

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

ANA PAULA TEIXEIRA MONTEIRO

**Participação do LTB₄ na Migração de
Neutrófilos Induzida por Heme**

Rio de Janeiro

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ANA PAULA TEIXEIRA MONTEIRO

**Participação do LTB₄ na Migração de
Neutrófilos Induzida por Heme**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

ORIENTADOR : Prof. Dr. CLÁUDIO DE AZEVEDO CANETTI

Rio de Janeiro

2010

Monteiro, Ana Paula Teixeira

Participação do LTB₄ na migração de neutrófilos induzida por heme.

Rio de Janeiro, 2010

87 páginas.: 27.9 cm

Dissertação apresentada ao Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Área de concentração: Imunologia – Imunidade Inata.

Orientador: Canetti, Cláudio de Azevedo (UFRJ)

1-Inflamação 2- Migração de neutrófilos 3- Leucotrieno B₄ 4- Heme

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Paula Teixeira Monteiro

Participação do LTB₄ na migração de neutrófilos induzida por heme.

Rio de Janeiro, 08 de abril de 2010

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Biofísica, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

Prof. Dr. Claudio de Azevedo Canetti IBCCF/UFRJ

Prof. Dr. Célio Geraldo Freire de Lima IBCCF/UFRJ

Prof. Dr. Tereza Christina Barja Fidalgo UERJ

Prof. Dr. Josiane Sabbadini Neves UFRJ

Revisor e Suplente interno Prof. Dr. Robson Coutinho Silva IBCCF/UFRJ

Suplente externo Prof. Dr. Rodrigo Figueiredo Tinoco UFRJ

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço em especial:

Ao Prof. Cláudio Canetti, pela orientação, paciência e dedicação que tem comigo, e estar sempre presente para discutir resultados. E ainda pelas oportunidades a mim oferecidas, e por estar ao meu lado quando eu precisei.

Ao professor Marcelo Bozza, por ceder materiais e aparelhos sempre que precisei e pela oportunidade oferecida a mim e a mais 48 estudantes de entrar em uma atmosfera de pesquisa e cultura tão bem elaborada e confortável no I Encontro de Inflamação e Imunidade, realizado no Solar da Imperatriz.

Às pessoas do Laboratório da professora Cláudia Benjamim, por sempre me receberem tão bem. E à professora Cláudia Benjamim, pelo ótimo convívio.

Às pessoas do Laboratório de Inflamação, sempre me apoiando com os camundongos e minhas festas sem motivos. Obrigada pelo carinho, conversas divertidas e por serem tão legais! Em particular, ao Piva, pelas notícias mais relevantes. Ao Fábio e à Ilka por sempre estarem dispostos e a postos para tirarem meu sangue, à Tati por ser sempre tão querida e verdadeira, e ao Zamith pela trilha sonora do meu mestrado. À Rafaela e à Carla pelo carinho e por dividir comigo não só a solteirice como também o congresso de Salvador que foi tudo de bom!!!! À Christianne e ao Bruno, pelo apoio, discussão de resultados, e pela Catarina e Henrique, que são muito divertidos.

À Capes e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

A todos da minha família que sempre me apoiaram e mostraram interesse pelo o que eu fazia.

À minha madrinha Regina, por, mesmo longe, sempre estar presente, pela amizade, por dividir comigo o gosto pela leitura e pelo o apoio. Te amo!

À minha Tia Ana Rossini, por sempre me apoiar, escutar minhas dúvidas fossem elas científicas ou não, e por sempre querer o melhor de mim e para mim. Muito obrigada! Te amo!

Aos meus primos, João Paulo e Ana Beatriz, por serem quase que meus irmãos, e por serem sempre tão queridos comigo. Vocês me mantêm criança. Amo vocês!

À Luna e Flor de Liz, por todo o carinho e atenção. Amo vocês!

Aos meus irmãos, Diego e Diana, por sempre estarem por perto quando eu preciso, e me manterem com os pés no chão. Amo vocês!

Aos meus pais, Jorge e Rita, minha base para tudo (caráter, obstinação, dedicação, integridade), por terem me apoiado sempre, e terem perdido algumas horas me escutando falar sobre coisas que eles nem sabem que existem, mas mesmo assim, escutando... Amo vocês! Nada disso seria possível sem vocês do meu lado. Muito obrigada!

O tempo é muito lento para os que esperam
Muito rápido para os que têm medo
Muito longo para os que lamentam
Muito curto para os que festejam
Mas, para os que amam, o tempo é eterno.

Willian Shakespeare

Participação do LTB₄ na Migração de Neutrófilos Induzida por Heme

O heme é uma molécula essencial para os organismos aeróbicos. Hemólise severa observada em estados patológicos como talassemias, malária e síndromes de isquemia-reperusão resultam em grandes quantidades de heme livre. Em diversos casos os mecanismos endógenos de remoção do heme livre ficam sobrecarregados, e então, o heme exerce alguns efeitos tóxicos. O heme é capaz de induzir a migração de neutrófilos *in vivo* e *in vitro*, o que sugere um papel em processos inflamatórios em doenças hemolíticas. O leucotrieno B₄ (LTB₄) é um potente mediador lipídico da inflamação derivado do metabolismo do ácido araquidônico (AA) pela 5-lipoxigenase (5-LO). O LTB₄ é um conhecido fator quimiotático e ativador de neutrófilos, cujas ações são dependentes de sua interação com receptores de membrana BLT1 e BLT2, seus receptores de alta e baixa afinidade, respectivamente. Corpúsculos lipídicos (CLs) são organelas envoltas por uma monocamada de fosfolipídios com uma composição lipídica única, um núcleo rico em lipídios neutros e composição protéica variável, com papel emergente no processo inflamatório. CLs são descritos como compartimentos para síntese de eicosanóides. Nosso objetivo é avaliar a participação de produtos da 5-LO na migração de neutrófilos induzida por heme. Nós observamos que a migração de neutrófilos induzida por heme para cavidade peritoneal é dependente do LTB₄: avaliando através da depleção gênica e inibição farmacológica da 5-LO, assim como através do uso de antagonistas do receptor BLT1. A migração de neutrófilos induzida por heme *in vivo* envolve macrófagos, desde que sobrenadantes de macrófagos estimulados com heme apresentaram atividade quimiotática. Ainda, em camundongos que tiveram o número de macrófagos peritoneais modulados por tioglicolato, a migração de neutrófilos induzida por heme resultou em recrutamento de neutrófilos aumentado. No entanto, a migração de neutrófilos induzida por heme não envolve participação de mastócitos, uma vez que a sua depleção não alterou a migração induzida por heme. O heme foi capaz de induzir a liberação de LTB₄ *in vivo* e *in vitro*. Usando a técnica de imunolocalização de eicosanóides *in situ*, Eicosacell, foi observado que a síntese de LTB₄ ocorre dentro dos corpúsculos lipídicos. Nossos dados sugerem, então, que a migração de neutrófilos induzida por heme *in vivo* requer a síntese e liberação de LTB₄, e que essa síntese ocorre em macrófagos dentro de corpúsculos lipídicos.

Palavras chave: inflamação, migração de neutrófilos, LTB₄, heme

LTB₄ Participation on Neutrophil Migration Induced by Heme

Heme is an essential molecule to living aerobic organisms. Severe hemolysis observed in pathological states such as sickle cell disease, malaria, and ischemia reperfusion results in high levels of free heme. Endogenous mechanisms of removing free heme get easily overloaded, leading to toxic effects. Heme induces human neutrophil migration *in vivo* and *in vitro*, suggesting its role in inflammatory process associated with hemolytic diseases. Leukotriene B₄ (LTB₄) is a potent lipid mediator of inflammation derived from arachidonic acid (AA) metabolism by 5-lipoxygenase (5-LO). LTB₄ is a well known neutrophil chemotactic and activator factor which actions are dependent on its interactions with membrane receptors BLT1 and BLT2, high and low affinity, respectively. Intracellular lipid bodies are organelles surrounded by a monolayer of phospholipids with a unique fatty acid composition, a neutral lipid-rich core and a variable protein composition, with emerging roles in inflammatory process. It is also described as one of the compartments for eicosanoids synthesis. Our aim is to evaluate the participation of 5-LO products on heme-induced neutrophil migration. We observed that neutrophil migration induced by heme to peritoneal cavity is dependent on 5-LO/LTB₄/BLT1 evaluated by 5-LO genetic depletion and also by its pharmacological inhibition, as well as by use of LTB₄ antagonists. Neutrophil migration induced by heme *in vivo* involves macrophages, since supernatants from heme-stimulated macrophages showed chemotactic activity. Moreover, in mice that have its peritoneal macrophage population increased by thioglycolate treatment, heme-induced migration resulted in increased neutrophil recruitment. However, neutrophil migration induced by heme does not involve mast cells, since its depletion did not alter neutrophil migration. Moreover high amounts of LTB₄ were detected in peritoneal lavage fluid of heme injected mice. Macrophages stimulated with heme also release LTB₄ in a dose-response manner. Using a immunolocalization of eicosanoids *in situ* technique, EicosaCell, it was observed that LTB₄ synthesis induced by heme occurs inside lipid bodies in macrophages. Altogether, this data suggest that neutrophil migration induced by heme *in vivo* requires LTB₄ synthesis and release, and that synthesis occurs in macrophages, inside lipid bodies.

Key words: inflammation, neutrophil migration, LTB₄, heme

5-LO	5-Lipoxigenase
ADRP	Proteína relacionada a diferenciação de adiposo
ÁGUA MILIQ	Água purificada no sistema Mili Q
BLT	Receptor do LTB ₄
BSA	Albumina sérica bovina
C5a	Fragmento a do fator de complemento 5
COX	Ciclooxigenase
DAMP	Padrões Moleculares Associados a Dano
DMEM	Dulbeco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDAC	N-(Dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida hidrocloreto
EIA	Ensaio de Ligação a Enzima
ELISA	Ensaio Imunosorvente ligado a Enzima
ERK	Cinase regulada por sinal extracelular
EPM	Erro padrão da média
FLAP	Proteína ativadora da 5-LO
FMLP	Formil-metil-leucil-fenilalanina
GTP	Guanosina trifosfato
HMGB	Caixa do grupo de alta mobilidade 1
HO	Heme oxigenase
HSP	Proteína de choque térmico
I.P.	Intraperitoneal
I.V.	Intravenoso
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IL	Interleucina
KC	Quimiocina derivada de queratinócito
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrieno
MIP	Proteína inflamatória do macrófago
NLR	Receptor semelhante a NOD
NOD	domínio de oligomerização ligado a nucleotídeo
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Tampão salina fosfato
PECAM	Molécula de adesão de plaquetas e células endoteliais
PG	Prostaglandina
PI3K	Fosfatidilinositol 3 Cinase
PLA2	Fosfolipase A ₂
PRR	Receptor de reconhecimento de padrões

PTEN	Fosfatase supressora de tumor com homologia com tensina
RANTES	Secretado e expresso por células T normais, regulado sob ativação
ROS	Espécies reativas de oxigênio
S.C.	subcutânea
TCH	Tiocarbohidrazida
TLR	Receptor semelhante a Toll
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF	Fator de necrose tumoral
VCAM	Molécula de adesão celular vascular

Figura 1: Reconhecimento e ativação de mastócitos e macrófagos residentes de tecidos e desencadeamento da resposta inflamatória com liberação de mediadores inflamatórios, extravasamento plasmático e celular	25
Figura 2: Cascata de adesão de leucócitos ao endotélio e transmigração	28
Figura 3: Cascata da enzima 5-LO.	31
Figura 4: Estrutura química do heme	34
Figura 5: Efeitos tóxicos do heme livre	35
Figura 6: Migração de neutrófilos induzida por heme para cavidade peritoneal de camundongos	51
Figura 2: Redução na migração de neutrófilos induzida por heme em camundongos deficientes na enzima 5-LO	53
Figura 8: Redução no recrutamento de neutrófilos induzida por heme em camundongos que tiveram a enzima 5-LO inibida	54
Figura 9: Inibição do recrutamento de neutrófilos induzida por heme em camundongos tratados com antagonistas de LTB ₄	56
Figura 10: Migração de neutrófilos induzida por heme não envolve participação de mastócitos.	58
Figura 11: Migração de neutrófilos induzida por heme em animais pré com tioglicolato.	60
Figura 12: Sobrenadante de macrófagos estimulados com heme induz migração de neutrófilos	62
Figura 13: Liberação de IL-1 β <i>in vivo</i> induzida por heme	63
Figura 14: Liberação de LTB ₄ induzida por heme <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	65
Figura 14: Maior liberação de LTB ₄ induzida por heme <i>in vivo</i> , após tratamento com tioglicolato.	67
Figura 16: Produção de LTB ₄ por macrófagos dentro de corpúsculos lipídicos.	69
Figura 17 Mecanismo proposto da ação da migração de neutrófilos induzida por heme <i>in vivo</i> .	76

	19
1 Introdução	22
1.1 Inflamação	23
1.1.1 Neutrófilos na Inflamação	26
1.2 Leucotrieno B ₄	30
1.3 Corpúsculos Lipídicos	32
1.4 Heme	33
1.4.1 Resposta Inflamatória ao Heme	34
2 Objetivos	38
2.1 Objetivo Geral	39
2.2 Objetivos Específicos	39
4 Materiais e Métodos	40
4.1 Animais	41
4.2 Reagentes e Ferramentas Farmacológicas	41
4.2.1 Tampão Salina-Fosfato (PBS)	41
4.2.2 PBS Heparinizado	42
4.2.3 Líquido de Turk	42
4.2.4 Panótico	42
4.2.5 Meio de Cultura DMEM	42
4.2.6 Ferramentas Farmacológicas	43

	20
4.3 Métodos	43
4.3.1 Recrutamento de Neutrófilos Induzido por Heme	43
4.3.2 Contagem Total de Células Recuperadas	44
4.3.3 Contagem Diferencial de Células Recuperadas	44
4.3.4 Obtenção de Macrófagos Peritoneais	45
4.3.5 Injeção de Sobrenadante de Macrófagos Estimulados com Heme	45
4.3.6 EIA (Ensaio de Ligação a Enzima)	46
4.3.7 ELISA (Ensaio Imunosorbente Ligado a Enzima)	46
4.3.8 Eicosacell	47
4.4 Análise Estatística	48
5 Resultados	49
5.1 Heme induz migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de camundongos	50
5.2 Inibição da migração de neutrófilos induzida por heme em camundongos 5-LO ^{-/-}	52
5.3 Inibição farmacológica da 5-LO inibe a migração de neutrófilos induzida por heme	54
5.4 Recrutamento de neutrófilos induzido por heme é dependente das ações do LTB ₄	55
5.5 Migração de neutrófilos induzida por heme não requer participação de mastócitos	57
5.6 Migração de neutrófilos induzida por heme envolve participação de macrófagos residentes	59
5.7 Atividade quimiotática para neutrófilos de sobrenadante de macrófagos estimulados com heme	61
5.8 Liberação de IL-1 β induzida por heme	63
5.9 Liberação de LTB ₄ induzida por heme <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	64
5.10 Modulação da liberação de LTB ₄ induzida por heme <i>in vivo</i> em animais pré-tratados com tioglicolato	66
5.11 Determinação <i>in situ</i> da produção de LTB ₄	68

6 Discussão	70
7 Referências	77

1.1) Inflamação

A descrição da inflamação é antiga, tendo indícios em papiros egípcios datando de 3000 aC. Galen foi o primeiro a citar os quatro sinais cardinais da inflamação: rubor, calor, tumor e dor (129-199 dC.). A perda da função do local inflamado foi acrescentada por Virchow em 1858 (Ryan, G.B. & Majno, G., 1977).

A inflamação é uma resposta do organismo a agentes infecciosos, dano tecidual ou celular, ou a toxinas. Células da imunidade ao entrarem em contato com esses agentes se tornam, então, ativadas e liberam uma gama de fatores que são os promotores dos sinais cardinais da inflamação citados anteriormente. Essas reações inflamatórias levam ao recrutamento de células que vão ter por objetivo remover os agentes infecciosos, remover componentes dos tecidos lesados e iniciar o reparo. A resposta inflamatória tem como objetivo proteger o organismo de maior dano tecidual e restaurar sua função. No entanto, em certas condições, a própria resposta imune pode causar danos ao tecido, podendo levar até mesmo à falência do tecido ou mesmo do órgão.

Em relação à agentes infecciosos, receptores que reconhecem padrões moleculares associados à patógenos (PAMP) foram descritos, sendo os receptores semelhantes à Toll (TLR) e aqueles semelhantes à NOD (NLR) os mais bem estudados, principalmente a respeito de infecções bacterianas (Harris, H.E. & Raucchi, A. 2006; Medzhitov, R, 2008). Aliados a esses receptores que reconhecem PAMPs, outros receptores como os que reconhecem DAMPs (sigla que engloba moléculas associadas a dano), receptores “scavengers”, receptores de manose, receptores de complemento, receptores de imunoglobulinas e receptores de dectina são conhecidos como receptores de reconhecimento de padrão (PRR).

