endothelium. New insights into selectin-mediated attachment and rolling. **Journal of Immunology**. 1995; 155: 525-8.

Liew FY. Interactions between cytokines and nitric oxide. **Adv Neuroimmunol**. 1995; 5: 201–209.

Lum AF, Wun T, Staunton D, Simon SI. Inflammatory potential of neutrophils detected in sickle cell disease. **Am J Hematol**. 2004; 76:126-33.

Mackay CR, Imhof BA. Cell adhesion in the immune system. **Immunology Today**. 1993; 14 (3): 99-102.

Madan G, Rao M. Physiological and clinical importance of nitric oxide. **Indian J Med Sci**. 1996; 50: 318–324.

Maher BM, Ni Dhonnchu T, Burke JP, Soo A, Wood AE, Watson RWG. Statins alter neutrophil migration by modulating cellular Rho activity—a potential mechanism for statin-mediated pleiotropic effects? **Journal of Leukocyte Biology**. 2009; 85: 186-193.

Marshall CJ. Protein prenylation: a mediator of protein-protein interactions. **Science**. 1993; 261:1865-6 1993.

Mason JC. The statins – therapeutic diversity in renal disease? **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**. 2005; 14: 17-24.

Mason PR *et al.* Intermolecular differences of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors contribute to distinct pharmacologic and pleiotropic actions. **Am J Cardiol**. 2005; 96 (suppl): 11-23.

Matsushima K, Baldwin ET, Mukaida N. Interleukin-8 and MCAF: novel leukocyte recruitment and activating cytokines. **Chemical Immunology**. 1992; 51: 236-65.

Mazza J, Rossi A, Weinberg JM. Innovative Uses of Tumor Necrosis Factor a Inhibitors. **Dermatol Clin**. 2010; 28: 559–575.

Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**. 2008; 454: 428-35.

Miguel LI, Almeida CB, Traina F, Canalli AA, Dominical VM, Saad ST, Costa FF, Conran N. Inhibition of phosphodiesterase 9A reduces cytokine-stimulated in vitro adhesion of neutrophils from sickle cell anemia individuals. **Inflamm Res**. 2011; 60(7):633-42.

Miller MD, Krangel MS. Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. **Critical reviews in immunology**. 1992; 12 (1-2): 17-46.

Moilanen E, Vuorinen P, Kankaanranta H, Metsa-Ketela T, Vapaatalo H. Inhibition by nitric oxide-donors of human polymorphonuclear leucocyte functions. **British journal of pharmacology**. 1993; 109: 852-8.

Moncada S, Higgs A, Furchgott R. XIV International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. **Pharmacol. Rev.** 1997; 49: 137-142.

Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N. Engl. J. Med.** 1993; 329: 2002-2012.

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.** 1991; 43: 109-142.

Moore PK, Babbedge RC, Wallace P , Gaffen ZA, Hart SL. 7-Nitroindazole, an inhibitor of nitric oxide synthase, inhibits anti-nociceptive activity in the mouse without increasing blood pressure. **Br. J. Pharmacol.** 1993; 180: 296-297.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods.** 1983; 55-63.

Mukaida, N. Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation. **Int. J. Hematol.** 2000; 72, 391–398.

Muller WA, Randolph GJ. Migration of leukocytes across endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes. **J Leukoc Biol.** 1999; 5: 698-704.

Mulloy JC, Cancelas JA, Filippi MD, Kalfa TA, Guo F, Zheng Y. Rho GTPases in hematopoiesis and hemopathies. **Blood.** 2010; 115 (5): 936-947.

Nathan, C. Inflammation: points of control. **Nature.** 2002; 420: 846–852.

Nathan, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature.** 2006; 6: 173-86.

Nomanbhoy TK, Erickson JW, Cerione RA. Kinetics of Cdc42 membrane extraction by Rho-GDI monitored by real-time fluorescence resonance energy transfer. **Biochemistry.** 1999; 6:1744-50.

Pedersen TR, Tobert JA. Simvastatin: a review. **Expert Opin.Pharmacother.** 2004; 5: 2583–2596.

Peres CM, Curi R. Como cultivar células. Rio de Janeiro: Edira Guanabara Koogan S.A. 2005. 283p. Bibliografía: p 23e 24.

Perona R, Montaner S, Saniger L, Sanchez-Perez I, Bravo R, Lacal JC. Activation of the nuclear factor- κ B by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. **Genes Dev.** 1997; 11: 463-475.

Phillipson M, Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation. **Nature Medicine.** 2011; 17:1381-1390.

Pozo M, Nicolás R, Egado J, González-Cabrero J. Simvastatin inhibits the migration and adhesion of monocytic cells and disorganizes the cytoskeleton of activated endothelial cells. **European Journal of Pharmacology.** 2006; 548: 53–63.

Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. The small gtp-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. **Cell.** 1992; 70: 401-410.

Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. Cell migration: Integrating Signals from front to back. **Science.** 2003; 302: 1704-1709.

Ridley AJ. Regulation of macrophage adhesion and migration by Rho GTP-binding proteins. **Journal of Microscopy.** 2008; 231(3): 518-523.

Riento K, Ridley AJ. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. **Nature Reviews Molecular Cell Biology.** 2003; 4:446–456.

Rikitake Y, Liao JK. ROCKs as therapeutic targets in cardiovascular diseases. **Expert Rev Cardiovasc Ther.** 2005; 3:441-451.

Roja AM, Fuentes G, Rausell A, Valencia A. The **Ras** protein superfamily: evolutionary tree and role of conserved amino acids. **J Cell Biol.** 2012; 196(2):189-201.

Rose DM, Alon R, Ginsberg MH. Integrin modulation and signaling in leukocyte adhesion and migration. **Immunological Reviews.** 2007; 218: 126-134.

Santen S, Wang Y, Laschke MW, Menger MD, Jeppsson B, Thorlaciuss H. Rho-kinase signaling regulates CXC chemokines formation and leukocyte recruitment in colonic ischemia-reperfusion. **Int J Colorectal Dis.** 2010; 25: 1063-1070.

Sanz MJ, Hickey MJ, Johnston B. *et al.* Neuronal nitric oxide synthase (NOS) regulates leukocyte-endothelial cell interactions in endothelial NOS deficient mice. **British journal of pharmacology.** 2001; 134: 305-12.

Seabra MC. Membrane association and targeting of prenylated Ras-like GTPases. **Cell Signal.** 1998; 10(3):167-72.

Scita G, Tenca P, Frittoli E, Tocchetti A, Innocenti M, Giadina G. Signalling from Ras to Rac and beyond: not just a matter of GEFs. **Embo J.** 2000; 19:2393–2398.

Schmidt A, Hall A. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. **Genes Dev.** 2002; 16:1587–609.

Schmidt HHHW, Hofmann H, Ogilvie P. Regulation and dysregulation of constitutive nitric oxide synthases types I and III. *Curr. Topics in Microbiol. And Immunol.* 1993; 196: 75-84.

Shimizu Y, Shaw S.. Lymphocyte interactions with extracellular matrix. **Faseb.** 1991; 5(9): 2292-9.

Smalley, DM, Ley K. L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. **Journal of Cellular and Molecular Medicine.** 2005; 9(2): 255-66.

Southan GJ, Szabó C. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. **Biochem. Pharmacol.** 1996; 51: 383-394.

Toetsch S, Olwell P, Prina-Mello A, Volkov Y. The evolution of chemotaxis assays from static models to physiologically relevant platforms. **Integrative Biology.** 2009; 1: 170-81.

Valerius NH, Stendahl O, Hartwig JH, Stossel TP. Distribution of the actin- binding protein and myosin in polymorphonuclear leukocytes during locomotion and phagocytosis. **Cell.** 1981; 24:195–120.

Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. **Genes & Dev.** 1997; 11:2295–2322.

Van der Meer AD, Poot AA, Duits MHG, Feijen J, Vermes I. Microfluidic Technology in Vascular Research. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2009; 8231-48.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology.** 2002; 3(7): 1-12.

Vega FM, Ridley AJ. Rho GTPases in cancer cell biology. **FESB Lett.** (2008), doi:10.1016/j.fesblet. 2008.04.039.

Wagner DD, Frenette PS. The vessel wall and its interactions. **Blood.** 2008; 111: 5271-5281.

Weiss, SJ. Tissue destruction by neutrophils. **New Engl J Med.** 1989; 320:356-376.

Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V, Kamata T, Kallen J, Bruns C, Cottens S, Takada Y, Hommel U. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. **Nat Med.** 2001;7:687–692.

Yusuf-Makagiansar H, Makagiansar IT, Hu Y, Siahaan TJ. Synergistic inhibitory activity of alpha- and beta-LFA-1 peptides on LFA-1/ICAM-1 interaction. **Peptides.** 2001; 22(12):1955-62.

Zarbock A, Ley K. Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. **The American journal of Pathology.** 2009; 172(1): 1-7.

