Marco Aurélio Ramirez Vinolo

Efeito dos ácidos graxos de cadeia curta sobre neutrófilos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Rui Curi

São Paulo 2010

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Vinolo, Marco Aurélio Ramirez.

Efeito dos ácidos graxos de cadeia curta sobre neutrófilos. / Marco Aurélio Ramirez Vinolo. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Rui Curi.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia humana. Linha de pesquisa: Estudo dos mecanismos de ação dos ácidos graxos em leucócitos.

Versão do título para o inglês: Effect of short chain fatty acids on neutrophils function.

Descritores: 1. Ácidos graxos de cadeia longa 2. Neutrófilos 3. Inflamação 4. Ácidos Graxos I. Curi, Rui II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana. III. Título.

ICB/SBIB0154/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	Marco Aurélio Ramirez Vinolo.
Título da Tese:	Efeito dos ácidos graxos de cadeia curta sobre neutrófilos.
Orientador(a):	Rui Curi.
A Comissão Ju públic	ulgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão ca realizada a////, considerou
	() Aprovado(a) () Reprovado(a)
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Presidente:	Assinatura: Nome: Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil Telefone :(55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438 e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **051** nas fls. **32** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Rui Curi, Coordenador(a) da Linha de Pesquisa "*Papel dos GPR 43 na função de macrófagos possível mecanismo de ação dos ácidos graxos de cadeia curta*" do qual participou(aram) o(s) alunos Marco Aurélio Ramirez Vinolo, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) em **22.06.2006**.

São Paulo, 23 de junho de 2006.

Profa. Dra. Marília C.L.Seelaender Coordenadora -CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. Patrícia Castelucci Secretária Suplente CEEA – ICB/USP

VERSIDADE DE SÃO PAULO	C E R T I F I C A D O Afficamos, nos termos do artigo 74, parágrafo único, inciso 5, alínea "b", do Estatuto Universidade de São Paulo, que Marco Aurelio Ramirez Vinolo Idador(a) da identidade: 332694707 - SSP SP noluiu o curso de Extensão Universitária na modalidade de Difusão: Curso de Proteção Radiológica b a responsabilidade: Instituto de Ciências Biomédicas. São Paulo, 11 de outubro de 2007 Prof. Dr. Luiz Roberto Giorgetti de Britto Prof. Dr. Jose Maria Alvarez Mosig Prof. Dr. Jose Maria Alvarez Mosig Prof. Dr. Jose Maria Alvarez Mosig	
UNIVER	Certificamos, nos da Universidade o portador(a) da ide concluiu o curso o sob a responsabil São Paulo, 1	PRÓ-REITORIA DE CUITURA E EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA

Dedico este trabalho a minha família e amigos, em especial à minha mãe, que sempre me apoiou e incentivou em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Sou muito grato a **Deus** por me dar saúde e capacidade para realizar este trabalho e pelas maravilhosas pessoas que ele colocou em meu caminho.

Aos meus pais (**Mercedes Ramirez e Francisco Vinolo**) pela educação e amor que sempre me deram.

Aos meus familiares e amigos por todo o incentivo.

Ao meu orientador Prof. Rui Curi,

por me guiar ao longo do tortuoso caminho do conhecimento. Mais do que um professor e orientador, um grande amigo e um modelo de profissional e ser humano a ser seguido.

A todos os **amigos** (graduandos, pós-graduandos, técnicos e agregados) do Laboratório de Fisiologia Celular do Instituto de Ciências Biomédicas da USP pelo inestimável auxílio e convivência. Sem vocês nada disto teria sido possível.

Aos professores Primavera Borelli e Ricardo Ambrósio Fock e aos amigos do laboratório de Hematologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, por sempre me apoiarem a seguir a carreira acadêmica e pela inestimável amizade.

Técnicos e professores do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo que me ensinaram e auxiliaram durante todo o meu doutorado.

Aos pesquisadores **Phillip Hawkins e Len Stephen** do Babraham Institute (Universidade de Cambridge, UK), a **Prof. Sandra Farsky** (FCF-USP), o **Prof. Phillip Newsholme** (UCD, Dublin) e os **integrantes de seus laboratórios** que confiaram no potencial do nosso trabalho e contribuíram enormemente para o enriquecimento do mesmo.

Técnicos e professores do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo que me ensinaram e auxiliaram durante todo o meu doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) pelo apoio financeiro.

Obrigado por tudo!