No entanto, em certos casos, injúria e morte celular ocorrem em um ambiente estéril, sendo os mais comuns o trauma, isquemia e isquemia-reperfusão. Embora essas respostas inflamatórias ocorram na ausência de infecção, eles induzem muitos eventos comuns às respostas inflamatórias a microorganismos como ativação de células dendríticas e recrutamento de neutrófilos e macrófagos. Exatamente como a injúria tecidual é detectada na ausência de infecção, e quais eventos moleculares disparam a resposta inflamatória, ainda é pouco entendido (Jiang, D. *et al.*, 2005; Mollen, K.P. *et al.*, 2006; Wu, H. *et al.*, 2007). Apesar da grande quantidade de trabalhos que demonstram a participação de TLRs e de outros receptores da imunidade inata na detecção da injúria estéril.

O reconhecimento inicial desses padrões moleculares é feito por PRRs localizados em células residentes de tecidos, podendo citar macrófagos, células dendríticas, mastócitos entre outras. Essas células respondem a esse reconhecimento através da liberação de mediadores inflamatórios, como sugerido por Thomas Lewis (Ryan, G.B. & Majno, G., 1977). Dentre esses mediadores inflamatórios se encontram aminas vasoativas como histamina, citocinas como TNF- α (fator de necrose tumoral-alpha), IL-1 (interleucina-1), quimiocinas e eicosanóides (como prostaglandinas e leucotrienos-LTs). Dentre os efeitos da liberação desses mediadores estão o extravasamento de proteínas plasmáticas e o recrutamento de leucócitos, principalmente de neutrófilos (Soter N.A. & Austen K.F., 1976; Gauldie, J. *et al.*, 1985). Um resumo esquemático do desencadeamento da resposta inflamatória pode ser visto na figura 1.

Com a chegada inicial de neutrófilos, e posterior de monócitos (que se diferenciam em macrófagos no tecido) ocorre a tentativa de eliminar o agente causador da injúria, podendo este ser um patógeno, quando, então, os neutrófilos vão tentar

eliminá-lo através da liberação do conteúdo de seus grânulos, espécies reativas de oxigênio (ROS), de nitrogênio (RNS) e elastases. No caso de ser uma injúria causada por estresse celular ou mau funcionamento de alguma célula, principalmente macrófagos são requisitados para ajudar esse tecido afetado a superar o estresse e restabelecer sua funcionalidade (Medzhitov, R. 2008).

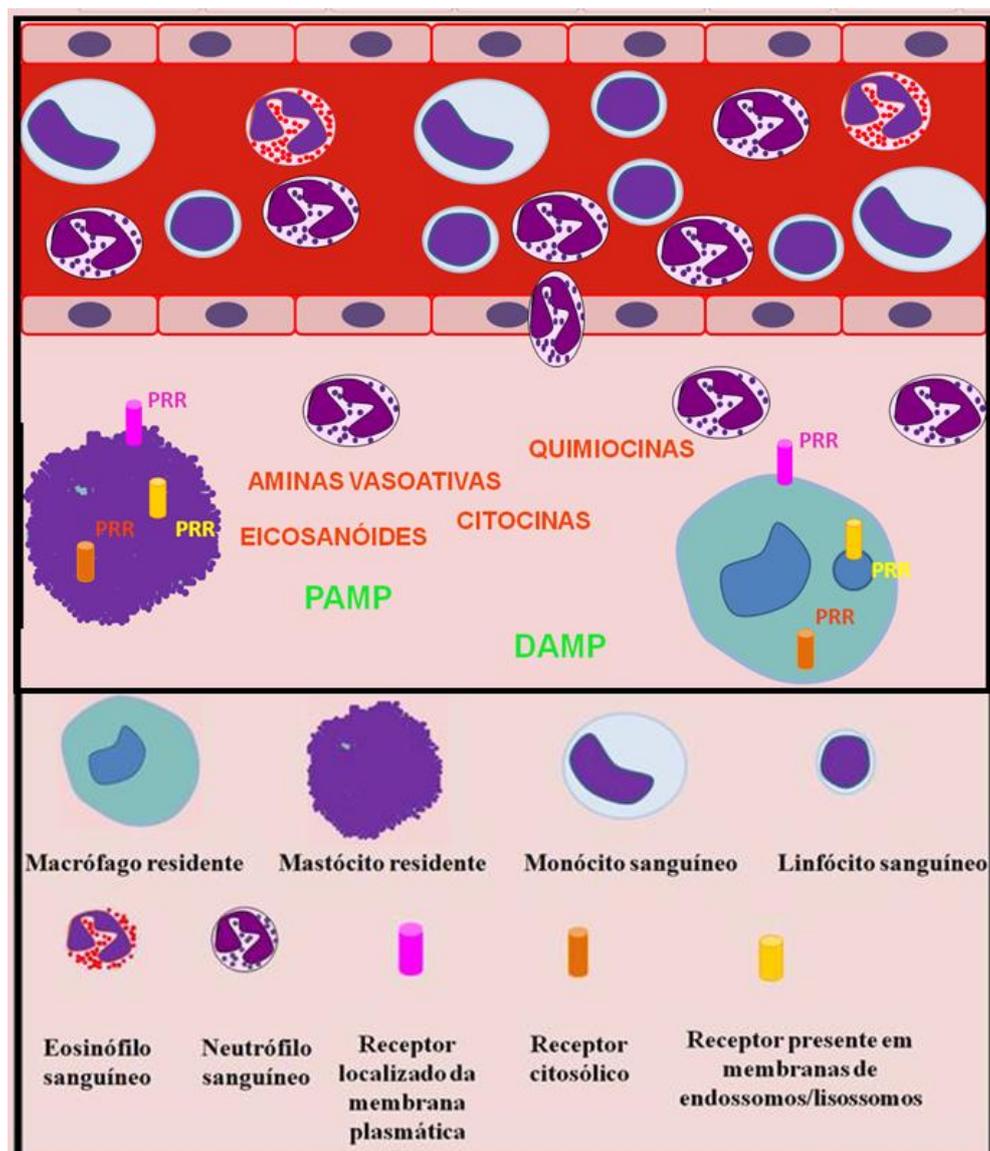


Figura 1: Reconhecimento e ativação de mastócitos e macrófagos residentes de tecidos e desencadeamento da resposta inflamatória com liberação de mediadores inflamatórios, extravasamento plasmático e celular

Uma resposta inflamatória bem sucedida resulta na eliminação do agente causador da injúria, seguida da resolução e reparo do tecido, que vai ocorrer, principalmente, por macrófagos residentes e recrutados (Serhan, C. N. & Savill, J., 2005). Sendo a troca na liberação dos mediadores, principalmente dos mediadores lipídicos, como a diminuição na liberação de prostaglandinas (pró-inflamatórias) e aumento na liberação de lipoxinas (antiinflamatórias) (Serhan, C. N. & Savill, J, 2005; Serhan, C. N., 2007).

1.1.2) Neutrófilos na Inflamação

Neutrófilos representam 50% a 60% do total de leucócitos circulantes e atuam na defesa contra agentes infecciosos ou substâncias não próprias que penetram as barreiras físicas do corpo. Estas células são produzidas na medula óssea em uma taxa de 10^{11} células por dia (Smith, J.A., 1994).

Morfologicamente, os neutrófilos são células terminalmente diferenciadas, ricas em grânulos citoplasmáticos e apresentam um núcleo com a cromatina densa e lobulada, sem nucléolo. Os grânulos contêm vários receptores, componentes enzimáticos e proteínas antimicrobianas, como CD63, CD68, defensinas, elastases, citocromo b e lactoferrina (Borregaard, N. *et al.*, 1995; Smith, J.A., 1994).

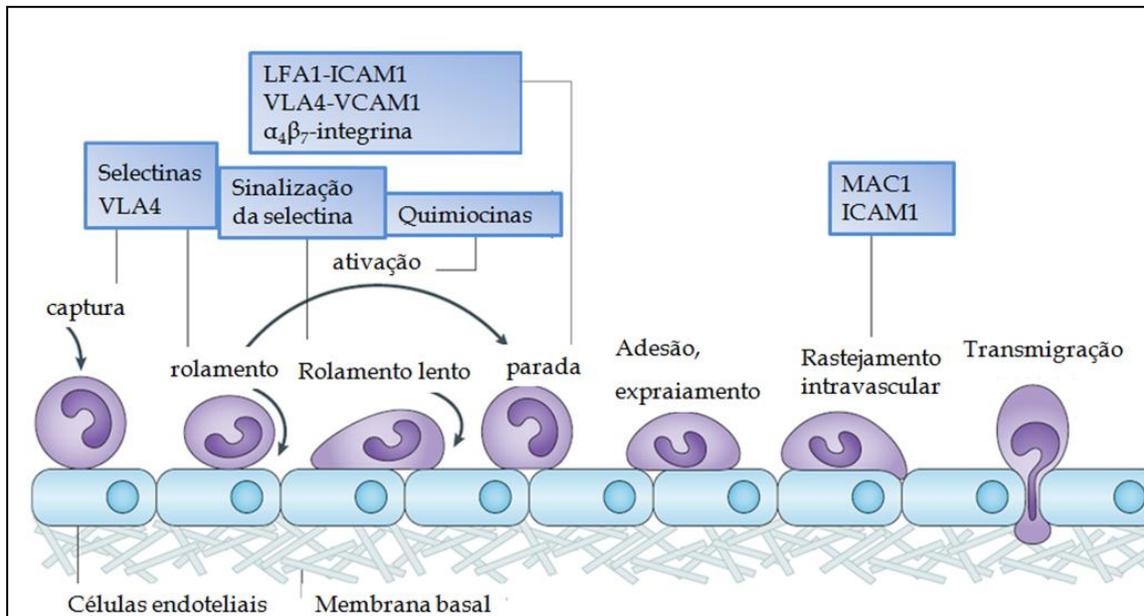
Os neutrófilos são células classicamente caracterizadas como sendo as primeiras células a chegar ao foco inflamatório. Isso se deve aos mediadores inflamatórios liberados por células residentes do tecido que sofreu a injúria (Soter, N.A. & Austen K.F., 1976; Gauldie, J. *et al.*, 1985). Esses mediadores inflamatórios levam a um extravasamento de proteínas plasmáticas e de neutrófilos. Esse extravasamento seletivo de células ocorre devido a uma ativação das células endoteliais que passam, então, a

expressar moléculas de adesão como selectinas (Jutila, M.A. *et al.*,1989) que se ligam selectinas presentes em neutrófilos (Fries, J.W. *et al.*,1993).

Há quase 200 anos atrás, Metschnikoff já descrevia a migração de leucócitos e fagocitose. O primeiro modelo sugerido ficou conhecido como o paradigma de múltiplos passos da migração e apresentava três etapas para a migração de leucócitos: (i) rolamento dos leucócitos pelas células endoteliais mediado por selectina, (ii) os leucócitos fracamente aderidos ao endotélio se encontravam tão próximos deste que, então, se tornavam ativados por quimiocinas presentes na região apical do endotélio e (iii) adesão firme dependente de integrina (Butcher, E. C., 1991; Springer, T. A., 1995). Com o avanço nas pesquisas, pôde-se observar que essas três etapas para a transmigração são um pouco mais divididas, como pode ser visto na figura 2, onde o rolamento mediado por selectina ganhou uma subdivisão, o rolamento lento. A etapa dependente de integrina também passou a ser caracterizada por pelo menos dois eventos, a mudança de rolamento para firme adesão (que é mediado pelo aumento da avidéz do leucócito pelo endotélio) e uma fase seguinte onde se observa a estabilização da adesão. Sendo ainda adicionada mais uma etapa, o rastejamento intravascular que antecede a transmigração (van Buul, D.J. *et al.*, 2004; Ley, K. *et al.*, 2007).

As moléculas de adesão envolvidas na interação leucócito-endotélio podem ser divididas em três famílias principais: selectinas, integrinas e a super família das imunoglobulinas. As selectinas são uma família de moléculas de adesão que medeiam interações adesivas entre endotélio, leucócitos e plaquetas. L-selectinas são expressas constitutivamente pela maioria dos leucócitos circulantes e pode se ligar a carboidratos encontrados em várias células endoteliais incluindo P-selectina e E-selectina. P-

selectina é constitutivamente presente em células endoteliais e plaquetas e podem ser rapidamente expressa na superfície celular de células endoteliais e neutrófilos por trans-



Adaptado de Ley, 2007

Figura 2: Cascata de adesão de leucócitos ao endotélio e transmigração.

locação de moléculas pré-formadas e estocadas em corpúsculos de Weibel-palade e grânulos alpha, respectivamente. E-selectina é restrita a células endoteliais, e sua expressão é regulada em resposta a $IL-1\beta$, $TNF-\alpha$ e LPS (lipopolissacarídeo). Já as integrinas presentes nos leucócitos reconhecem ligantes da superfamília das imunoglobulinas presentes no endotélio como ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1), ICAM-2 e VCAM-1 (molécula de adesão de célula vascular-1). Tanto ICAM-1 como ICAM-2 são expressas constitutivamente em células endoteliais. No entanto, ativação por citocinas como $IL-1\beta$ e $TNF-\alpha$ podem regular positivamente a expressão de ICAM-1. Já na migração transendotelial as moléculas PECAM-1

(molécula de adesão de plaquetas e células endoteliais) são as protagonistas (Elliot, N.S. & Wallace, J.L., 1998; Panés, J. *et al.*, 1999).

Diversos fatores atuam como quimioatraentes para neutrófilos. Eles podem, inicialmente, ser divididos em diretos e indiretos. Sendo os diretos aqueles capazes de induzir migração *in vitro*, como o fMLP (formil-metionil-leucil-fenilalanina), leucotrieno B₄ (LTB₄), C5a e IL-8, e os indiretos, aqueles incapazes de causar migração *in vitro*, mas que o fazem *in vivo*, como IL-1, TNF- α e LPS, por meio de um mecanismo dependente da liberação ou produção de outras substâncias (Harada. A., *et al.*, 1994; Yokomizo, T. *et al.*, 1997).

Os receptores de fatores quimioatraentes diretos em neutrófilos são receptores com sete domínios transmembranares e acoplados a proteína G. Esses receptores iniciam adesão e motilidade via proteínas G, levando à ativação de integrina por uma sinalização “de dentro para fora” (inside-out), seguida por polimerização coordenada de actina, esticando a parte da frente da célula (em direção ao gradiente formado por quimioatraente) e contraindo a parte de trás. A migração direcional de leucócitos é acompanhada da polarização do corpo celular, de citoesqueleto de actina e tubulina, e de uma grande variedade de proteínas de sinalização intracelular como PI3K (Fosfatidilinositol 3 Quinase.), PTEN (Fosfatase supressora de tumor com homologia com tensina), GTPases do tipo Rho, e subunidades $\beta\gamma$ da proteína G.

Ao chegar ao foco da inflamação os neutrófilos tentarão eliminar o agente injuriante através da fagocitose de patógenos e da liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e de conteúdo granular como proteinase 3, defensinas, elastase entre outros (Borregaard, N. *et al.*, 1995; Medzihtov, R., 2008).

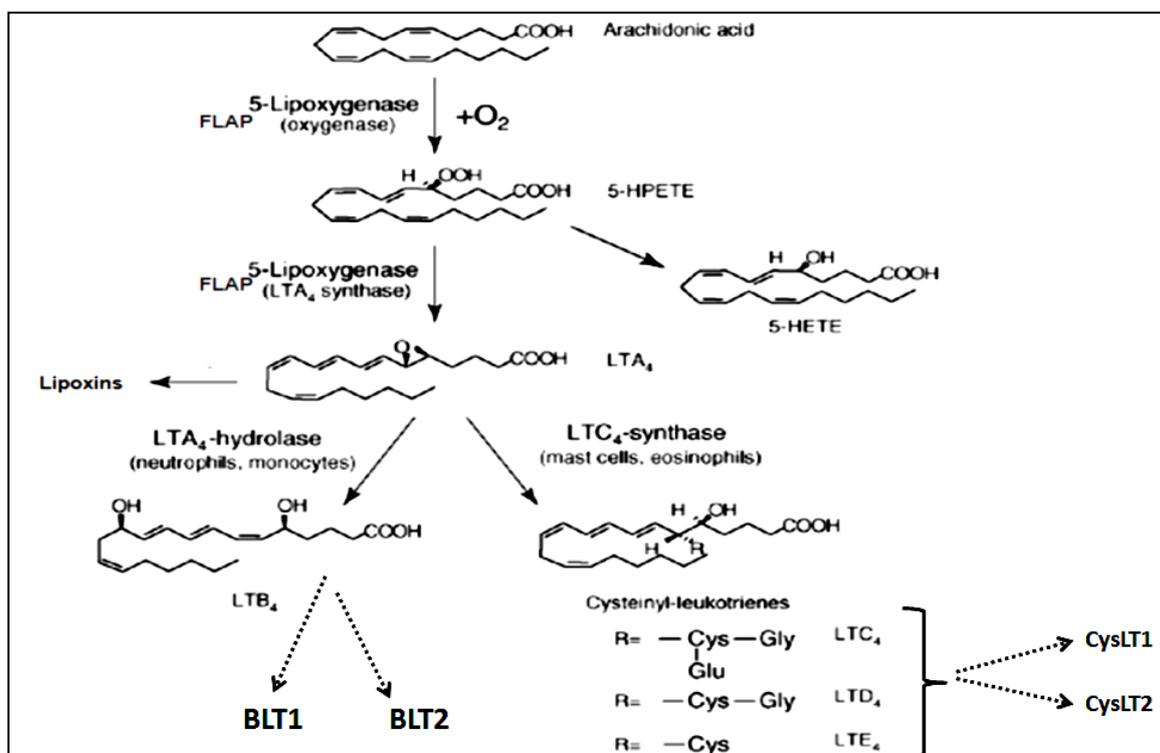
1.2) Leucotrieno B₄

A biossíntese do LTB₄, e dos demais leucotrienos é resultado da atividade da enzima 5-Lipoxigenase (5-LO). Esta, com auxílio de sua proteína ativadora (FLAP) oxigena no carbono 5 do ácido araquidônico livre, que foi recém hidrolisado de fosfolípidios de membrana pela fosfolipase A₂ (PLA₂), e em seguida o desidrata, gerando o então, o primeiro LT, o LTA₄, que é um intermediário instável. O LTA₄ pode sofrer a ação de duas enzimas: a LTC₄ sintase ou a LTA₄ hidrolase. Quando metabolizado pela LTC₄ sintase, o LTA₄ é conjugado a uma glutationa dando origem ao LTC₄. Por ação de duas peptidases, o LTC₄ pode dar origem ao LTD₄ e ao LTE₄, estes três conhecidos como cisteinil-LTs, que foram inicialmente descritos como substância de reação lenta da anafilaxia na década de 30, sendo posteriormente associados com asma e reações de hipersensibilidade (Palmlblad, J. *et al.*, 1981, ZIPSER, R.D. & LAFFI, G., 1985). O LTA₄ quando sofre a ação da LTA₄ hidrolase, gera o LTB₄ (Henderson, W.R., 1994). Um resumo da cascata da enzima 5-LO pode ser visto na figura 3.