9. APÊNDICES



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Resolução 196/96; 340/04; 347/05)



Pesquisa: Investigação do papel do óxido nítrico e de Rho-GTPases na adesão de neutrófilos sob condições inflamatórias

Pesquisadores: Angélica Aparecida Antoniellis Silveira e Dra. Nicola Conran Zorzetto

Local: HEMOCENTRO / FCM – UNICAMP

A finalidade deste projeto é trazer informações sobre o papel do óxido nítrico e de Rho-GTPases na adesão de neutrófilos sob condições inflamatórias. Esta pesquisa será importante para melhor entender alguns eventos presentes no processo inflamatório e a participação das células brancas neste processo. Os pesquisadores responsáveis pelo estudo responderão a quaisquer perguntas que o indivíduo/voluntário possa ter sobre este termo e sobre o estudo.

Para participar, caso você queira, deverá doar 1 ou 2 frascos (8 mL) de sangue. Essa coleta será feita por um profissional treinado, no entanto, em alguns casos raros poderá ficar uma pequena mancha roxa e a região poderá ficar um pouco dolorida.

Você terá direito a privacidade e toda informação que for obtida em relação a este estudo permanecerá em sigilo. Os resultados deste projeto poderão ser apresentados em congresso ou em publicações, porém, sua identidade não será divulgada nessas apresentações.

A participação neste estudo é voluntária e você pode recusar-se a participar ou poderá interromper sua participação a qualquer momento sem prejuízos. Além disso, você terá direito a qualquer esclarecimento sobre o estudo mesmo durante o seu decorrer. Qualquer dúvida sobre o estudo você poder procurar por Angélica Ap. Antoniellis Silveira (F: 019 3521-8611, pesquisadora responsável pelo estudo) ou pela Dra. Nicola Conran Zorzetto (F: 19 3251-8734, orientadora responsável pelo estudo), Hemocentro, UNICAMP e qualquer reclamação sobre o procedimento do estudo poderá procurar a secretaria do Comitê de Ética na rua Tessália Vieira de Camargo, 126 - Caixa Postal 6111 13083-887 Campinas – SP, Fone (019) 3521-8936 - Fax (019) 3521-7187 e-mail: cep@fcm.unicamp.br

Eu, _____,

Idade: _____ anos, Telefone _____ declaro ter recebido todas as informações relativas ao estudo “**Investigação do papel do óxido nítrico e de Rho-GTPases na adesão de neutrófilos sob condições inflamatórias**”. Autorizo a coleta de amostras de sangue periférico que serão utilizadas nesse estudo.

Outros pontos importantes foram enfatizados:

- 1- Ampla liberdade de recusar-me a participar do estudo ou retirar meu consentimento em qualquer fase deste, sem penalização ou prejuízo.
- 2- Garantia de esclarecimentos sobre o estudo, mesmo durante o seu decorrer.
- 3- Garantia de sigilo que assegure a minha privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos no estudo, quando da sua divulgação ou publicação científicas.
- 4- Quaisquer reclamações quanto ao andamento do projeto ou dos pesquisadores, posso contatar o CEP da FCM / UNICAMP.

Portanto, concordo em participar do estudo autorizando a equipe responsável à manipulação dos dados. Por estar de acordo com o conteúdo do termo de consentimento, dato e assino em duas vias, ficando uma em minha posse.

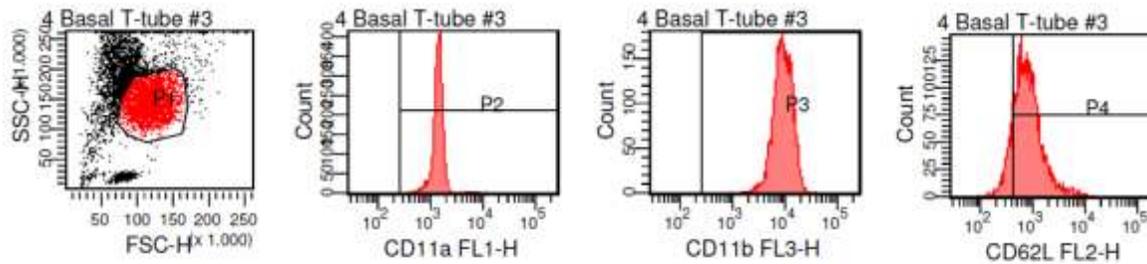
Campinas, ____/____/____

Voluntário/ Responsável

Pesquisador Responsável

APÊNDICE II

Expressão das moléculas de adesão L-selectina, LFA-1 e Mac-1 representada através de um de histograma de citometria de fluxo



Specimen Name: 4 Basal T
Record Date: 06/02/2012 16:03:18

Population	#Events	%Parent	CD11a F...	CD62L F...	CD11b F...
			Mean	Mean	Mean
<input checked="" type="checkbox"/> P1	4.926	49,3	1.384	982	9.727
<input checked="" type="checkbox"/> P2	4.926	100,0	1.384	982	9.727
<input checked="" type="checkbox"/> P3	4.926	100,0	1.384	982	9.727
<input checked="" type="checkbox"/> P4	7.682	76,8	1.509	1.485	9.337

APÊNDICE III

Resumo apresentado na categoria de pôster em maio de 2012: “X Congresso Latino Americano de Imunologia, ALAI 2012” (Lima, Peru).