LTB₄ é um potente mediador lipídico com propriedade quimioatraentes que é rapidamente gerado por leucócitos, por exemplo neutrófilos, macrófagos e mastócitos quando ativados. Ele têm grande papel na resposta inflamatória, sendo descrito em diversas doenças inflamatórias como asma, reações de hipersensibilidade, psoríase e artrite reumatóide (Henderson, W.R., 1994; Ohnishi, H *et al.*, 2008). Ele tem suas atividades biológicas exercidas através de seus dois receptores, o BLT1 e o BLT2 (Borgeat, P. e Samuelsson, B., 1979; Yokomizo, T. *et al.*, 2000). O receptor BLT1 é o receptor de alta afinidade do LTB₄, enquanto o BLT2 apresenta uma menor afinidade. Ambos são receptores com sete domínios transmembranares e acoplados à proteína G.

Dentre as ações descritas para o LTB_4 , se encontram a quimiotaxia de neutrófilos, assim como sua desgranulação, adesão e aumento da sobrevivência. Além das ações do LTB_4 sobre neutrófilos, já foi descrita a expressão do seu receptor de alta afinidade, BLT1, em diversos tipos celulares como macrófagos, células de músculo liso, células endoteliais, células T ativadas, mastócitos e células dendríticas (Mathis, S. *et al.*, 2007). Em camundongos a expressão do receptor BLT2 já foi descrita em diversos tipos celulares, sendo o baço e leucócitos de sangue periféricos os que se mostraram com maior expressão (Yokomizo, T. *et al.*, 2000). No entanto suas funções ainda não estão claras (Mathis, S. *et al.*, 2007).

Diferentemente de outros mediadores inflamatórios, os LTs não ficam estocados como componentes pré-formados dentro de suas células secretoras. Na verdade eles são sintetizados *de novo* a partir de fosfolipídios de membrana (Henderson, W.R., 1994).



Modificado e adaptado de Radmark, O *et al.*, 2007

Figura 3: Cascata da enzima 5-LO.

1.3) Corpúsculos Lipídicos

Os corpúsculos lipídicos são organelas citoplasmáticas ricas em lipídios e que são encontradas em células de plantas, bactérias e animais (Murphy, D.J., 2001). Também conhecidos como gotículas lipídicas (“lipid droplets”), corpúsculos lipídicos são organelas osmiofílicas, compostas de um centro rico em lipídios neutros e uma composição protéica variável. Em contraste à dupla camada lipídica encontrada em outras organelas, corpúsculos lipídicos são envoltos por uma monocamada de fosfolipídios (Dvorak, A.M. *et al.*, 1983; Murphy, D.J., 2001; van Meer, G. 2001; Tauchi-Sato, K. *et al.*, 2002).

Corpúsculos lipídicos são destruídos por colorações convencionais, como aquelas em que os reagentes têm por base o álcool, como May-Grunwald-Giemsa que causa a dissolução dos corpúsculos lipídicos (Pacheco, P. *et al.*, 2002). Para visualização de corpúsculos lipídicos as células precisam ser fixadas com paraformaldeído (DiDonato & Brasaemle, 2003) e coradas com ósmio (Weller, P. *et al.*, 1991; Bozza, P.T. *et al.*, 1996), *oil red O*, ou *Nile red*, entre outros (D’Avila, H. *et al.*, 2008).

Diversos estudos vêm mostrando que a biogênese de corpúsculos lipídicos envolve transferência de lipídios e proteínas do retículo endoplasmático, mas o processo exato ainda precisa ser apurado (Bozza, P.T. *et al.*, 2009).

Embora no passado a presença de corpúsculos lipídicos estivesse associada apenas com estoque e transporte de lipídios, hoje já está bem estabelecido que essas organelas são estruturas dinâmicas, funcionalmente ativas e altamente reguladas (Bozza, P.T. *et al.*, 2007). Somado a isso, está bem caracterizado que leucócitos de mamíferos não estimulados apresentam um número pequeno de corpúsculos lipídicos, e esse

número se encontra aumentado em respostas inflamatórias, em células como neutrófilos, macrófagos e eosinófilos, mas também em outras células que não leucócitos, como células endoteliais. O acúmulo de corpúsculos lipídicos em leucócitos já foi descrito tanto em casos clínicos, como experimentais, incluindo neoplasias, sepse bacteriana, inflamação alérgica pulmonar, entre outras patologias (Bozza, P.T. *et al.*, 2009).

No contexto da resposta inflamatória, já foi descrita a presença de diversas citocinas e quimiocinas dentro dos corpúsculos lipídicos, como TNF- α , RANTES, IL-6 (Lim, K.G. *et al.*, 1996). Porém grande avanço foi feito no estudo da produção de eicosanóides dentro dos corpúsculos lipídicos. A produção de eicosanóides já foi descrita como ocorrendo em três compartimentos celulares: membrana perinuclear, fagossomos e corpúsculos lipídicos (revisado por Bandeira Melo e comunicado oralmente). Sobre a produção de eicosanóides em corpúsculos lipídicos, inicialmente foi descrita uma correlação entre a gênese de corpúsculos lipídicos e aumento da produção de eicosanóides LTB₄ e PGE₂ (prostaglandina E₂). Através de outras metodologias foi possível observar não só uma correlação entre aumento de corpúsculos lipídicos e produção de eicosanóides, como a localização de diversas proteínas envolvidas na síntese de eicosanóides nos corpúsculos, como PLA₂, 5-LO, 15-LO, COX-2, LTC₄ sintase. Sendo ainda possível visualizar a formação “in situ” desses eicosanóides como LTB₄, LTC₄ e PGE₂, em resposta a estímulos *in vitro* e *in vivo* (Bozza, P.T. *et al.*, 2007).

1.4) Heme

O heme é uma molécula altamente conservada na natureza, presente desde procariotos. É composto de um íon de ferro ligado a um anel tetrapirrólico (figura 4) (Beri, R. & Chandra, R. 1993). O heme é uma molécula que atua como grupamento prostético de diversas proteínas, entre elas, hemoglobina, mioglobina, citocromo,

catalases, desenvolvendo diversas funções como, por exemplo, transporte e armazenamento de oxigênio, transporte de elétrons, detoxificação de drogas, sinalização celular, diferenciação celular e proliferação (Abraham, N.G. *et al.*, 1983, 1988; Beri, R. & Chandra, R. 1993; Sassa, S. & Nagai, T., 1996; Ponka, P., 1999).

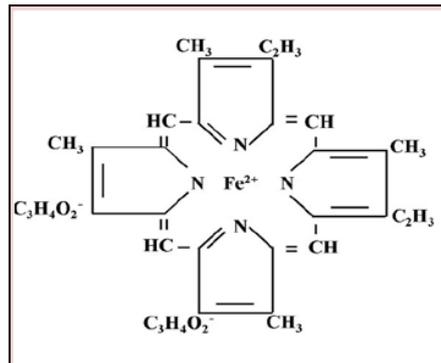


Figura 4: Estrutura química do heme. (Wagener, F.A.T.G., *et al.*, 2003)

O heme é sintetizado em todas as células nucleadas humanas por um processo que envolve uma série de reações enzimáticas ocorrendo parte no citoplasma e parte na mitocôndria.

O heme pode ser catabolizado pela heme-oxigenase (HO), que é uma enzima limitante no catabolismo do heme, gerando biliverdina, ferro e monóxido de carbono (CO). A biliverdina é rapidamente convertida a bilirrubina pela biliverdina redutase. E tanto a bilirrubina, quanto o CO e ferro apresentam efeito citoprotetor (Wagener, F.A.T.G., *et al.*, 2003).

1.4.1) Resposta Inflamatória ao Heme

Em eventos fisiológicos onde ocorre hemólise, tanto hemoglobina, quanto heme são liberados na circulação. Existem proteínas plasmáticas que são responsáveis pela

remoção de hemoglobina e heme da circulação, são elas, haptoglobina e hemopexina, respectivamente (Tolosano *et al.*, 2002; Kumar, S. & Bandyopadyay, U., 2005).

Porém, em algumas situações patológicas onde ocorre grande liberação de heme na sua forma livre, como por exemplo na malária, hemorragias, isquemia-reperfusão, anemia hemolítica, talassemias, miólise, entre outras doenças, os sistemas de remoção do heme ficam sobrecarregados e então o heme exerce alguns efeitos tóxicos como geração de espécies reativas de oxigênio, injúria a órgãos, hemólise e pode ainda desencadear uma resposta inflamatória, como está simplificado na figura 5 (Kumar, S. & Bandyopadyay, U., 2005).

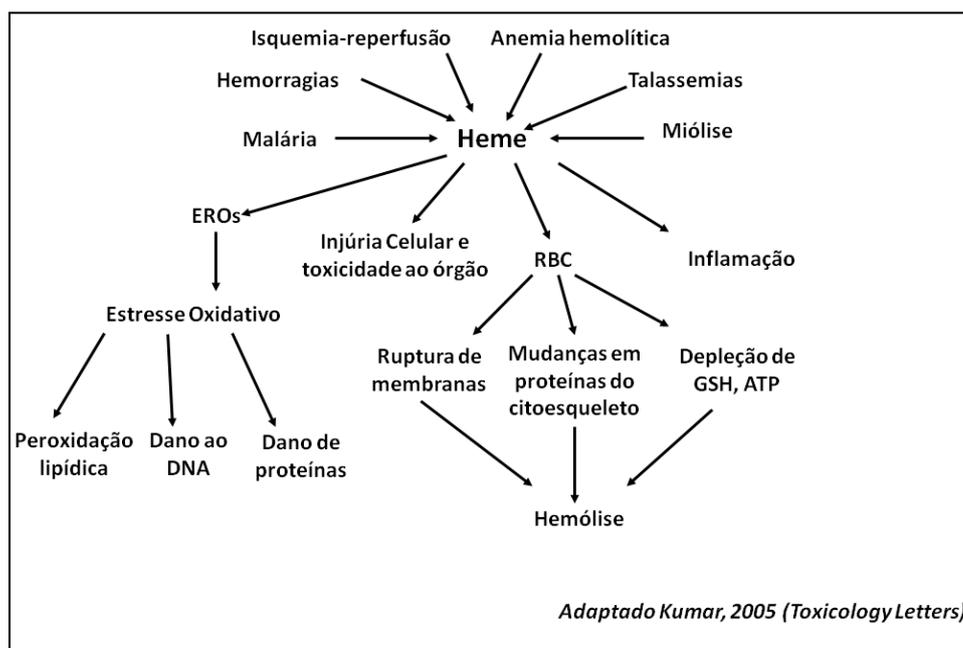


Figura 5: Efeitos tóxicos do heme livre.

Já foi descrito que o heme é capaz de induzir a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e sanguíneas tanto *in vivo* como *in vitro* (Wagener, F.A.D.T.G. *et al.*, 1997; Wagener, F.A.D.T.G. *et al.*, 2001), assim como promover o aumento da permeabilidade vascular e do influxo de leucócitos (Wagener, F.A.D.T.G. *et al.*, 2001).

Em leucócitos, já foi descrito que o heme é capaz de induzir a migração de neutrófilos *in vivo*, no modelo de pleurisia em ratos e *in vitro*, no modelo de câmara de Boyden com neutrófilos humanos por Graça-Souza, A.V. e colaboradores (2002). A migração de neutrófilos *in vivo* em camundongos induzida por heme também foi estudada por Figueiredo, R.T. e colaboradores (2007) onde verificou-se que o TLR4 não é necessário nesse processo, assim como para a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e expressão de HO. Já, Porto, B.N. e colaboradores (2007) observou que a migração de neutrófilos humanos induzida por heme *in vitro* depende de cascatas de sinalização características de quimioatraentes, como receptores acoplados a proteína G.

Figueiredo, R.T. e colaboradores (2007) mostrou que heme induz a liberação de TNF- α por macrófagos humanos e murinos *in vitro*, e a liberação de KC *in vitro* por macrófagos murinos, sendo essa liberação dependente de TLR4. No entanto, não foi capaz de induzir a liberação de TNF- α *in vivo* após injeção intraperitoneal de heme, nem a liberação de IL-6 e IP-10 por macrófagos murinos *in vitro*.

Um terceiro aspecto importante da resposta inflamatória, a geração de ROS (um evento envolvido no processo de “killing” de patógenos) foi avaliado por Porto, B.N. e colaboradores (2007) e Figueiredo, R.T. e colaboradores (2007). No trabalho de Figueiredo é demonstrado que o heme não depende de TLR4 para gerar ROS. Enquanto que Porto demonstra que a indução da geração de ROS induzida por heme envolve receptores acoplados a proteína G α_i e PI3K.

Ainda sobre os efeitos do heme sobre neutrófilos, Graça-Souza e colaboradores (2002) mostraram que ele é capaz de disparar o “burst” oxidativo e a polimerização de actina, enquanto que Arruda e colaboradores (2004) demonstraram que o heme era capaz de retardar a apoptose de neutrófilos. Todos esses dados sugerem que o heme é

um potente ativador de neutrófilos, e o faz de forma semelhante a diversos quimiotáticos para neutrófilos já descritos como LTB₄ e IL-8.

Objetivo Geral

Estudar os mecanismos pelos quais a molécula heme induz a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal em camundongos.

Objetivos Específicos

- 1) Avaliar o envolvimento de células residentes da cavidade peritoneal;
- 2) Avaliar a participação de produtos da 5-LO no processo de migração de neutrófilos induzido por heme.
- 3) Estudar o sítio de produção de LTB₄ *in vivo* induzido por heme.

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, SV129, além de camundongos deficientes para enzima 5-LO (5-LO^{-/-}), todos pesando entre 18-22g. Os animais foram mantidos sob condições de temperatura (23-25°C) e ciclo claro/escuro controlados, com livre acesso à ração e água. Os animais deficientes foram obtidos da Jackson Farm e mantidos no Laboratório de Animais Transgênicos do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o comitê de ética para animais de experimentação do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Lei nº 11.794, de 08.10.2008).

4.2 Reagentes e Ferramentas farmacológicas

4.2.1 Tampão Salina-Fosfato (PBS)

Cloreto de Sódio P.A. (Merk)	8,0 g
Cloreto de Potássio (Merk)	0,2 g
Fosfato de Sódio dibásico P.A. (Merk)	1,15 g
Fosfato de Potássio monobásico P.A. (Merk)	0,2 g
Água Mili-Q qsp.	1 L

O pH foi ajustado para 7,2 com NaOH ou HCl e a solução filtrada e autoclavada antes de utilizada.

4.2.2 PBS Heparinizado

Heparina (Cristália)	5 U ml ⁻¹
----------------------	----------------------

4.2.3 Líquido de Turk

Ácido Acético glacial P.A. (Merk)	20 mL
-----------------------------------	-------

Cristal Violeta (Merk)	50 mg
------------------------	-------

Água Mili-Q qsp	1 L
-----------------	-----

4.2.4 Panótico (Hema 3 Stain Set)

As lâminas foram coradas de acordo com as especificações do fabricante (Fisher Diagnosis, VA).

4.2.5 Meio de Cultura “Dulbeco’s Modified Eagle’s Medium” (DMEM)

DMEM (Sigma)	10,4 g
--------------	--------

Bicarbonato de Sódio P.A. (Merk)	3,7 g
----------------------------------	-------

Penicilina	100 U mL ⁻¹
------------	------------------------

Streptamicina	100 µg mL ⁻¹
---------------	-------------------------

Água Mili-Q qsp	1 L
-----------------	-----

O pH foi ajustado para 7,2 e o meio filtrado em milipore 0,22 µm.

4.2.6 Ferramentas Farmacológicas / Reagentes

	Dose usada	Via de administração
Heme (Porphyrin Products) dissolvido em DMSO (Dimetil Sulfóxido)	50 nmoles	i.p.
Zileuton (ABOTT) dissolvido em DMSO 1%	3 mg kg ⁻¹	i.v.
AA861 (BioMol) dissolvido em etanol 5%	3 mg kg ⁻¹	s.c.
CP 105,696 (BioMol) dissolvido em PBS	3 mg kg ⁻¹	s.c.
LY292476 (Ely Lilly) dissolvido em PBS	2 mg kg ⁻¹	s.c.
Tioglicolato (DIFCO) 3% H ₂ O (autoclavado)	1 mL	i.p.
Composto 48/80 (Sigma) dissolvido em PBS	0,6 mg kg ⁻¹ 2vezes ao dia por 3 dias, e no 4 ^o dia 2 doses de 1,2 mg/kg	i.p.
Anticorpo α -LTB ₄ (Cayman Chemicals)	1:1	
Anticorpo secundário α -Rabbit Alexa 488	1:1000	
Anticorpo policlonal α -ADRP (Research Diagnosis)	1:300	
Anticorpo secundário α -Guinea Pig Alexa 546	1:1000	

4.3 Métodos

4.3.1 Recrutamento de Neutrófilos Induzido por Heme

O recrutamento de neutrófilos foi avaliado nas diferentes linhagens de camundongos utilizadas após a administração i.p. de heme (50 nmoles) ou salina (com adição do mesmo volume de DMSO utilizado na injeção do heme). Quatro horas após a aplicação do estímulo, os camundongos foram sacrificados em câmaras de éter, sendo a cavidade

peritoneal lavada com 3 mL de PBS heparinizado. Do exudato obtido, foram feitas as contagens total e diferencial das células presentes e o sobrenadante (centrifugado) congelado à -20°C para ser usado nas dosagens de LTB_4 . Em alguns experimentos, os animais receberam pré-tratamento com zileuton (3mg Kg^{-1} ; 20 min antes do ensaio; i.v.), AA 861 (3mg kg^{-1} ; 30 min antes do ensaio; s.c.), CP 105,696 (3mg kg^{-1} ; 30 min antes do ensaio; s.c.), LY292476 (2mg kg^{-1} ; 30 min antes do ensaio; s.c.), composto 48/80 (Sigma; 0.6 mg kg^{-1} , i.p., duas vezes ao dia por 3 dias e $1,2\text{ mg kg}^{-1}$, i.p., no quarto dia, e o desafio com heme realizado no quinto dia), injeção de água destilada (1 mL, i.p., 72 h antes) ou Tioglicolato 3% (1 mL, i.p., 72 h antes) antes da administração de heme.

4.3.2 Contagem Total das Células Recuperadas

Alíquotas de 20 μL do lavado peritoneal foram diluídas em líquido Turk, na proporção 1:20, sendo a contagem realizada na câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio óptico (aumento de 40x) e contador manual.

4.3.3 Contagem Diferencial das Células Recuperadas

Os esfregaços para contagem diferencial foram preparados em citocentrífuga (Citocentrífuga - Incibrás) e corados com Corante Hema 3 Stain Set, sendo as células examinadas em microscópio óptico (Olympus CX31, Tokio, Japão) através da objetiva de imersão em óleo (aumento de 100x). Foram contadas 100 células por lâmina, diferenciando-se três tipos celulares: neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares. Através da percentagem de neutrófilos e da quantidade de células presentes na cavidade

peritoneal (dada pela contagem total) obteve-se o número de neutrófilos presentes na cavidade peritoneal.

4.3.4 Obtenção de Macrófagos Peritoneais

Após lavagem da cavidade peritoneal dos camundongos com PBS heparinizado, o exudato foi centrifugado. Suspensões de células peritoneais obtidas de camundongos C57Bl/6 foram resuspendidas na concentração de 1×10^6 cels mL^{-1} em DMEM sem soro fetal bovino, sendo imediatamente plaqueados 1,5 mL por poço da placa de 24 poços, e incubados por 1 h à 37°C e atmosfera de 5% de CO_2 . Após esse período, as células foram lavadas com meio incompleto, para remoção das células não aderentes, e incubadas por 30 min com heme (em três doses diferentes- 3, 10 e 30 nmoles). Ao final dos 30 min, o heme foi removido, e as células lavadas com meio incompleto e mantidas com 1 mL de meio fresco sem soro fetal bovino por 6 h à 37°C e atmosfera de 5% de CO_2 . Após esse tempo, o meio foi recolhido em tubos de 15 mL e centrifugados (1500 rpm por 8 min), e o precipitado descartado. Esse sobrenadante foi utilizado para avaliação de fatores quimiotáticos para neutrófilos assim como para determinação de LTB_4 .

4.3.5 Injeção do Sobrenadante de Macrófagos Estimulados com Heme

O sobrenadante obtido no item 4.3.4 foi injetado na cavidade peritoneal de camundongos e após 4 h a migração foi avaliada como descrito anteriormente.

4.3.6 EIA (Ensaio Ligado a Enzima)

As concentrações de LTB₄ nos sobrenadantes (*in vitro*) e exudatos (*in vivo*) foram determinadas por EIA (ensaio ligado a enzima) (Chayman Chemicals, USA) de acordo com as especificações do fabricante. À placa recoberta com anticorpo fornecida no kit foi adicionada as amostras ou LTB₄ (para formar a curva padrão), traçador e anticorpo, e incubado por 18 h em ambiente a 4° C, úmido e protegido de luz. Após o período de incubação, o conteúdo da placa foi descartado e os poços foram lavados com tampão do EIA adicionado 0,05% de Tween 20 por 5 vezes. Ao final da lavagem, foi adicionado ao poço 200 µL de reagente de Ellman, que é o substrato da enzima acoplada ao traçador. Então a placa foi lida no leitor de ELISA no comprimento de onda de 405 nm no leitor de placa SpectraMax 250 (Molecular Devices) e analisado no programa SoftMax 4.8 (Molecular Devices).

4.3.7 ELISA (Ensaio Imunosorbente Ligado a Enzima)

As concentrações de IL-1 β no exudato (*in vivo*) foram determinadas por ELISA (ensaio imunosorbente ligado a enzima) (Peprotech) de acordo com as especificações do fabricante. No primeiro dia de ensaio a placa (GBioOne) foi recoberta com anticorpo anti-IL-1 β murina purificada por 18 h. Após esse período a placa foi lavada com PBS 0,05% Tween 20, e então, bloqueada por 2 horas com PBS 1% BSA em temperatura ambiente. Ao final, a placa foi lavada 4 vezes, e em seguida as amostras e a curva foram aplicadas na placa e incubadas por 2 h. Ao final desta incubação, a placa foi mais uma vez lavada, e é aplicado o anticorpo de detecção (0,5 µg/mL) e incubado por 2 h. Ao final, a placa foi lavada novamente, e foi aplicado a avidina conjugada a HRP

(horseradish peroxidase) por 30 min e ao final, a placa foi revelada com uso de TMB (tetrametilbenzidina) e a leitura no leitor de ELISA no comprimento de onda 450 nm no leitor de placa SpectraMax 250 (Molecular Devices) e analisada no programa SoftMax Pro 4.8 (Molecular Devices).

4.3.8 Eicosacell

Três grupos experimentais foram criados: o grupo injetado com salina (que atua como controle), o grupo injetado com heme, e o grupo que após 1 hora da injeção de heme, recebe tratamento com inibidores da enzima 5-LO. Duas horas pós a estimulação i.p. com heme, a cavidade peritoneal foi lavada e a suspensão celular foi incubada com EDAC 0.1% por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram feitas com auxílio da citospin (com 100.000 células por lâminas). Após a centrifugação, então, a região onde se encontram as células foi circundada com auxílio de uma caneta hidrofóbica, e lavada 1 vez com BSA 1% em HBSS rapidamente para remoção do EDAC e em seguida, incubada por 30 min a temperatura ambiente com BSA 1% em HBSS. Após esse período, incubou-se com o anticorpo primário anti-LTB₄ e/ou anti-ADRP diluído em BSA 1% em HBSS por aproximadamente 18 h a 4°C em câmara úmida e escura. Em seguida, as lâminas foram lavadas 3 vezes com BSA 1% em HBSS por 10 min e incubadas com anticorpo secundário por 1 h à temperatura ambiente. Para finalizar, lavou-se 3 vezes com BSA 1% em HBSS por 10 min e mais uma vez com HBSS e montou-se, então, as lâminas com meio de montagem e lamínula. Com a lâmina devidamente montada a análise é feita em microscópio de fluorescência (Olympus BX51TF, Tokio, Japão).

4.4 Análise Estatística

Aos dados experimentais foram aplicados testes estatísticos para a determinação da média e erro padrão da média ($\bar{x} \pm EPM$) e da significância entre os grupos experimentais, através do teste ONE WAY ANOVA seguido por BONFERRONI. A significância estatística foi considerada para valores de $P < 0,05$. As figuras mostradas são representativas de 2 ou 3 experimentos, onde utilizou-se de no mínimo 5 animais por grupo experimental para experimentos *in vivo* e de no mínimo 4 amostras para os ensaios *in vitro*.

5.1 Heme induz migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de camundongos

A migração de neutrófilos induzida pela molécula heme (protoporfirina de ferro IX) já foi demonstrada em diversos modelos. Primeiramente em modelos de pleurisia em ratos, e em câmara de Boyden com neutrófilos humanos (Graça-Souza, A. *et al*, 2002). Outro modelo *in vivo* foi demonstrado por Figueiredo e colaboradores (2007), onde o heme é capaz de induzir a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos C3H/HePas.

Com base na curva dose-resposta demonstrada no trabalho de Porto e colaboradores (2007), a dose de heme escolhida para estudar a capacidade e o mecanismo envolvido na migração de neutrófilos induzida pelo mesmo em camundongos C57Bl/6 foi de 50 nmoles por camundongo.

Portanto, 50 nmoles de heme foi injetado na cavidade peritoneal de camundongos e a migração avaliada 4 h após. Assim como descrito na literatura, o heme induziu a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de camundongos (Figura 6). Não foi observado o aumento no número de nenhum outro leucócito. Confirmado este dado, fomos investigar como esse fenômeno ocorre *in vivo*. A abordagem do estudo será através da investigação da participação de células residentes da cavidade peritoneal e de possíveis moléculas inflamatórias que possam estar participando do processo.

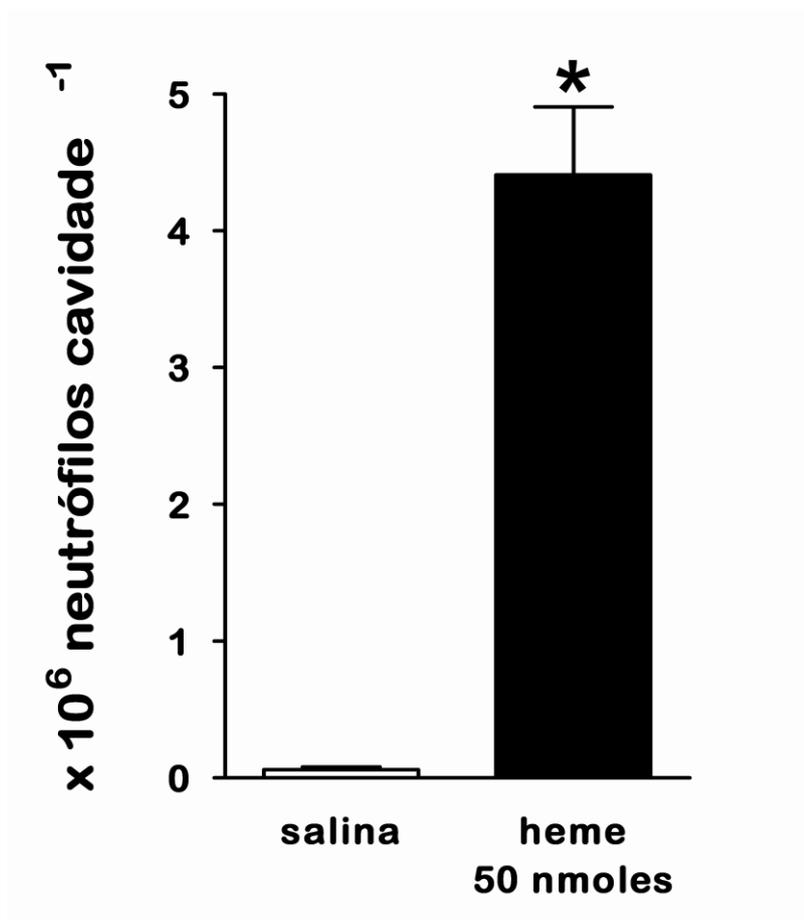


Figura 6. *Migração de neutrófilos induzida por heme para cavidade peritoneal de camundongos.* Heme (50 nmoles) foi injetado na cavidade peritoneal de camundongos SV129 e o recrutamento de neutrófilos avaliado 4 h após. O grupo controle foi injetado com o mesmo volume de salina contendo 0,02% de DMSO. Os dados representam a média \pm EPM; n=5. * $P < 0,05$ comparado ao grupo salina.

5.2 Inibição da migração de neutrófilos induzida por heme em camundongos 5-LO^{-/-}

LTs, produtos do metabolismo do AA pela enzima 5-LO, vêm sendo implicados durante anos nas mais diversas doenças inflamatórias. Em 1994, Henderson já descrevia a participação de leucotrienos em doenças como asma, artrite reumatóide, rinite alérgica, glomerulonefrite, fibrose cística. Mais recentemente foi sugerido que eles desenvolvem importantes papéis na aterosclerose, fibrose pulmonar e câncer (Flamand, N. *et al*, 2007).

Com isso fomos examinar se a injeção de heme na cavidade peritoneal de camundongos 5-LO^{-/-} apresentaria alguma diferença na indução de migração de neutrófilos. Como pode ser visto na figura 7, a migração de neutrófilos induzida por heme foi menor nos animais deficientes na enzima 5-LO, sugerindo a participação de um de seus produtos nesse processo.

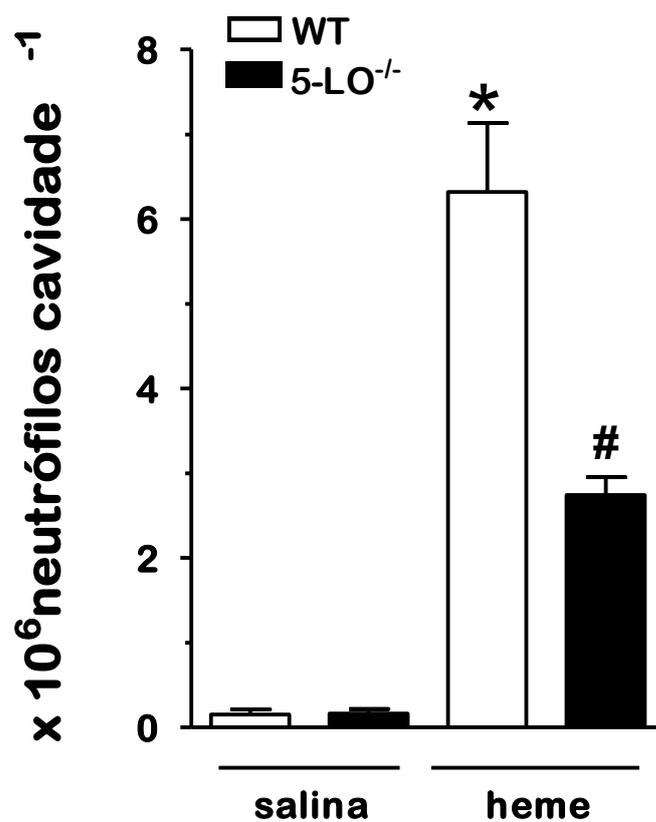


Figura 7. Redução na migração de neutrófilos induzida por heme em camundongos deficientes na enzima 5-LO^{-/-}. Camundongos 5-LO^{-/-} e SV129 foram injetados i.p. com salina contendo 0,02% de DMSO ou heme (50 nmoles). A migração de neutrófilos foi avaliada 4 h depois. Os dados representam a média \pm EPM; n=5. * $P < 0,05$ comparado ao grupo de animais SV129 tratados com salina (WT); # $P < 0,05$ comparado ao grupo de animais SV129 tratados com heme.

5.3 Inibição farmacológica da 5-LO inibe a migração de neutrófilos induzida por heme

Com objetivo de confirmar os dados genéticos, foi realizada uma abordagem farmacológica, onde a enzima 5-LO foi inibida através do uso de zileuton (3 mg kg⁻¹) (Summers, J.B. *et al.*, 1987 a; Summers, J.B. *et al.*, 1987 b; Carter, G.W. *et al.*, 1990) e AA861 (3mg kg⁻¹). (Yamamura, H. *et al.*, 1988). Assim como os animais deficientes na 5-LO, os animais (C57Bl/6) que foram pré-tratados zileuton (figura 8A) ou AA861 (figura 8B) também apresentaram inibição do recrutamento de neutrófilos induzido pelo desafio com heme.