SIMVASTATIN MODULATES THE ADHESIVE PROPERTIES OF TNF- α ACTIVATED NEUTROPHILS, *IN VITRO*.

Angélica A. A. Silveira, Venina Marcela Dominical, Fernando F. Costa, Nicola Conran.

The adhesion of neutrophils to endothelial sites of inflammation constitutes a multi-step process that involves the interaction of neutrophil adhesion molecules with ligands on the endothelium. Intracellular signaling pathways involved in neutrophils adhesion, thus, offer potential targets for manipulation for the treatment of inflammatory conditions. Statins are emerging as potential anti-inflammatory agents whose pleiotropic effects stem from their inhibition of prenylation of the small GTPases, in turn modulating immune responses by altering cytokine levels and affecting the function of cells involved in both innate and adaptive responses. The objective of this study was to evaluate the ability of simvastatin and a rho-kinase inhibitor to modulate the adhesive properties of neutrophils under a strong TNF- α -inflammatory stimulus. Neutrophils were separated from the peripheral blood of healthy individuals over a Ficoll-Paque gradient and resuspended in RPMI medium. Cells (2×10^6 cells/ml) were co-incubated with simvastatin (SIM; 0.1, 1 and $10 \mu\text{M}$) and/or with a rho-kinase inhibitor, Y-27632 ($20 \mu\text{M}$), in the presence of a TNF- α (200 ng/mL , 30 min, 37°C , 5% CO_2) stimulus, before allowing cells to adhere to fibronectin (FN) *in vitro* (30 min, 37°C , 5% CO_2). Neutrophil surface expressions of the CD62L, CD11a and CD11b molecules were determined by flow cytometry. Basal adhesion of neutrophils to FN was not altered by SIM ($13.9 \pm 2.1\%$, $15.6 \pm 2.4\%$, $14.5 \pm 2.4\%$ and $16 \pm 2.5\%$ for basal, 0.1, 1 and $10 \mu\text{M}$ SIM, respectively, $P > 0.05$, $n=7$). TNF- α significantly augmented neutrophil adhesion to FN; however, in the presence of SIM, this increased adhesion was abrogated ($13.9 \pm 2.1\%$, $46.3 \pm 3.1\%$, $38.9 \pm 2\%$, $41.4 \pm 2.9\%$, $30.72 \pm 3.3\%$ for basal, TNF- α , and 0.1, 1 and $10 \mu\text{M}$ SIM + TNF- α , respectively, $n=7$) although this decrease was only significant

with 10 μ M simvastatin ($P < 0.001$). The effect of SIM on TNF- α -induced neutrophil adhesion was reversed by co-incubation with the rho-kinase inhibitor ($17.1 \pm 4.9\%$, $46 \pm 5.8\%$, 21.9 ± 3.4 , $48.7 \pm 9.8\%$ for basal, TNF- α , 10 μ M SIM+TNF- α and 10 μ M SIM+TNF- α +Y-27632, respectively, $P \leq 0.01$, $n=8$). Incubation of neutrophils with TNF- α significantly increased CD11b expression on each cell (8222 ± 987 ; 10834 ± 650 MFI, for basal and TNF- α ; $n=9$, $P < 0.01$). 10 μ M SIM significantly abrogated the TNF α -induced expression of CD11b (9297 ± 833 , $p < 0.01$) and this inhibition was reversed by Y-27632 (11247 ± 995 , $p < 0.001$). The expressions of CD11a and L-selectin were not significantly altered by SIM on TNF α -induced neutrophils ($p > 0.05$, data not shown). In conclusion, simvastatin was able to abrogate the activation of neutrophil adhesive properties under TNF α -inflammatory conditions. Interestingly, the anti-inflammatory effects of simvastatin, under these conditions, may be mediated, in part, by rho-kinase activity.

Artigo submetido em 08 de agosto de 2012 – *Inflammation Research*

SHORT COMMUNICATION

Simvastatin abrogates inflamed neutrophil adhesive properties, in association with the inhibition of Mac-1 integrin expression and modulation of Rho kinase activity

Angélica Aparecida Antoniellis Silveira, Venina Marcela Dominical, Mariana Lazarini, Fernando Ferreira Costa, Nicola Conran

INCT de Sangue, Hematology and Hemotherapy Center, School of Medicine, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, Sao Paulo, Brazil

Running title: Simvastatin inhibits activated neutrophil adhesion

Correspondence to:

N. Conran, Ph.D., Hemocentro, Rua Carlos Chagas, 480, Cidade Universitária, Barão Geraldo, Campinas 13083-970-SP, Brazil.

e-mail: conran@unicamp.br; Tel.: + 55 19 3521 8533; Fax: + 55 19 3289 1089.