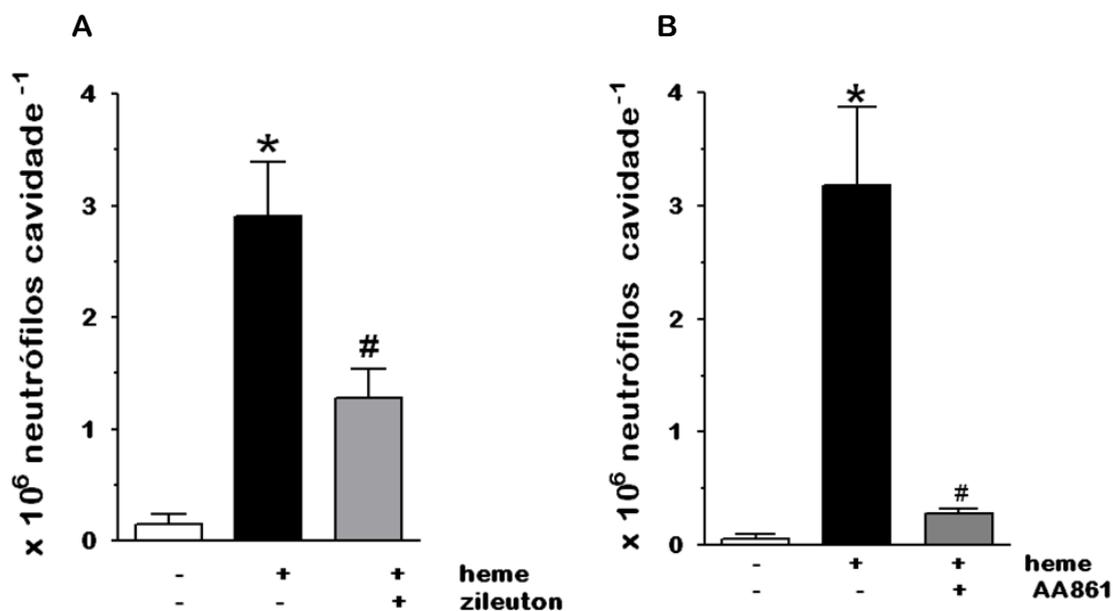


Figura 8. Redução no recrutamento de neutrófilos induzida por heme em camundongos tratados com inibidores farmacológicos da 5-LO. Camundongos C57Bl/6 foram tratados com inibidores da enzima 5-LO, zileuton (3 mg kg⁻¹; i.v. 20 min- Painel A) ou AA861 (3 mg kg⁻¹; i.v. 20 min – Painel B) antes do desafio com heme (50 nmoles, i.p.) ou salina. Em ambos ensaios, a migração foi avaliada 4 h após a injeção de heme. Os dados representam a média ± EPM; n=5. *P<0,05 comparado ao grupo salina; #P<0,05 comparado ao grupo heme.

5.4 Recrutamento de neutrófilos induzido por heme é dependente das ações do LTB₄

O LTB₄ é um conhecido fator quimiotático para neutrófilos (Ford-Hutchinson A.W. *et al.*, 1980). Interessantemente, foi demonstrado que diversos estímulos como TNF- α , IL-1 β , IL-18, MIP-1 α (“macrophage inflammatory protein 1-alpha”) e MIP-2 (Canetti, C. *et al.*, 2001; Canetti, C. *et al.*, 2003; Ramos, C.D. *et al.*, 2005; Ramos, C.D. *et al.*, 2006; Oliveira, S.H.P. *et al.*, 2007; Verri, W.A.Jr. *et al.*, 2007) induzem a migração de neutrófilos *in vivo* por um mecanismo dependente da liberação de LTB₄. Com o objetivo de avaliar se o LTB₄ também participa da migração neutrófilos induzida pelo heme para cavidade peritoneal, foram utilizados 2 antagonistas do receptor de alta afinidade do LTB₄, o BLT1. Com essa finalidade, então, os animais foram pré-tratados com CP105696 (3 mg kg⁻¹; i.v.) ou com LY292476 (2 mg kg⁻¹; i.v.) 30 min antes da injeção de 50 nmoles de heme. Como pode ser observado na figura 9, o uso de ambos antagonistas do receptor BLT1 inibiu a migração de neutrófilos induzida por heme.

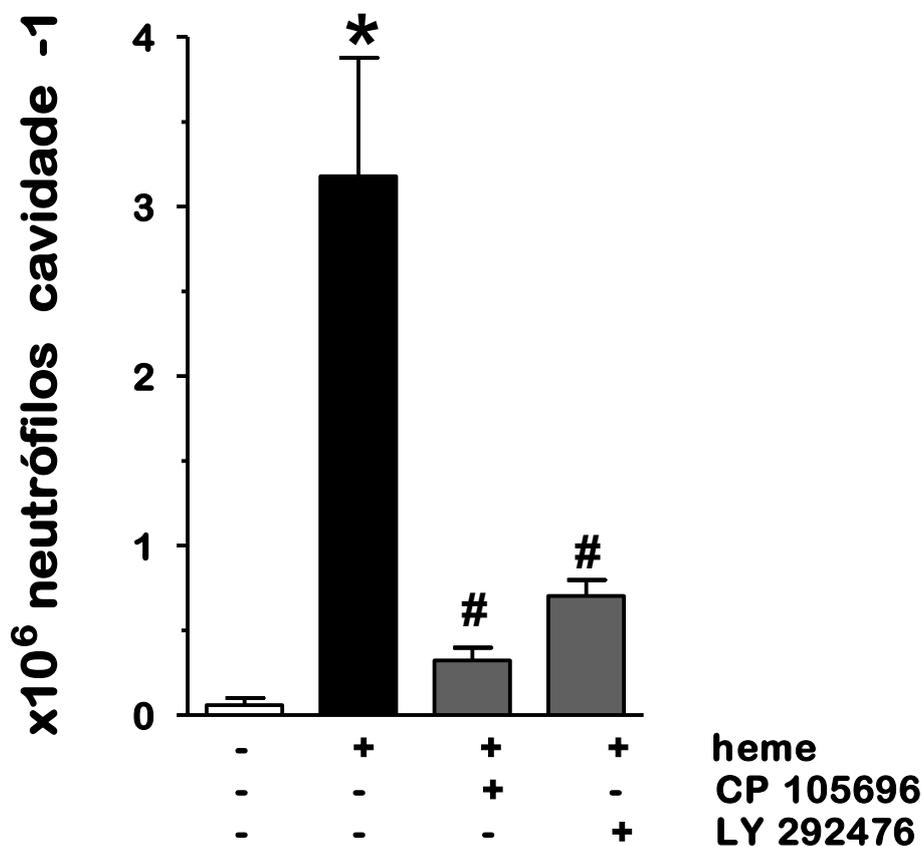


Figura 9. *Inibição do recrutamento de neutrófilos induzida por heme em camundongos tratados com antagonistas de LTB₄.* Camundongos C57Bl/6 foram tratados com antagonistas de LTB₄, CP 105696 (3 mg kg⁻¹; i.v. 30 min.) e LY292476 (2 mg kg⁻¹; i.v. 30 min) antes do desafio com heme (50 nmoles, i.p.) ou salina. Em ambos ensaios, migração foi avaliada 4 h após a injeção de heme. Os dados representam a média ± EPM; n=5. **P*<0,05 comparado ao grupo salina; #*P*<0,05 comparado ao grupo heme.

5.5 Migração de neutrófilos induzida por heme não requer participação de mastócitos

Células de origem mielóide, particularmente neutrófilos, eosinófilos, monócitos/macrófagos e mastócitos predominantemente expressam a 5-LO, o que os capacita como produtores de LTs (Cuzzocrea, S. *et al*, 2003).

Sabendo, portanto, que a migração de neutrófilos induzida por heme depende de produtos da 5-LO, mais especificamente, o LTB₄, supomos que células residentes da cavidade peritoneal estejam sendo estimuladas pelo heme e liberando LTB₄. Partimos para uma avaliação de células residentes da cavidade peritoneal, começando pelos mastócitos. A abordagem escolhida para avaliar a participação de mastócitos peritonias na migração de neutrófilos induzida por heme foi a depleção destes, sendo esta feita através de dois modelos: uso crônico do composto 48/80 por 4 dias (0,6 mg kg⁻¹, 2 vezes ao dia por 3 dias e no 4^o, dia 2 doses de 1,2 mg kg⁻¹) e pela injeção i.p. de água (1 mL) 3 dias antes do ensaio com heme.

Como pode ser visto na figura 10 (A e C), a depleção de mastócitos foi eficaz nos dois modelos. A migração de neutrófilos induzida por heme não apresentou diferença entre os grupos que foram depletados dos que não foram (Figura 10 B e D), sugerindo, então que mastócitos não participam desse processo.

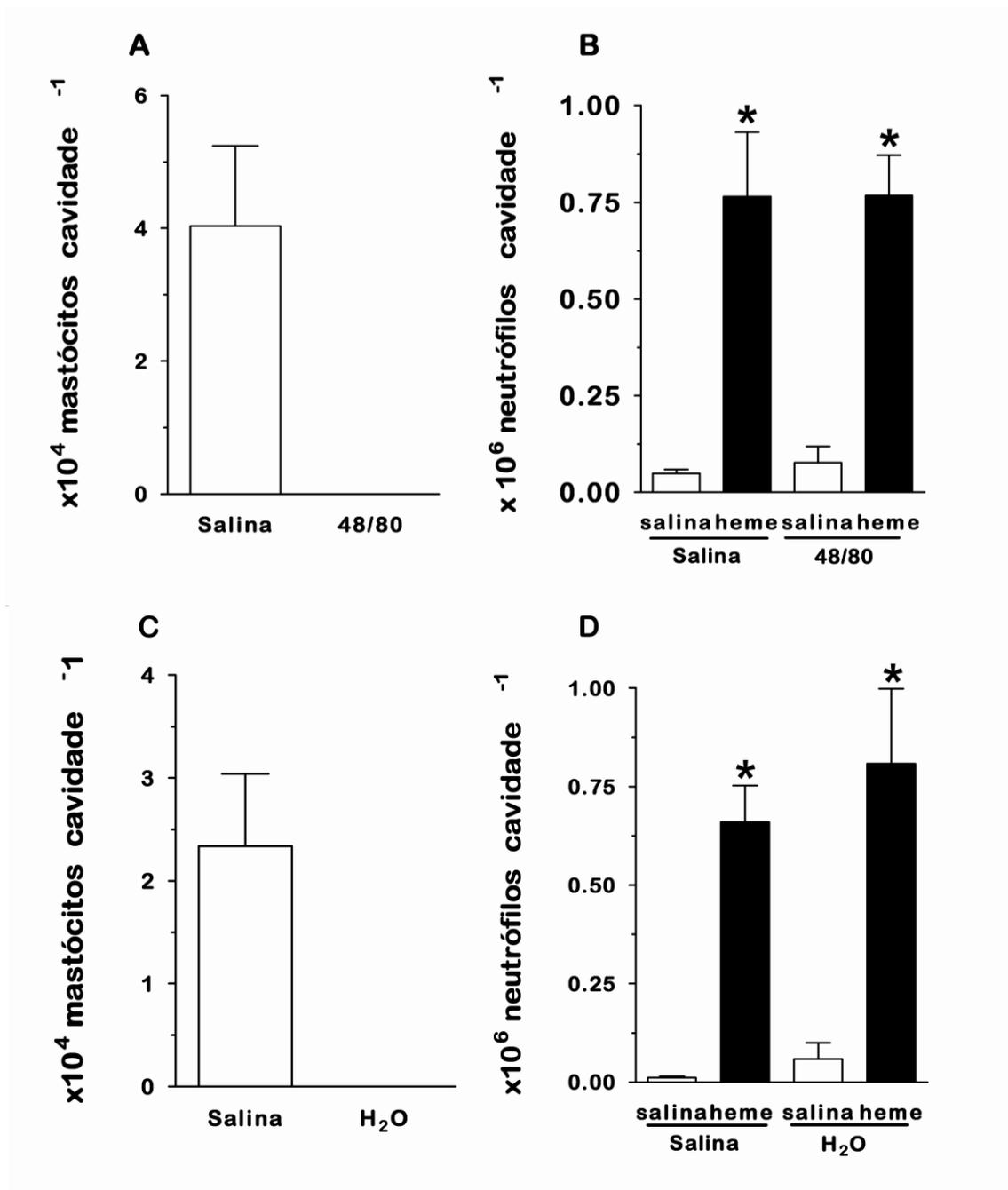


Figura 10. Migração de neutrófilos induzida por heme não envolve participação de mastócitos. (Painéis A e B) Camundongos C57Bl/6 foram tratados com o composto 48/80 ($0,6 \text{ mg kg}^{-1}$, 2 vezes ao dia por 3 dias e no 4º, dia 2 doses de $1,2 \text{ mg kg}^{-1}$) e no 5º dia foi realizada a injeção intraperitoneal de heme (50 nmoles), ou salina. (Painéis C e D) Camundongos C57Bl/6 foram injetados com água (1 mL) e após 3 dias realizada a

injeção intraperitoneal de heme (50 nmoles) ou salina. Em ambos os casos a migração foi avaliada após 4 horas. Os dados representam a média \pm EPM; n=5.

5.6 Migração de neutrófilos induzida por heme envolve participação de macrófagos residentes

Como visto, nossos dados sugerem que mastócitos não participam da migração de neutrófilos induzida por heme, então, a célula que passa a ser investigada a seguir é o macrófago. A primeira abordagem utilizada para avaliar se os macrófagos peritoniais estão envolvidos na migração de neutrófilos induzida por heme é a modulação do número de macrófagos da cavidade peritoneal dos camundongos por meio do pré-tratamento com tioglicolato (3%, 1 mL, intraperitonealmente). Após 3 dias foi feita a injeção intraperitoneal de 50 nmoles de heme e 4 h depois a migração avaliada.

Na figura 11A fica claro que o pré-tratamento com tioglicolato aumentou o número de macrófagos peritoniais em torno de 7 vezes. E esse aumento no número de macrófagos se refletiu no recrutamento de neutrófilos induzido por heme no grupo pré-tratado com tioglicolato, uma vez que esse grupo apresentou um recrutamento de neutrófilos maior que o grupo controle injetado com salina (figura 11B).

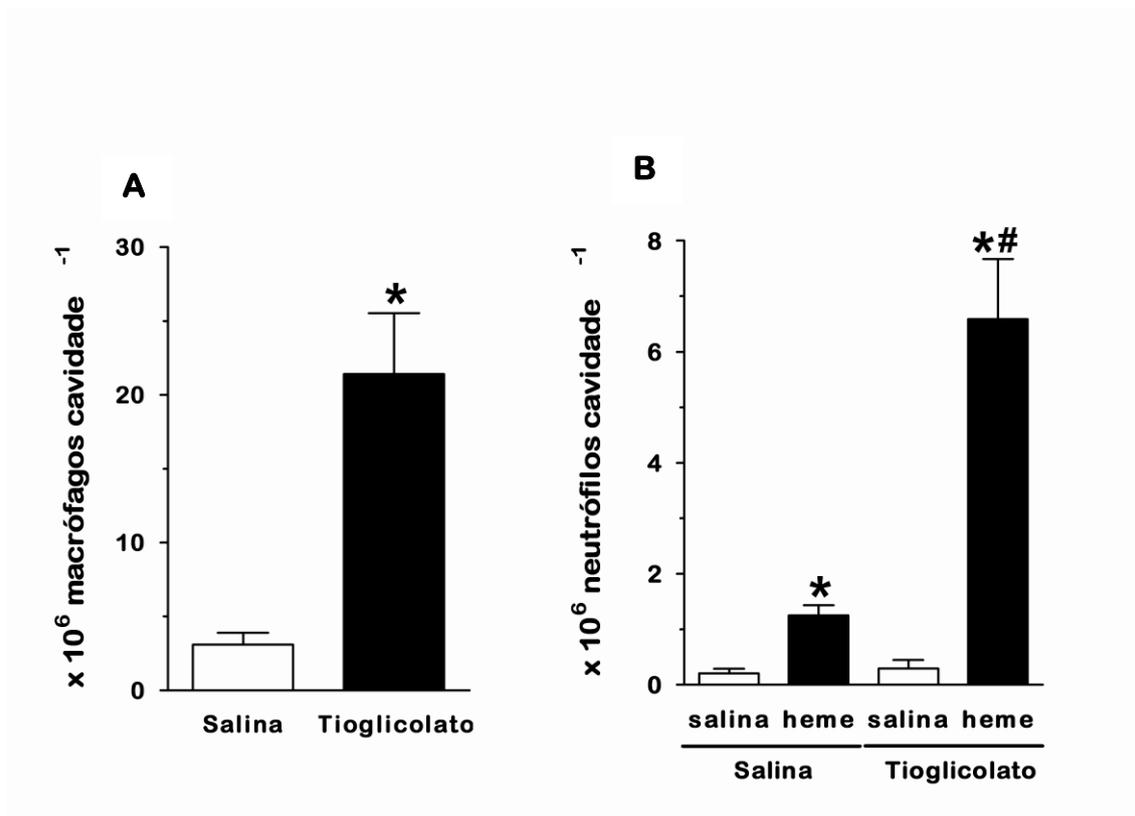


Figura 11. Migração de neutrófilos induzida por heme em animais pré- tratados com tioglicolato. Camundongos C57Bl/6 foram injetados com 1 mL de tioglicolato 3% i.p. ou com o mesmo volume de salina. A: Três dias após a administração de 1mL de salina ou tioglicolato 3 %, os animais foram sacrificados e a cavidade peritoneal lavada, sendo o número de macrófagos determinado. B: após 3 dias, 50 nmoles de heme foram injetados i.p., sendo o controle com salina contendo 0,02% de DMSO. Após 4h o recrutamento de neutrófilos foi avaliado. Os dados representam a média \pm EPM; n=5. * $P < 0,05$ comparado ao grupo salina; # $P < 0,05$ comparado ao grupo salina/heme.

5.7 Atividade quimiotática de sobrenadantes obtidos de macrófagos estimulados com heme

Uma segunda abordagem escolhida para avaliar a participação de macrófagos na migração de neutrófilos induzida por heme foi a incubação de macrófagos peritoneais obtidos de camundongos com heme por 30 min. Após esse período, o poço da placa onde esses macrófagos se encontravam foi lavado, e então adicionado meio fresco e incubado por 6 h. Após esse período, os sobrenadantes foram recolhidos e injetados em outros camundongos C57Bl/6. E a migração foi avaliada 4 h após a injeção dos sobrenadantes.

A figura 12 nos mostra que no sobrenadante de macrófagos estimulados com heme havia a presença de algum fator quimiotático, uma vez que a administração dos sobrenadantes dos macrófagos estimulados com heme nas doses de 10 e 30 nmoles induziu recrutamento de neutrófilos.

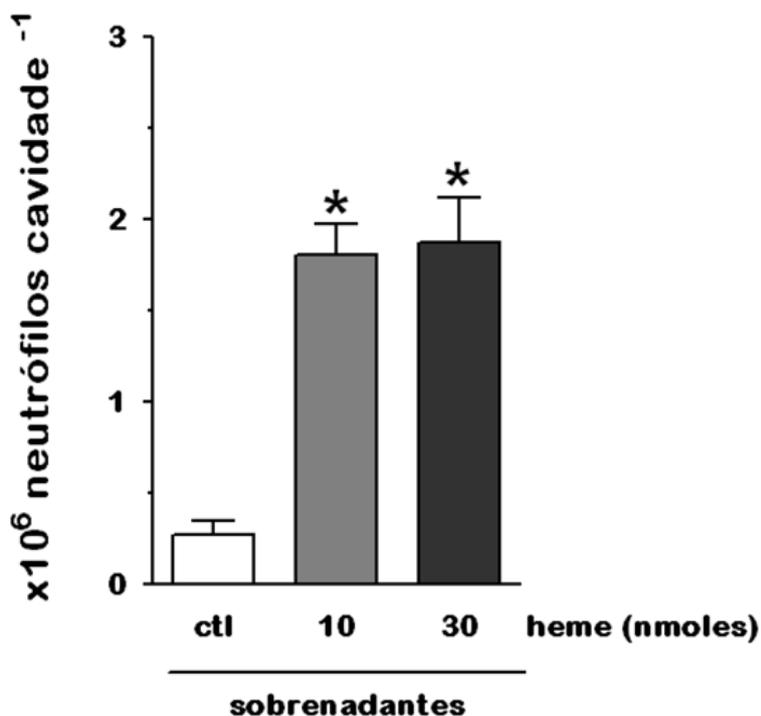


Figura 12. *Sobrenadante de macrófagos estimulados com heme induz migração de neutrófilos.* Macrófagos peritoneais obtidos de camundongos C57Bl/6 foram plaqueados e estimulados com heme por 30 min. e após esse período o meio que continha heme foi removido, e após a lavagem do poço, foi adicionado meio fresco e incubado por 6 horas. Esse sobrenadante, após as 6 h, foi recolhido, filtrado (filtro de 22 μ m) e injetado em outros camundongos C57Bl/6. A migração foi avaliada após 4 h. Os dados representam a média \pm EPM; n=5. * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle.

5.8 Liberação de IL-1 β induzida por heme

Figueiredo e colaboradores (2007) já demonstraram que o heme é capaz de induzir a liberação de citocinas como KC e TNF- α *in vitro* por macrófagos murinos. Porém a liberação de IL-1 β , cuja liberação induz a migração de neutrófilos, não havia ainda sido avaliada. Com objetivo de verificar se o heme é capaz de induzir a liberação de IL-1 β *in vivo*, foi injetado 50 nmoles de heme i.p. e após duas horas a cavidade peritoneal foi lavada e o exsudato obtido foi recolhido para posterior dosagem de IL-1 β através de ELISA.

Como pode ser visto na figura 13, o heme foi capaz de induzir a liberação de IL-1 β *in vivo*.

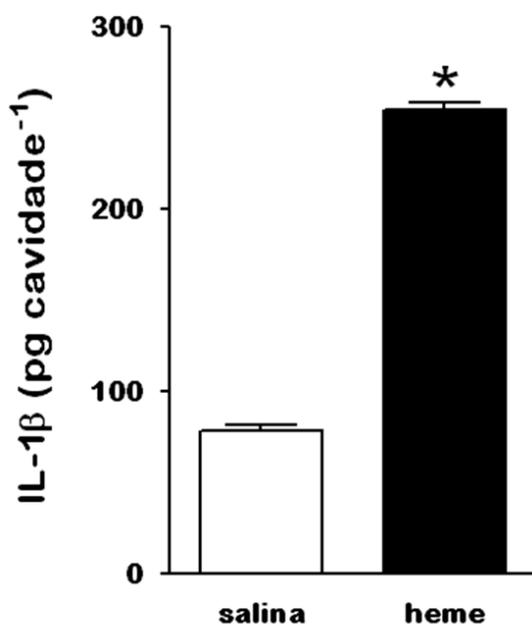


Figura 13. Liberação de IL-1 β *in vivo* induzida por heme. Heme (50 nmoles) foi administrado i.p. e após 2 h a cavidade peritoneal desses animais foi lavada. O exsudato foi centrifugado e as amostras congeladas a -20°C . A dosagem foi feita como descrita em métodos. Os dados representam a média \pm EPM; $n=5$. * $P<0,05$.

5.9 Liberação de LTB₄ induzida por heme in vivo e in vitro

Em seguida fomos avaliar se o heme é capaz de estimular a produção de LTB₄. Primeiramente, avaliamos se a administração de heme é capaz de gerar a produção de LTB₄ *in vivo*. Como pode ser observado na figura 14A, a injeção de 50 nmoles de heme induziu liberação de LTB₄ avaliada após 2 h.

Fomos avaliar ainda se macrófagos peritoneais plaqueados também seriam capazes de produzir de LTB₄ quando estimulados *in vitro* com heme. Assim, esses macrófagos foram estimulados por 30 min com heme e incubado por 6 h. Como é mostrado na figura 14B, pode-se observar uma produção dose-dependente de LTB₄ por macrófagos estimulados com heme *in vitro*.

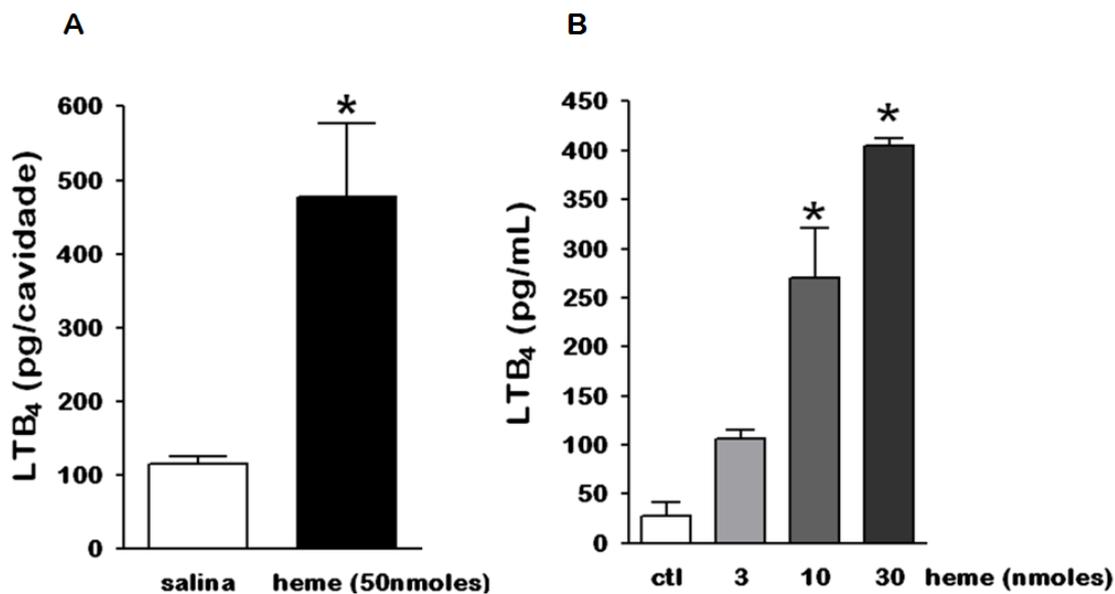


Figura 14. Liberação de LTB₄ induzida por heme *in vivo* e *in vitro*. A: Camundongos C57Bl/6 foram injetados i.p. com 50 nmoles de heme e após 2 h, a cavidade peritoneal foi lavada e a dosagem de LTB₄ realizada através de EIA. B: Macrófagos peritoneais obtidos de camundongos C57Bl/6 foram plaqueados (1×10^6 células poço⁻¹) e estimulados com heme por 30 min e após esse período o meio que continha heme foi removido, e após lavagem do poço, foi adicionado meio fresco e incubado por 6 h. Ao fim das 6 h, o sobrenadante foi recolhido e foi dosado LTB₄ através de EIA. * $P < 0,05$ comparado ao grupo salina; # $P < 0,05$ comparado ao grupo salina/heme.

5.10 Modulação da liberação de LTB₄ induzida por heme in vivo em animais pré-tratados com tioglicolato

Como foi demonstrado anteriormente, o pré-tratamento dos camundongos com tioglicolato, que promove em aumento do número de macrófagos na cavidade peritoneal, resulta em maior infiltrado de neutrófilos quando esses animais recebem injeção i.p. de heme. E ainda, que a injeção de heme *in vivo*, assim como a estimulação de macrófagos peritoneais *in vitro* com heme levou a uma liberação de LTB₄. Com isso fomos avaliar se a modulação do número de macrófagos na cavidade peritoneal, com uso de tioglicolato, seguida da injeção i.p. de heme seria capaz de levar a um aumento na produção de LTB₄ *in vivo*.

Como pode ser observado na figura 15A, o tratamento dos animais com tioglicolato promoveu um aumento no número de macrófagos peritoneais. E como mostrado na figura 15B, o grupo que recebeu o pré-tratamento com tioglicolato, quando desafiados com 50 nmoles de heme i.p., apresentou uma maior liberação de LTB₄ quando comparado ao grupo não tratado com tioglicolato. Sugerindo mais uma vez a participação do macrófago na migração de neutrófilo induzida por heme

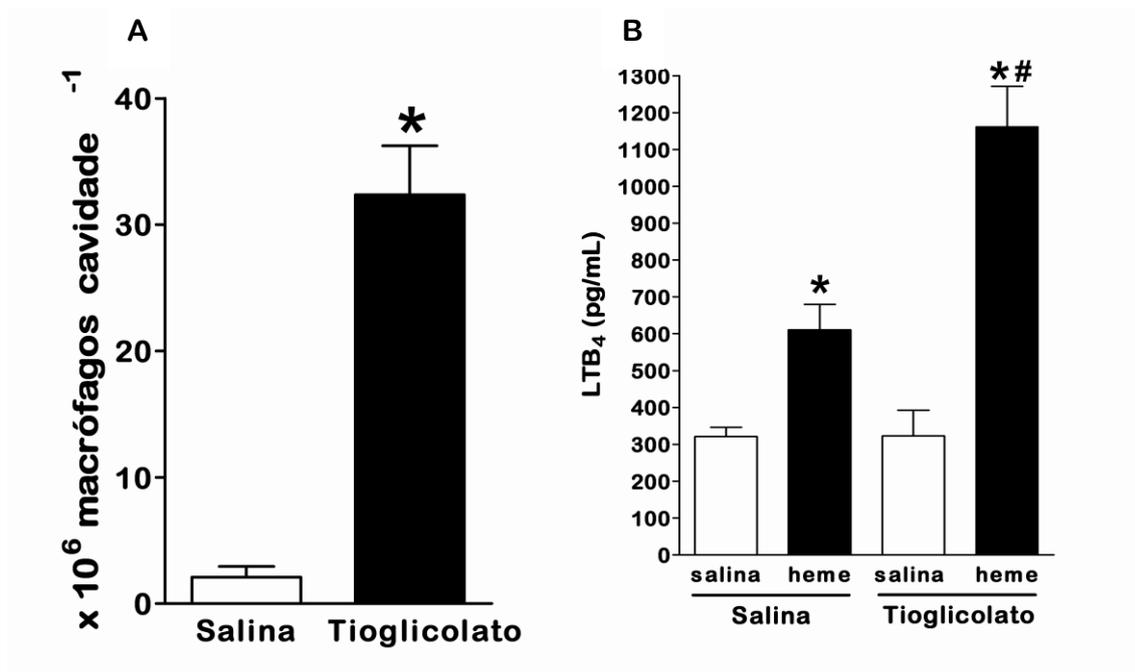


Figura 15. Maior liberação de LTB₄ induzida por heme *in vivo*, após tratamento com tioglicolato. Painel A: Camundongos C57Bl/6 foram pré-tratados com tioglicolato e após 72 h foram sacrificados e o número de macrófagos determinado. B: Camundongos C57BL/6 foram pré-tratados com tioglicolato e após 72 horas foi administrado heme, sendo a cavidade peritoneal lavada após 4 h.e a dosagem de LTB₄ realizada por EIA.: * $P < 0,05$ comparado ao grupo salina; # $P < 0,05$ comparado ao grupo salina/heme.

5.11 Determinação *in situ* da produção de LTB₄

Portanto, até o momento, os dados sugerem que a migração de neutrófilos induzida por heme depende da liberação de LTB₄ e de sua ligação ao seu receptor BLT1. A liberação de LTB₄ por macrófagos *in vitro* induzida por heme, assim como a modulação da população dessas células pela administração de Tioglicolato, sugere que essas células são a fonte do LTB₄ após a injeção de heme. Para verificar se realmente são os macrófagos os produtores de LTB₄ *in vivo* após a estimulação com heme, foi realizada uma técnica conhecida como EICOSACELL, onde é feita uma imuno marcação de eicosanóides *in situ* (Bandeira-Melo, submetido 2009).

Nessa técnica, as células foram marcadas com anticorpos anti-LTB₄. Como existem três sítios para produção de eicosanóides, a membrana perinuclear, corpúsculos lipídicos e membrana de fagossomos, também foi realizada uma marcação com anticorpo anti-ADRP, uma molécula estrutural presente em corpúsculos lipídicos (descrito como marcador de corpúsculo lipídico por Brasaemle, D.L. *et al.*, 1997; Heid, H.W. *et al.*, 1998), a fim de verificar se a produção do LTB₄ estava ocorrendo dentro dessas organelas. Como controle interno do ensaio, um grupo experimental é tratado após 1 h da injeção de heme com inibidores da 5-LO. A especificidade da imuno marcação do LTB₄ é obtida através de 2 formas: (i) a incubação 1 h antes de usar o EDAC com inibidores da 5-LO para evitar a síntese de LTB₄ e (ii) análise da marcação de LTB₄ nos grupos não estimulados.

Como pode ser observado na figura 16, a produção de LTB₄ ocorre em macrófagos, e após a sobreposição das marcações para LTB₄ e para corpúsculos lipídicos (ADRP), pode ser visto uma colocalização das marcações, mostrando que a produção de LTB₄ induzida por heme ocorre em corpúsculo lipídicos presentes em macrófagos.