Abstract

Objectives Leukocytes play a primary role in vascular inflammation, and an understanding of the pathways involved in the activation of these cells and means to inhibit their consequent adhesion to the vessel wall are required. This study aimed to determine whether statins have a direct effect upon neutrophil adhesive properties under inflammatory conditions and whether the Rho GTPases participate in this mechanism. *Methods* Neutrophils from healthy individuals were subjected to adhesion assays (with fibronectin as ligand) and flow cytometry. *Results* In the presence of a TNF- α inflammatory stimulus, neutrophils displayed a rapid and substantial enhancement in their adhesive properties that was abrogated by pre-incubation of the cells with simvastatin. Neutrophil surface expression of the Mac-1 integrin subunit, CD11b, was augmented by TNF- α , and this increased expression was also inhibited by simvastatin. Interestingly, while addition of the isoprenoids, geranylgeranyl pyrophosphate and farnesyl pyrophosphate, to cells did not alter the effect of simvastatin on TNF- α -stimulated adhesion, concurrent incubation of cells with the Rho kinase (ROCK) inhibitor reversed the effects of simvastatin on neutrophil adhesion and CD11b expression. *Conclusion* Simvastatin appears to have direct anti-inflammatory effects in neutrophils that may be mediated by modulation of ROCK activity.

Keywords: Adhesion; Inflammation; Neutrophil; Statin; Rho GTPase

Introduction

Neutrophils are the most abundant granulocyte in the circulation and are invaluable for host defense. However, these cells are also implicated in the pathogenesis of several inflammatory conditions, including atherosclerosis and sickle cell disease, where their recruitment to vessels walls following exposure to proinflammatory cytokines results in the exacerbation of vascular inflammation [1, 2]. Neutrophil recruitment is mediated by complex interactions between adhesion molecules on the leukocyte and on the endothelial surfaces; L-selectin is essential for the tethering and rolling on the vessel wall, while firm adhesion is mediated principally by the β 2 integrins, macrophage 1 (Mac-1, CD11b/CD18) and lymphocyte function associated 1 (LFA-1, CD11a/CD18) [3].

Increasing evidence indicates that statins exert effects in addition to lowering cholesterol levels. The pleiotropic effects of statins include anti-atherosclerotic, anti-inflammatory, anti-oxidant, immunomodulatory and anti-thrombotic effects [4]. Statins specifically mediate their effects through inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase, preventing the conversion of HMG-CoA to mevalonate with the subsequent inhibition of cholesterol synthesis [5]. The isoprenoids, farnesyl pyrophosphate and geranylgeranyl pyrophosphate, are important intermediates in the cholesterol pathway that serve as lipid attachments for a variety of signaling molecules, such as heterotrimeric G-proteins and the small GTP-binding proteins such as Rho, Rac and Ras, which have been shown to have roles in regulating cell adhesion and migration mechanisms [6]. Statins have been reported to reduce endothelial activation and adhesion molecule expression, *in vitro*, following inflammatory stimulation, with consequent attenuation of leukocyte adhesion [7, 8]. However, it is unknown whether statins have a direct effect upon neutrophil adhesive properties under inflammatory conditions.

Materials and Methods

All reagents were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), unless otherwise indicated.

Subjects

Peripheral blood samples were collected from healthy individuals (aged 18–60 years) and informed written consent was obtained from all individuals. The study was approved by the Ethics Committee of the University of Campinas, Brazil. None of the subjects had taken anti-inflammatory drugs or statins during the previous two weeks.

Neutrophil isolation

Neutrophils were isolated from blood collected in sodium citrate by centrifuging over Ficoll-Paque of densities of 1.077 and 1.119 g / l [9]. After lysis of contaminating erythrocytes in lysis buffer (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃), cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) before resuspending in RPMI medium for immediate use in assays. Histological and morphological analyses of isolated neutrophil populations indicated >95% purity and >98% viability with no significant differences in morphology.

Neutrophil adhesion assays

Neutrophil static adhesion assays were performed as described previously [9]. Briefly, neutrophils (2 x 10⁶ cells/ml in RPMI) were seeded onto 96-well plates previously coated with 20 µg / ml FN; cells were allowed to adhere for 30 min (37°C, 5% CO₂). Following incubation, non-adhered cells were discarded and wells washed thrice with PBS. RPMI (50 µl) was added to each well and varying concentrations of the original cell suspension were added to empty wells to form a standard curve. Percentage cell adhesion was calculated by measuring the myeloperoxidase content (MPO)[10] of each well and comparing to a standard curve of cells in suspension. Cells were co-incubated, or not, with a TNF-α (200 ng/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) inflammatory stimulus during the assay and, in some experiments, pretreated with simvastatin and/or Y-27632 (an inhibitor of Rho kinase) or L-NAME (15 min, 37°C).

Flow cytometry

Isolated neutrophils (1 x 10⁶ / ml in RPMI) were incubated with Phycoerythrin (PE)-conjugated mouse anti-human CD62L, PE-CyTM7 mouse anti-human CD11b (Mac-1) and/or FITC mouse anti-human CD11a (LFA-1) (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA), for 30

min, 4°C, in the dark. Subsequently, cells were washed with PBS and fixed with 1% paraformaldehyde until analysis. Cells were analyzed at 488 nm on a FACScalibur (BD Biosciences, EUA) and CellQuest Software was used for acquisition. Data are expressed as mean fluorescence intensities (MFI) compared to a negative isotype control.

MTT assay

Cell toxicity was estimated using the tetrazolium salt reduction test (MTT assay) in neutrophils after exposure to drugs. Neutrophils (2×10^6 cells/ml in RPMI) were incubated with different concentrations of simvastatin (0.1, 1, 10 and 100 μ M) for 30 min or vehicle (0.1 or 1 % DMSO) in a 96-well plate (37°C, 5 % CO₂). MTT reduction by treated cells was compared to that of fully viable cells and non-viable cells.

Statistical analyses

Data are depicted as the mean \pm SEM of N subjects. Differences between groups were evaluated by ANOVA, followed by Bonferroni's test. A P-value of <0.05 was considered statistically significant.

Results

TNF- α induces an immediate and extremely significant increase in neutrophil adhesive properties; in the presence of a TNF- α (200 ng/ml) stimulus, neutrophil adhesion to fibronectin is expressively augmented (Fig. 1). However, following preincubation of neutrophils with simvastatin (10 μ M; concentration chosen from a dose-response curve, data not shown), TNF- α -induced adhesion, but not basal adhesion, is significantly abrogated without any alteration in cell viability (according to MTT test, data not shown). Flow cytometry demonstrated, as expected, a high basal expression of the adhesion molecules, CD62L, CD11a (LFA-1 α subunit) and CD11b (Mac-1 α subunit), on the surface of neutrophils (64.6 \pm 6.2%, 99.9 \pm 0.03%, 99.5 \pm 0.37%, n=8, respectively). After stimulation of the cells with TNF- α (200 ng/ml, 30 min), a significantly augmented expression of the CD11b subunit was observed on neutrophils (as demonstrated by

increased MFI, see Table 1), in association with decreased CD62L expression. In contrast, following pre-incubation of neutrophils with simvastatin (10 μ M, 15 min), the TNF- α -induced upregulation of CD11b surface expression on neutrophils was abrogated (Table 1), consistent with the finding of decreased TNF- α -induced neutrophil adhesion following incubation of cells with simvastatin.

To understand whether these anti-inflammatory effects of simvastatin on TNF- α -stimulated neutrophil adhesion were mediated by a Rho-GTPase or nitric oxide dependent pathway, neutrophils were co-incubated with both simvastatin and the Rho kinase (ROCK) inhibitor, Y-27632 (20 μ M), or the nitric oxide synthase inhibitor, N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 1 mM), before observing cell adhesion. Interestingly, the Rho kinase inhibitor, Y-27632, completely reversed the effect of simvastatin on TNF- α -stimulated neutrophil adhesion, while inhibition of nitric oxide production had no effect (Fig. 1A). Consistent with this finding, Y-27632 did not significantly alter basal expression of neutrophil adhesion molecules, but reversed the effect of simvastatin on TNF- α -induced CD11b expression (Table 1). Co-incubation of neutrophils with both simvastatin and geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) or farnesyl pyrophosphate (FPP) did not alter the inhibiting effect of simvastatin on TNF- α -induced neutrophil adhesion (Fig. 1B).

Discussion

Leukocytes play a primary role in vascular inflammation and an understanding of the pathways involved in the activation of these cells is sought with a view to the improvement of approaches to reduce leukocyte activation and inflammatory mechanisms. Following their activation with cytokines, such as TNF- α , neutrophils display a rapid and substantial enhancement in their adhesive properties, permitting their migration to inflammatory sites and also their adhesion to vessel walls, resulting in an exacerbation of vascular inflammation that is known to contribute to pathologies such as atherosclerosis and sickle cell disease, amongst other diseases [1, 2].