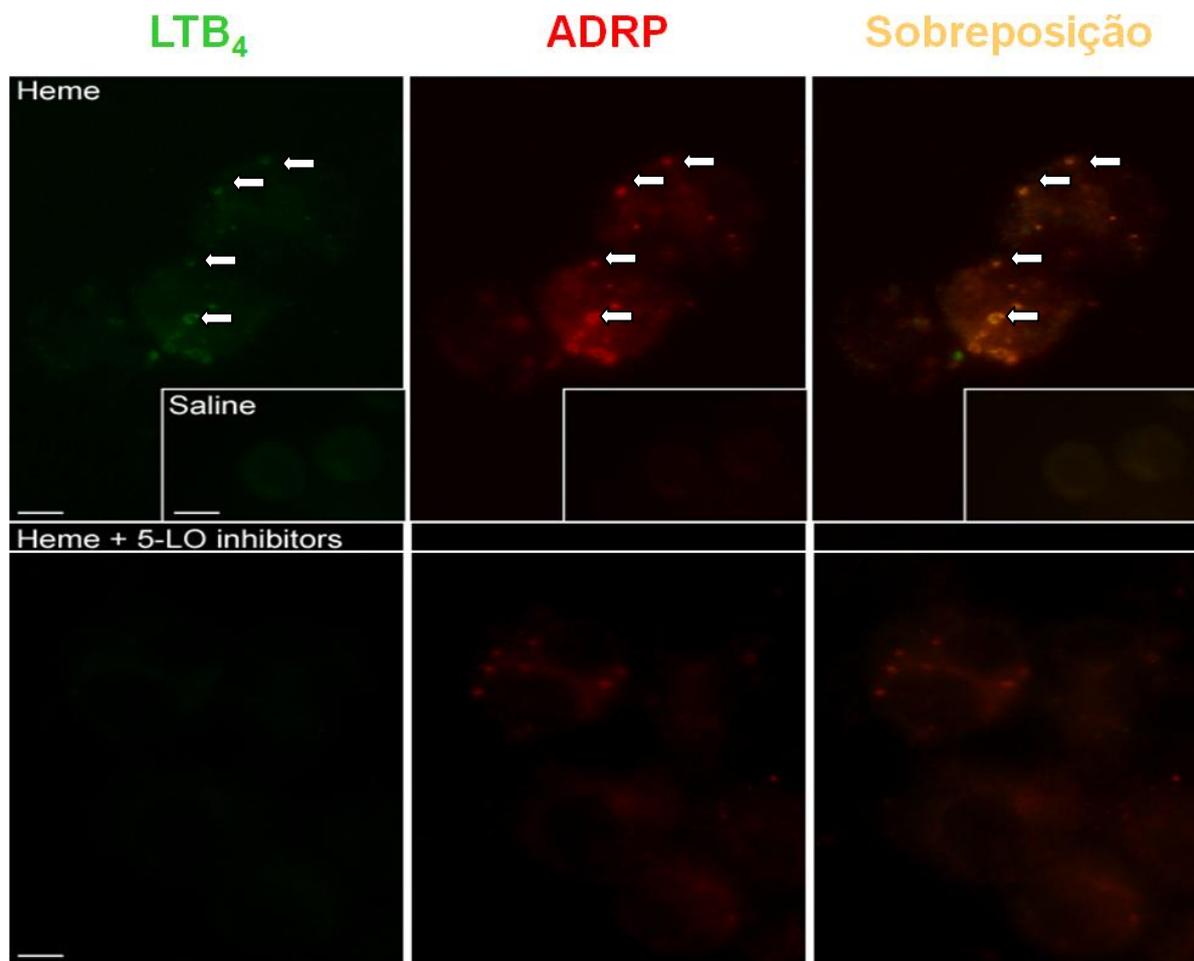


Figura 16. Produção de LTB_4 por macrófagos dentro de corpúsculos lipídicos. Camundongos C57Bl/6 foram injetados com heme e após 2 h a cavidade peritoneal lavada. Das células recuperadas, foram feitas marcações *in situ* para LTB_4 e corpúsculo lipídico (ADRP). Como controle interno, um grupo experimental foi tratado com inibidores da 5-LO (zileuton (3 mg kg^{-1} ; i.v. 20 min e AA861 (3 mg kg^{-1} ; i.v. 20 min)). Os controles irrelevantes foram realizados como controle das marcações. Fotos representativas de 2-3 experimentos independentes.

O papel pró inflamatório do heme já foi estudado por diversos grupos. Um desses grupos mostrou que o heme é capaz de induzir a migração *in vivo* no modelo de pleurisia em ratos e *in vitro* no modelo de camara de Boyden com neutrófilos humanos (Graça-Souza, A. *et al*, 2002). Porto, B.N. (2007) e colaboradores também mostrou a migração de neutrófilos induzida por heme *in vivo*, porém, desta vez no modelo de injeção intraperitoneal em camundongos. Com a dose obtida no trabalho de Porto, B.N (2007), nós confirmamos que o heme induz a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de camundongos (figura 6). E então, passamos a investigar se produtos da enzima 5-LO estariam participando desse processo.

Sabe-se que LTs estão envolvidos em uma série de doenças inflamatórias, entre elas asma, psoríase, artrite reumatóide (Henderson, W.R., 1994). Conhecendo o potencial pró inflamatório dos LTs, nós fomos avaliar se eles estavam envolvidos na migração de neutrófilos induzida por heme. Para essa avaliação nossa primeira abordagem foi o uso de camundongos deficientes na enzima 5-LO. Como pôde ser observado na figura 7, a migração de neutrófilos induzida por heme foi menor nos animais deficientes na enzima 5-LO. Para confirmar esse dado genético, foram utilizados dois inibidores da enzima 5-LO, o zileuton e o AA861, que confirmaram que a ausência da 5-LO, ou sua inibição, resultam em um menor recrutamento de neutrófilos induzido por heme (figura 8). O mesmo foi observado por Barbara Porto em modelo *in vitro*. Cuzzocrea e colaboradores já haviam mostrado em 2003, com um modelo de indução da migração por carragenina, que animais deficientes na 5-LO apresentavam um menor recrutamento de neutrófilos.

Dentre os produtos da cascata da 5-LO, o LTB₄ é um conhecido fator quimiotático para neutrófilos (Ford-Hutchinson, A.W. *et al.*, 1980; Martin, T.R. *et al.*,

1989; Kubes, P. 1993). Por esse motivo o escolhemos para avaliar se estaria envolvido na migração de neutrófilos induzida por heme. Para isso usamos dois antagonistas do receptor BLT1, receptor de alta afinidade do LTB₄, de fórmulas não correlacionadas. Como foi mostrado na figura 9, uso de ambos antagonistas inibiu a migração de neutrófilos induzida por heme, demonstrando a participação desse mediador lipídico no processo. Esse dado está de acordo com dados não publicados da tese de doutorado de Bárbara Porto de migração de neutrófilos *in vitro*, onde também foram usados antagonistas do receptor BLT1, e os índices quimiotáticos também se apresentaram diminuídos.

No atual momento do estudo, o quadro encontrado é que a injeção de heme induz um recrutamento de neutrófilos, e esse recrutamento depende de produtos da cascata da enzima 5-LO, mais especificamente, o LTB₄ via seu receptor de alta afinidade, BLT1. Esse quadro nos levou à hipótese de que a injeção de heme *in vivo* estaria ativando células da cavidade peritoneal, e essa ativação estivesse atuando no recrutamento de neutrófilos, através da liberação de LTB₄, por exemplo. Embasando essa hipótese existem dados que demonstram que outros quimiotáticos para neutrófilos atuam *in vivo* através da estimulação de células residentes a liberar fatores que vão influir nessa migração, como canatoxina, IFN- γ e IL-1 β (Ribeiro, R.A. *et al.*, 1990; Barja-Fidalgo, C. *et al.*, 1992, Oliveira, S.H.P. *et al.*, 2007).

Para explorar essa hipótese primeiramente fomos estudar as células da cavidade peritoneal, a começar pelos mastócitos. A abordagem utilizada foi a depleção de mastócitos da cavidade peritoneal. Para isso utilizamos dois modelos, o uso crônico de 48/80 e a injeção de 1 mL de água 3 dias antes do desafio com heme. Para nossa surpresa a ausência de mastócitos na cavidade peritoneal não alterou a migração de

neutrófilos induzida por heme, sugerindo que essas células não estão envolvidas (figura 10). Também realizamos um ensaio onde mastócitos derivados de medula óssea foram incubados com heme e a degranulação foi avaliada, e nesse ensaio o heme não foi capaz de induzir a degranulação de mastócitos (dado não mostrado).

Como os mastócitos não pareciam estar envolvidos no mecanismo de migração de neutrófilos induzida por heme, nós viramos nossos olhos para o estudo dos macrófagos. A primeira abordagem foi a modulação do número de macrófagos da cavidade peritoneal dos camundongos com o uso de Tioglicolato 3%. Na figura 11, é possível ver que o tioglicolato foi eficaz em aumentar o número de macrófagos na cavidade peritoneal, e esse aumento se refletiu na migração de neutrófilos induzida por heme, uma vez que o grupo pré-tratado com tioglicolato apresentou um recrutamento de neutrófilos maior que o grupo não tratado.

Outra abordagem usada para verificar a participação de macrófagos foi a estimulação *in vitro* de macrófagos peritoneais com heme, e o sobrenadante obtido injetado intraperitonealmente em outros camundongos para avaliar a migração. Na figura 12, então, é mostrado que a injeção do sobrenadante de macrófagos estimulados com heme apresentava atividade quimiotática para neutrófilos, uma vez que esse sobrenadante foi capaz de induzir recrutamento de neutrófilos.

Figueiredo e colaboradores (2007) mostraram que heme era capaz de liberar KC e TNF- α por macrófagos murinos *in vitro*. Porém, eles viram que o heme não induziu a liberação de TNF- α *in vivo*. A IL-1 β é uma potente citocina pró-inflamatória que inicia e amplifica uma grande variedade de efeitos associados a imunidade inata e defesa contra invasão microbiana e injúria tecidual. Produção e liberação de IL-1 β é estimulado tanto por PAMPs, como por DAMPs (Eder, C 2009). Sabendo disso, fomos

avaliar se o heme era capaz de induzir a liberação de IL-1 β . No item 5.8 pode ser visto que o heme induz a liberação de IL-1 β *in vivo*.

Oliveira, SHP e colaboradores (2007) já demonstraram que a migração de neutrófilos induzida por IL-1 β depende da liberação de LTB₄ e TNF- α , além da liberação de mais IL-1 α . Porém, Figueiredo (2007) demonstrou que o heme não é capaz de induzir a liberação de TNF- α *in vivo*. Sabendo disso, e unido aos resultados do uso de antagonistas do BLT1, passamos a dosagem *in vivo* e *in vitro* de LTB₄. Na figura 14 pode se ver que o heme é capaz de induzir a liberação de LTB₄ *in vivo* e *in vitro* por macrófagos peritoniais. Assim como foi demonstrado que a modulação do número de macrófagos peritoneais com o pré-tratamento com tioglicolato resulta em maior produção de LTB₄ quando desafiado com heme comparado ao grupo não pré-tratado com tioglicolato (figura 15). Esses dados mais uma vez sugerem a participação de macrófagos no processo de migração de neutrófilos induzida por heme.

Em conjunto, os dados sugerem que a migração de neutrófilos induzida por heme requer a participação de LTB₄. Resta-nos agora identificar o sítio onde está sendo produzido esse LTB₄. A dosagem de LTB₄ do sobrenadante de macrófagos peritoniais estimulados com heme *in vitro* nos sugere que sejam eles as células produtoras. Para avaliar se realmente são os macrófagos as células produtoras de LTB₄, e onde estaria ocorrendo essa produção, nós utilizamos uma técnica chamada EicosaCell que faz uma imunolocalização de eicosanóides *in situ*. Nós mostramos, então, na figura 16, que a produção de LTB₄ ocorre em macrófagos, provavelmente em corpúsculos lipídicos.

Calcula-se que aproximadamente 7% da população mundial sofra de transtornos relacionados às hemoglobinas, representados, na sua maioria, pelas talassemias e pela anemia falciforme. Interessantemente, já foi descrito que pacientes com anemia

falciforme apresentam níveis elevados de LTB_4 no plasma no estado sem crise, e níveis maiores em estados de crise onde os principais sintomas são vaso-oclusão e dores no peito (Setty, B.N.Y. & Stuart, M.J., 2002). Assim como são encontrados níveis elevados de LTE_4 , uma análise usada para avaliar a produção de cisteinil-LT *in vivo*, na urina de pacientes infante com anemia falciforme em estados sem crise, e aumentados em episódios de dor (Field, J.J. *et al.*, 2009). Foi demonstrado, ainda, por Patel e colaboradores, em 2009, que células mononucleares do sangue de pacientes com anemia falciforme apresentam expressão de RNA mensageiro de 5-LO e FLAP, em estados sem crise. Esses dados sugerem a participação de produtos da 5-LO na patologia associada a anemia falciforme, o mesmo observado em nossos ensaios com heme.

Em conclusão, nossos dados sugerem que o recrutamento de neutrófilos induzido por heme *in vivo* depende da produção e liberação de LTB_4 , e essa produção acontece em corpúsculos lipídicos nos macrófagos peritoneais, como sugere a ilustração da figura 17.

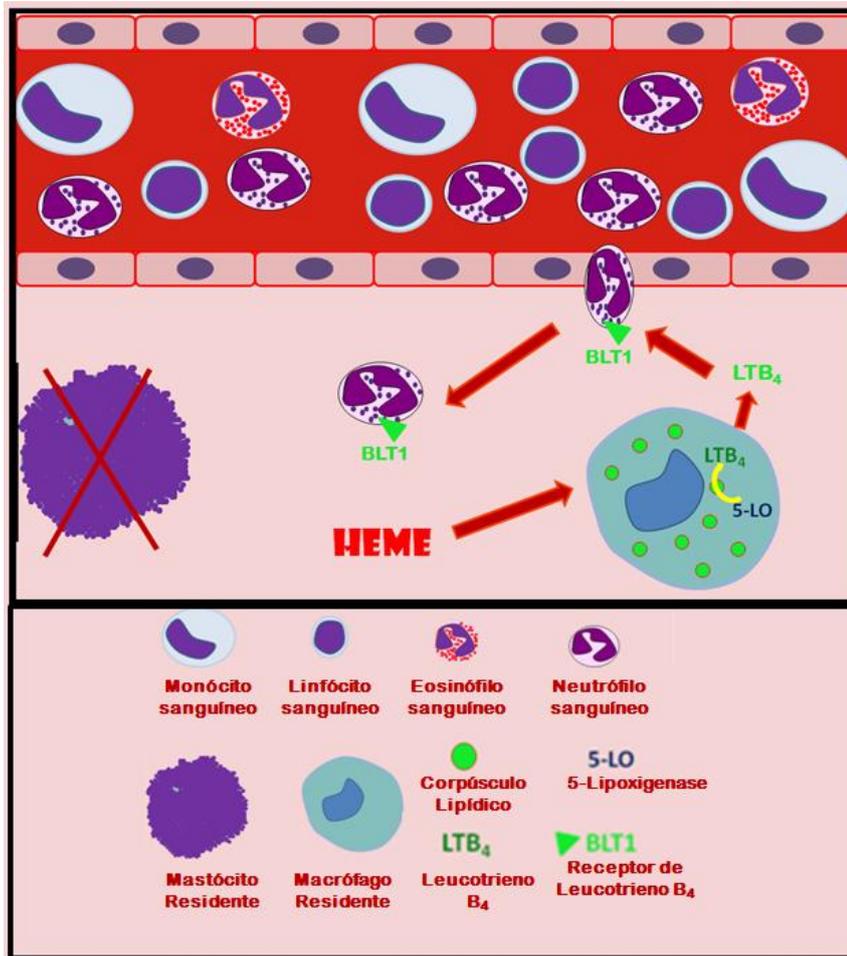


Figura 17. Mecanismo proposto da ação da migração de neutrófilos induzida por heme in vivo. A injeção i.p. de heme ativa macrófagos, mas não mastócitos. Ao ativar macrófagos, o heme induz a produção de LTB₄, que parece acontecer em corpúsculos lipídicos. Esse LTB₄ é então liberado e promove a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal.

ABRAHAM, N.G.; FRIEDLAND, M.L. & LEVERE, R.D. Heme metabolism in hepatic and erythroid cells. **Progress in Hematology** 13: 75–130, 1983.

ARRUDA, M.A.; ROSSI, A.G.; FREITAS, M.S.; BARJA-FIDALGO, C. & GRAÇA-SOUZA, A.V. Heme inhibits human neutrophil apoptosis: involvement of phosphoinositide 3-Kinase, MAPK, and NF- κ B. **Journal of Immunology** 173: 2023–2030, 2004.

ARRUDA, M.A.; GRAÇA-SOUZA, A.V. & BARJA-FIDALGO, C. Heme and innate immunity: new insights for an old molecule. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 100: 799-803, 2005.

BARJA-FIDALGO, C.; CARLINI, C.R.; GUIMARÃES, J.A.; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S.H. Role of resident macrophages in canatoxin-induced in vivo neutrophil migration. **Inflammation** 16: 1-12, 1992.

BERI, R. & CHANDRA, R. Chemistry and biology of heme. Effect of metal salts, organometals and metalloporphyrins on heme synthesis and catabolism, with special reference to clinical implications and interactions with cytochrome P-450. **Drug Metabolism Reviews** 25: 49–152, 1993.

BIANCHI, M.E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **Journal of Leukocyte Biology** 81: 1-5, 2007.

BORGEAT, P. & SAMUELSSON, B. Transformation of arachidonic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes. Formation of a novel dihydroxyeicosatetraenoic acid. **Journal of Biological Chemistry** 254: 2643-2646, 1979.

BORREDAARD, N.; KJELDSSEN, L.; LOLLIK, K. & SENGELOV, H. Granules and secretory vesicles of the human neutrophil. **Clinical Experimental Immunology** 101: 06-09, 1995.

BOZZA, P.T.; PAYNE, J.L.; MORHAM, S.G.; LANGENBACH, R.; SMITHIES, O. & WELLER, P.F. Leukocyte lipid body formation and eicosanoid generation: cyclooxygenase-independent inhibition by aspirin. **Proceedings of the National Academy of Science** 93: 11091–11096, 1996.

BOZZA, P.T. & BANDEIRA-MELO, C. Mechanisms of leukocyte lipid body formation and function in inflammation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 100: 113-120, 2005.