Using static adhesion assays we found that simvastatin can abrogate the ability of TNF- α to induce neutrophil adhesion, *in vitro*. Statins have been found to have extensive anti-inflammatory properties, and are known to alter endothelial cell adhesion molecule

expression, with the subsequent inhibition of leukocyte adhesion [7]. We herein employed *in vitro* assays using fibronectin as a ligand for cell adhesion, rather than layers of cultured endothelial cells, to observe whether simvastatin can directly affect the activation and adhesion of neutrophils, rather than have an indirect effect on endothelial ligands for leukocyte adhesion. Statins have been previously found to decrease adhesion molecule expression on leukocytes in patients with coronary heart disease [11] and to decrease the adhesion of neutrophils from sickle cell disease individuals to endothelial cell layers [8]. The finding that simvastatin can inhibit TNF- α -induced neutrophil adhesion indicates that statins can indeed directly affect neutrophil function and prevent the activation of these cells by certain inflammatory stimuli.

Statins may exert their anti-inflammatory effects via diverse pathways; there is evidence that these agents can decrease fMLP-stimulated neutrophil migration by modulating intracellular Rho GTPase activity [12] and inhibit the migration and invasion of rheumatoid fibroblast-like synoviocytes by preventing geranylgeranylation of RhoA [13]. Additionally, fluvastatin has been found to reduce the expressions of ICAM-1 and PECAM-1 on the surface of endothelial cells via an upregulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity [14]. As such, we investigated the possibility that simvastatin abrogates the TNF- α -induced neutrophil adhesive properties via a NOS-dependent or Rho-GTPase-dependent pathway. L-NAME, a non-specific NOS inhibitor, was unable to reverse the effect of simvastatin on TNF- α -induced neutrophil adhesion, suggesting that under these experimental conditions, this statin does not up-regulate NOS activity. In contrast, whilst the replacement of the isoprenoids, GGPP and FPP (bi-products of the cholesterol synthesis pathway and responsible for the post-translational prenylation of the Rho-GTPases) were unable to rescue neutrophils from the effect of simvastatin, the ROCK (Rho A effector protein) inhibitor, Y-27632, completely reversed the effect of this statin on TNF- α -induced neutrophil adhesion.

Consistent with our adhesion assay findings, TNF- α significantly augmented the expression of the Mac-1 integrin subunit, CD11b, on the surface of neutrophils, while simvastatin and Y-27632 had no effect upon basal adhesion molecule expression. This increase in integrin expression was associated with a decrease in L-selectin expression,

indicative of leukocyte activation and consequent selectin shedding [15]. Conversely, when neutrophils were co-incubated with both TNF- α and simvastatin, increased CD11b expression was abrogated; furthermore, inhibition of ROCK by Y-27632 reversed the effect of simvastatin. Previous reports have shown inhibitory effects of statins on Rho GTPase and ROCK activity [12,13], as such the finding that inhibition of ROCK activity reverses the effects of simvastatin (indicating that simvastatin may in fact upregulate ROCK activity under these conditions) is intriguing and requires further study to better understand this mechanism.

Our data indicate that the significant and rapid increase in neutrophil adhesive properties, observed in the presence of the TNF- α cytokine, may occur as a consequence of an increased expression of the Mac-1 integrin on the neutrophil surface. Simvastatin, in addition to its other known anti-adhesive properties, can abrogate the expression of TNF- α -stimulated neutrophil Mac-1 and consequently inhibit the elevation of cell adhesive properties under inflammatory conditions. These effects appear to be mediated by a pathway that may involve modulation of ROCK activity.

Acknowledgment

This work was supported by research funds from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and CNPq, Brazil. The Hematology and Hemotherapy Center, UNICAMP, forms part of the National Institute of Blood, Brazil (INCT de Sangue, CNPq/MCT/ FAPESP). The authors would like to thank Ana Leda Longhini and Irene Santos for flow cytometry analysis.

Table 1 Expression of adhesion molecules on the surface of neutrophils

Molecule	CD62L	CD11a	CD11b
	<i>MFI ± SEM</i>	<i>MFI ± SEM</i>	<i>MFI ± SEM</i>
Basal	4 076 ± 681	1 694 ± 77	8 222 ± 988
Simvastatin (10µM)	3 382 ± 733	1 689 ± 81	7 643 ± 836
Y-27632 (20µM)	4 682 ± 884	1 726 ± 82	9 129 ± 1 012
TNF-α	2 225 ± 225***	1 749 ± 85.	10 834 ± 650***
TNF-α + Simvastatin (10µM)	1 832 ± 148	1 747 ± 91	9 297 ± 833##
TNF-α + Simvastatin (10µM) +Y-27632 (20µM)	2 065 ± 125	1 773 ± 79	11 247 ± 996 ⊗⊗⊗

Neutrophils were isolated from the peripheral blood of healthy subjects. Expression of adhesion molecule subunits on the surface of neutrophils, in the absence and presence of a TNF-α (200ng/ml) inflammatory stimulus; and following incubation with simvastatin and the ROCK inhibitor, Y-27632. Expression reported as units of mean fluorescence intensity (MFI) of antibody binding on each neutrophil ± standard error of mean (SEM); n≥8.

***, P<0.001 compared to basal; ##, P<0.01 compared to TNF-α; ⊗⊗⊗, P<0.001 compared to TNF-α and Simvastatin (10µM).

References

1. Soehnlein O. Multiple roles for neutrophils in atherosclerosis. *Circ Res.* 2012; 110:875-88.
2. Conran N, Franco-Penteado CF, Costa FF. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. *Hemoglobin.* 2009; 33:1-16.
3. Chesnutt BC, Smith DF, Raffler NA, Smith ML, White EJ, Ley K. Induction of LFA-1-dependent neutrophil rolling on ICAM-1 by engagement of E-selectin. *Microcirculation.* 2006; 13:99-109.
4. Mihos CG, Salas MJ, Santana O. The pleiotropic effects of the hydroxy-methyl-glutaryl-CoA reductase inhibitors in cardiovascular disease: a comprehensive review. *Cardiol Rev.* 2010; 18:298-304.
5. Stancu C, Sima A. Statins: mechanism of action and effects. *J Cell Mol Med.* 2001; 5:378-87.
6. Huvencers S, Danen EH. Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci.* 2009; 122:1059-69.
7. Eccles KA, Sowden H, Porter KE, Parkin SM, Homer-Vanniasinkam S, Graham AM. Simvastatin alters human endothelial cell adhesion molecule expression and inhibits leukocyte adhesion under flow. *Atherosclerosis.* 2008; 200:69-79.
8. Canalli AA, Proenca RF, Franco-Penteado CF, Traina F, Sakamoto TM, Saad ST, et al. Participation of Mac-1, LFA-1 and VLA-4 integrins in the in vitro adhesion of sickle cell disease neutrophils to endothelial layers, and reversal of adhesion by simvastatin. *Haematologica.* 2011; 96:526-33.
9. Assis A, Conran N, Canalli AA, Lorand-Metze I, Saad ST, Costa FF. Effect of cytokines and chemokines on sickle neutrophil adhesion to fibronectin. *Acta Haematol.* 2005; 113:130-6.
10. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol.* 1982; 78:206-9.
11. Walter T, Suselbeck T, Borggreffe M, Swoboda S, Hoffmeister HM, Dempfle CE. Effect of atorvastatin on cellular adhesion molecules on leukocytes in patients with normocholesterolemic coronary artery disease. *In Vivo.* 2010; 24:189-93.
12. Maher BM, Dhonnchu TN, Burke JP, Soo A, Wood AE, Watson RW. Statins alter neutrophil migration by modulating cellular Rho activity--a potential mechanism for statins-mediated pleotropic effects? *J Leukoc Biol.* 2009; 85:186-93.
13. Xiao Y, Liang L, Pan Y, Lian F, Li L, Lin H, et al. Inhibitory effects of simvastatin on migration and invasion of rheumatoid fibroblast-like synoviocytes by preventing geranylgeranylation of RhoA. *Rheumatol Int.* 2012; in press.
14. Xenos ES, Stevens SL, Freeman MB, Cassada DC, Goldman MH. Nitric oxide mediates the effect of fluvastatin on intercellular adhesion molecule-1 and platelet endothelial cell adhesion molecule-1 expression on human endothelial cells. *Ann Vasc Surg.* 2005; 19:386-92.
15. Smalley DM, Ley K. L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *J Cell Mol Med.* 2005; 9:255-66.

Fig. 1. Adhesion of neutrophils from healthy subjects under basal and TNF- α (200ng/ml)-stimulated conditions (30 min, 37°C; 20 μ g/ml fibronectin ligand) and following pre-incubation (15 min, 37°C) or not with (A) simvastatin (Sim; 10 μ M), Y-27632 (20 μ M) and/ or L-NAME (1 mM), n=8; or (B) simvastatin (Sim; 10 μ M) and/ or geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP; 10 μ M) or farnesyl pyrophosphate (FPP; 10 μ M), n=5. Results expressed as mean \pm standard error of the mean. *** p<0.001 compared to basal adhesion. #, p<0.05; ##, p <0. 01, compared to TNF- α alone. ●●, p<0.01, compared to TNF- α and Simvastatin.