BOZZA, P.T.; MELO, R.C. & BANDEIRA-MELO, C. Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. **Pharmacology & Therapeutics** 113: 30-49, 2007.

BOZZA, P.T.; KELLY G. MAGALHÃES, K.G. & WELLER, P.F. Leukocyte lipid bodies — Biogenesis and functions in inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta** 1791: 540-551, 2009.

BRASAEMLE, D.L.; BARBER, T.; WOLINS, N.E.; SERRERO, G.; BLANCHETTE-MACKIE, E.J. & LONDOS, C. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. **Journal of Lipid Reserach** 38: 2249-2263, 1997.

BUTCHER, E.C. Leukocyte–endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. **Cell** 67: 1033-1036, 1991.

CANETTI, C.; SILVA, J.S.; FERREIRA, S.H. & CUNHA, F.Q. Tumour necrosis factor-alpha and leukotriene B₄ mediate the neutrophil migration in immune inflammation. **British Journal of Pharmacology** 134: 1619-1628, 2001.

CANETTI, C.A.; LEUNG, B.P.; CULSHAW, S.; MCINNES, I.B.; CUNHA, F.Q. & LIEW, F.Y. IL-18 enhances collagen-induced arthritis by recruiting neutrophils via TNF- α and Leukotriene B₄. **Journal of Immunology** 171:1009-1015, 2003.

CARTER, G.W.; YOUNG, P.A.; ALBERT, D.H.; BOUSKA, J.; DYER, J.; BELL, R.L.; SUMMERS, J.B. & BROOKS, D.W. 5-Lipoxygenase inhibitory activity of zileuton. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 256: 929-937, 1990.

CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S.H. The release of a neutrophil chemotatic factor from peritoneal macrophages by endotoxin: inhibition by glucocorticoids. **British Journal of Phrarmacology** 129: 65-76, 1986.

CUZZOCREA, S.; SAUTEBIN, L.; DE SARRO, G.; COSTANTINO, G.; ROMBOLA, L.; MAZZON, E.; IALENTI, A.; DE SARRO, A.; CILIBERTO, G.; DI ROSA, M.; CAPUTI, A. P. & THIEMERMANN, C. Role of IL-6 in the pleurisy and lung injury caused by carrageenan. **Journal of Immunology** 163: 5094-5104, 1999.

CUZZOCREA, S.; ROSSI, A.; SERRAINO, I.; MAZZON, E.; DI PAOLA, R.; DUGO, L.; GENOVESE, T.; CALABRO, B.; CAPUTI, A.P. & SAUTEBI, L. 5-Lipoxygenase knockout mice exhibit a resistance to pleurisy and lung caused by carrageenan. **Journal of Leukocyte Biology** 73: 739-746, 2003.

D'AVILA, H.; MAYA-MONTEIRO, C.M. & BOZZA, P.T. Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. **International Immunopharmacology** 8: 1308–1315, 2008.

DAWSON, J.H. Probing structure–function relations in heme containing oxygenases and peroxidases. **Science** 240: 433-439, 1988.

DI DONATO, D. & BRASAEMLE, D.L. Fixation methods for the study of lipid droplets by immunofluorescence microscopy. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry** 51: 773-780, 2003.

DVORAK, A.M.; WELLER, P.F.; HARVEY, V.S.; MORGAN, E.S. & DVORAK, H.F. Ultrastructural localization of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) to isolated, purified fractions of guinea pig peritoneal macrophage and line 10 hepatocarcinoma cell lipid bodies. **International Archives of Allergy and Immunology** 101: 136-142, 1993.

EDER C. Mechanisms of interleukin-1beta release. **Immunology** 214:543-553, 2009.

Elliot, S. N. & Wallace J. L. Neutrophil-mediated gastrointestinal injury. **The Canadian Journal of Gastroenterology** 12: 559-568, 1998.

FIELD, J.J.; KRINGS, J.; WHITE, N.L.; YAN, Y.; BLINDER, M.A.; STRUNK, R.C. & DEBAUN, M.R. Urinary cysteinil leukotriene E4 is associated with increased risk for pain and acute chest syndrome in adults with sickle cell disease. **American Journal of Hematology** 84: 158-160, 2009.

FIGUEIREDO, R.T.; FERNANDEZ, P.L.; MOURAO-SA, D.S.; PORTO, B.N., DUTRA F.F.; ALVES, L.S.; OLIVEIRA, M.F.; OLIVEIRA, P.L.; GRAÇA-SOUZA, A.V. & BOZZA, M.T. Characterization of Heme as Activator of Toll-Like Receptor 4. **Journal Biological Chemistry** 282: 20221-20229, 2007.

FLAMAND, N.; MANCUSO, P.; SEREZANI, C.H. & BROCK, T.G. Leukotrienes: mediators that have been typecast as villains. **Cellular and Molecular Life Sciences** 64: 2657-2670, 2007.

FORD-HUTCHINSON, A.W.; BRAY, M.A.; DOIG, M.V.; SHIPLEY, M.E. & SMITH, M.J. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. **Nature** 286: 264-265, 1980.

FRIES, J.W.; WILLIAMS, A.J.; ATKINS, R.C.; NEWMAN, W.; LIPS-COMB, M.F. & COLLINS, T. Expression of VCAM-1 and E-selectin in an in vivo model of endothelial activation. **The American Journal of Pathology** 143: 725-737, 1993.

FUKATA, M.; VAMADEVAN, A.S. & ABREU, M.T, Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. **Seminars in Immunology** 21: 242-253, 2009.

GAULDIE J.; LAMONTAGNE, L. & STADNYK, A. Acute phase response in infectious disease. **Survey and Synthesis of Pathology Research** 4: 126-151, 1985.

GRAÇA-SOUZA, A.V.; ARRUDA, M.A.B.; FREITAS, M.S.; BARJA-FIDALGO, C. & OLIVEIRA, P.L. Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. **Blood**. 99: 4160-4165, 2002.

HARADA, A.; SEKIDO, N.; AKAHOSHI, T.; WADA, T.; MUKAIDA, N. & MATSUSHIMA, K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. **Journal of Leukocyte Biology** 56: 559-564, 1994.

HARRIS, E.H. & RAUCCI, A. Alarmin(g) news about danger Workshop on Innate Danger Signals and HMGB1. **EMBO reports** 7 : 774-778, 2006.

HEID, H.W.; MOLL, R.; SCHWETLICK, I.; RACKWITZ, H.R. & KEENAN, T.W. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases.

Cellular Tissue Research 294: 309-321, 1998.

HENDERSON, W.R. The Role of Leukotrienes in Inflammation. **Annals of Internal Medicine** 121 : 9 1994.

JIANG, D.; LIANG, J.; FAN, J.; YU, S.; CHEN, S.; LUO, Y.; PRESTWICH, G.D.; MASCARENHAS, M.M.; GARG, H.G.; QUINN, D.A.; HOMER, R.J.; GOLDSTEIN, D.R.; BUCALA, R.; LEE, P.J.; MEDZHITOV, R. & NOBLE, P.W. Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. **Nature Medicine** 11:1173-1179, 2005.

JUTILA, M.A.; ROTT, L.; BERG, E.L. & BUTCHER, E.C. Function and regulation of the neutrophil MEL-14 antigen in vivo: comparison with LFA-1 and MAC-1. **Journal of Immunology** 143: 3318-3324, 1989.

KUBES, P. Polymorphonuclear leukocyte-endothelium interactions: a role for pro-inflammatory and anti-inflammatory molecules. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology** 71: 88-97, 1993.

KUMAR, S. & BANDYOPADHYAY, U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. **Toxicology Letters Review** 157: 175–188, 2005.

LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M.I. & NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature Reviews Immunology** 7: 678-689, 2007.

LIM, K.G.; WAN, H.C.; BOZZA, P.T.; RESNICK, M.B.; WONG, D.T.; CRUIKSHANK, W.W.; KORNFELD, H.; CENTER, D.M. & WELLER, P.F. Human eosinophils elaborate the lymphocyte chemoattractants IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) and RANTES. **Journal of Immunology** 156: 2566-70, 1996.

MARTIN, T.R.; PISTORESE, B.P.; CHI, E.Y.; GOODMAN, R.B. & MATTHAY, M.A. Effects of leukotriene B₄ in the human lung recruitment of neutrophils into the alveolar spaces without a change in protein permeability. **Journal of Clinical Investigation** 84:1609-1619, 1989.

MATHIS, S.; JALA, V.R. & HARIBABU, B. Role of leukotriene B₄ receptors in

rheumatoid arthritis. **Autoimmunity Reviews** 7: 12–17, 2007.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature** 454: 428–435, 2008.

MOLLEN, K.P.; ANAND, R.J.; TSUNG, A.; PRINCE, J.M.; LEVY, R.M. & BILLIAR, T.R.. Emerging paradigm: Tolllike receptor 4 — sentinel for the detection of tissue damage. **Shock** 26: 430–437, 2006.

MURPHY, D.J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. **Progress in Lipid Research** 40: 325–438, 2001.

OHNISHI, H.; MIYAHARA, N. & GELFAND, E.W. The Role of Leukotriene B₄ in allergic diseases. **Allergology International** 57: 291–298, 2008.

OLIVEIRA, S.H.P.; CANETTI, C.; RIBEIRO, R.A. & CUNHA, F.Q. Neutrophil migration induced by IL-1 β depends upon LTB₄ released by macrophages and upon TNF- α and IL-1 β released by mast cells. **Inflammation** 31: 36–46, 2007.

OPPENHEIM, J.J. & YANG, D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. **Current Opinion in Immunology**. 17: 359–365, 2005.

PACHECO, P.; BOZZA, F.A.; GOMES, R.N.; BOZZA, M.; WELLER, P.F.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C. & BOZZA, P.T. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular loci involved in eicosanoids metabolism. **Journal of Immunology** 169: 6498–6506, 2002.

PALMBLAD, J.; MALMSTEN, C.L.; UDEN, A.M.; RADMARK, O.; ENGSTEDT, L. & SAMUELSSON, B. Leukotriene B₄ is a potent and stereospecific stimulator of neutrophil chemotaxis and adherence. **Blood** 58: 658–661, 1981.

PANÉS, J.; PERRY, M. & GRANGER, D.N. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. **British Journal of Pharmacology** 126: 537–550, 1999.

PATEL, N.; GONSALVES, C.S.; YANG, M.; MALIK, P. & KALRA, V.K. Placenta growth factor induces 5-lipoxygenase-activating protein to increase leukotriene

formation in sickle cell disease. **Blood** 113: 1129-1138, 2009.

PONKA, P. Cell biology of heme. **American Journal of Medical Sciences** 318: 241-256, 1999.

PORTO, B.N.; ALVES, L.S.; FERNÁNDEZ, P.L.; DUTRA, T.P.; FIGUEIREDO, R.T.; GRAÇA-SOUZA, A.V. & BOZZA, M.T. Heme induces neutrophil migration and reactive oxygen species generation through signaling pathways characteristic of chemoattractant receptors. **Journal of Biological Chemistry** 282: 24430-24436, 2007.

RADMARK, O., WERZ, O., Steinhilber, D. & Samuelsson, B. 5-Lipoxygenase: Regulation of expression and enzyme activity. **Trends in Biochemical Sciences** 32: 332-341, 2007.

RAMOS, C.D.; CANETTI, C.; SOUTO, J.T.; SILVA, J.S.; HOGABOAM C.M.; FERREIRA, S.H. & CUNHA, F.Q. MIP-1alpha [CCL3] acting on the CCR1 receptor mediates neutrophil migration in immune inflammation via sequential release of TNF-alpha and LTB₄. **Journal of Leukocyte Biology** 78: 167-177, 2005.

RAMOS, C.D.; FERNANDES, K.S.; CANETTI, C.; TEIXEIRA, M.M.; SILVA, J.S. & CUNHA, F.Q. Neutrophil recruitment in immunized mice depends on MIP-2 inducing the sequential release of MIP-1alpha, TNF-alpha and LTB₄. **European Journal of Immunology** 36: 2025-2034, 2006.

RIBEIRO, R.A.; CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S.H. Recombinant gamma-interferon causes neutrophil migration mediated by the release of a macrophage neutrophil chemotactic factor. **International Journal of Experimental Pathology** 71: 717-725, 1990.

RYAN, G.B. & MAJNO, G. Acute Inflammation: A Review. **American Journal of Pathology** 86: 183-276, 1977.

SASSA, S. & NAGAI, T. The role of heme in gene expression. **International Journal of Hematology** 63: 167-178, 1996.

SERHAN, C. N. & SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology**. 6: 1191-1197, 2005.

SERHAN, C. N. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and pro resolving lipid mediators and pathways. **Annual Reviews in Immunology** 25: 101–137 2007.

SETTY, B.N.Y. & STUART, M.J. Eicosanoids in sickle cell disease: potential neutrophil leukotriene B₄ to disease pathophysiology. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine** 139:80-89 2002.

SMITH, J.A. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. **Journal of Leukocyte Biology**. 56: 672-686, 1994.

SOTER, N.A. & AUSTEN, K.F. The diversity of mast cell-derived mediators: implications for acute, subacute, and chronic cutaneous inflammatory disorders. **Journal of Investigative Dermatology** 67: 313-319, 1976.

SPRINGER, T.A. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. **Annual Review of Physiology** 57: 827–872, 1995.

SUMMERS, J.B.; GUNN, B.P.; MAZDIYASNI, H.; GOETZE, A.M.; YOUNG, P.R.; BOUSKA, J.B.; DYER, R.D.; BROOKS, D.W. & CARTER, G.W. In vivo characterization of hydroxamic acid inhibitors of 5-lipoxygenase. **Journal of Medical Chemistry** 30: 2121-2126, 1987 (a).

SUMMERS, J.B.; MAZDIYASNI, H.; HOLMS, J.H.; RATAJCZYK, J.D.; DYER, R.D. AND CARTER, G.W. Hydroxamic acid inhibitors of 5-lipoxygenase. **Journal of Medical Chemistry** 30: 574-580, 1987 (b).

TAUCHI-SATO, K.; OZEKI, S.; HOUJOU, T.; TAGUCHI, R. & FUJIMOTO, T. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition. **Journal of Biological Chemistry** 277: 44507-44512, 2002.

TOLOSANO, E.; FAGOONEE, S.; HIRSCH, E.; BERGER, F.G.; BAUMANN, H.; SILENGO, L. & ALTRUDA, F. Enhanced splenomegaly and severe liver inflammation in haptoglobin/hemopexin double-null mice after acute hemolysis. **Blood** 100: 4201-4208, 2002.

van BUUL, J.D. & HORDIJK, P.L. Signaling in leukocyte transendothelial migration. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology** 24: 824-833, 2004.

van MEER, G. Caveolin, cholesterol, and lipid droplets? **Journal of Cell Biology** 152: 29-34, 2001.

VERRI, W.A. Jr.; CUNHA, T.M.; FERREIRA, S.H.; WEI, X.; LEUNG, B.P.; FRASER, A.; MCINNES, I.B.; LIEW, F.Y. & CUNHA, F.Q. IL-15 mediates antigen-induced neutrophil migration by triggering IL-18 production. **European Journal of Immunology** 12: 3373-3380, 2007.

WAGENER, F.A.D.T.G.; EGGERT, A.; BOERMAN, O.C.; OYEN, W.J.; VERHOFSTAD, A.; ABRAHAM, N.G.; ADEMA, G.; VAN KOOYK..Y.; DE WITTE, T. & FIGDO, C.G. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. **Blood** 98: 1802-1811, 2001.

WAGENER, F.A.D.T.G.; FELDMAN, E.; DE WITTE, T. & ABRAHAM, N.G. Heme induces the expression of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1 and E selectin in vascular endothelial cells. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine** 216: 456-463, 1997.

WELLER, P.F.; RYEOM, S.W.; PICARD, S.T.; ACKERMAN, S.J. & DVORAK, A.M. Cytoplasmic lipid bodies of neutrophils: formation induced by cis-unsaturated fatty acids and mediated by protein kinase C. **Journal of Cell Biology** 113: 137-146, 1991.

Wu, H.; Chen, G.; Wyburn, K.R.; Yin, J.; Bertolino, P.; Eris, J.M.; Alexander, S.I.; Sharland, A.F. & Chadban, S.J. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. **Journal of Clinical Investigation** 117: 2847-2859, 2007.

YAMAMURA, H.; TAIRA, M.; NEGI, H.; NANBU, F.; KOHNO, S.W. & OHATA, K. Effect of AA-861, a selective 5-Lipoxygenase inhibitor, on models of allergy in several species. **Japanese Journal Pharmacology** 47: 261-271, 1988.

YOKOMIZO, T.; IZUMI, T.; CHANG, K.; TAKUWA, Y. & SHIMIZU, T. A G protein-coupled receptor for leukotriene B₄ that mediates chemotaxis. **Nature** 387: 620-

624, 1997.

YOKOMIZO, T.; KATO, K.; TERAWAKI, K.; IZUMI, T. & SHIMIZU, T.A. Second leukotriene B (4) receptor BLT2: a new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. **Journal of Experimental Medicine** 192: 421–432, 2000.

ZIPSER, R.D. & LAFFI, G. Prostaglandins, Thromboxanes and Leukotrienes in clinical medicine. **The Western Journal of Medicine** 143: 485-497, 1985.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)