"Obstáculos são aqueles perigos que você vê quando tira os olhos de seu objetivo." Henry Ford

RESUMO

VINOLO, M. A. R. Efeito dos ácidos graxos de cadeia curta sobre neutrófilos. 2010, 165f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) acetato, propionato e butirato são produtos da fermentação bacteriana de carboidratos, sendo encontrados em altas concentrações no trato gastrintestinal (TGI). O interesse inicial sobre o efeito dos AGCC no processo inflamatório surgiu do fato de que a ingestão de fibras, fonte desses ácidos graxos, reduz a incidência de doenças inflamatórias no TGI. Além dos trabalhos que focavam no efeito dos AGCC como agentes antiinflamatórios, outros grupos sugeriram que esses ácidos graxos, que são produzidos em altas quantidades por bactérias anaeróbias causadoras de periodontites (por exemplo, Porphyromonas gingivalis), iniciariam e/ou intensificariam o processo inflamatório na cavidade oral. Neste estudo avaliamos in vitro o efeito dos AGCC (acetato, propionato e butirato) sobre o recrutamento de neutrófilos e parâmetros funcionais dessas células (produção de espécies reativas de oxigênio [ERO], citocinas e óxido nítrico, capacidade de fagocitose e destruição de Candida albicans). Além disso, investigamos os mecanismos envolvidos: modulação da ativação do fator de transcrição NFkB, inibição de histonas desacetilases (HDAC) e a participação do receptor GPR43. Os AGCC afetaram diferentes funções de neutrófilos e interferiram com o processo inflamatório. Acetato e butirato alteraram a produção de ERO por neutrófilos; o primeiro aumentou a produção não estimulada de peróxido de hidrogênio, enquanto o butirato inibiu a produção de ERO estimulada por fMLP ou PMA. O butirato reduziu a fagocitose e killing de leveduras, efeito esse que pode ou não ter relação com a redução na produção de ERO. Propionato e butirato reduziram a produção de TNF-α, CINC-2αβ e óxido nítrico (NO) e aumentaram a síntese de IL-1β por neutrófilos estimulados com LPS. Esses efeitos decorreram, ao menos em parte, de ação a nível transcricional e parecem envolver inibição da atividade de HDAC e, como conseqüência direta ou indireta, atenuação da ativação do fator de transcrição NFkB. Com relação ao

recrutamento de leucócitos, os AGCC aumentaram a migração de neutrófilos *in vitro* (ensaios de quimiotaxia) e *in vivo* (ensaio da bolsa e análise da interação leucócito-endotélio por microscopia intravital). Esses efeitos decorreram, ao menos em parte, de aumento da produção de CINC-2αβ (quimioatraente para neutrófilos) pelo tecido e da ação direta dos AGCC via receptores GPR43. Os resultados ora relatados são indicativos de que os AGCC apresentam ações pró-(aumento da migração leucocitária) e antiinflamatórias (redução da produção de citocinas pró-inflamatórias) dependendo do parâmetro analisado. Esses resultados podem ter implicações na resposta imune a bactérias anaeróbias e nas doenças inflamatórias que afetam o TGI.

Palavras-chave: Ácidos graxos de cadeia curta. Neutrófilos. Inflamação. Ácidos graxos.

ABSTRACT

VINOLO, M. A. R. Effect of short chain fatty acids on neutrophils function. 2010, 165p. Thesis (Ph. D. in Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The short-chain fatty acids (SCFA) acetate, propionate and butyrate are produced by bacterial fermentation of carbohydrates and are found in high concentrations in the gastrointestinal (GI) tract. The initial concern about the effect of SCFA in the inflammatory process arose from the fact that the intake of fiber, an important source of these fatty acids, reduces the incidence of inflammatory diseases of the GI tract. Besides the works that focused on the effect of SCFA as anti-inflammatory agents, other groups have suggested that these fatty acids, which are produced in high quantities by anaerobic bacteria that cause periodontitis (e.g. Porphyromonas gingivalis), would initiate and/or intensify the inflammatory process in oral cavity. We evaluated *in vitro* the effect of SCFA (acetate, propionate and butyrate) on the recruitment of neutrophils and functional parameters of these cells (production of reactive oxygen species [ROS], cytokines and nitric oxide [NO], phagocytosis capacity and killing of Candida albicans). Furthermore, we investigated the mechanisms involved: modulation of NFkB activation, inhibition of histone deacetylases (HDAC) and the involvement of the receptor GPR43. The SCFA affected different functions of neutrophils and interfered with the inflammatory process. Acetate and butyrate altered ROS production by neutrophils, the former increased the unstimulated production of hydrogen peroxide, whereas butyrate inhibited ROS production stimulated by fMLP or PMA. Butyrate reduced the phagocytosis and killing of yeast, an effect which may or may not be related to the attenuation of ROS production. Propionate and butyrate reduced the release of TNF- α , CINC-2 $\alpha\beta$ and NO and increased the synthesis of IL-1 β by LPS-stimulated neutrophils. These effects are due, at least in part, by modulation at the transcriptional level and seem to involve inhibition of HDAC and, as a direct or indirect consequence of it, attenuation of NFkB activation. With regard to the recruitment of leukocytes, the SCFA increased migration of neutrophils in vitro

(chemotaxis assays) and *in vivo* (air pouch assay and analysis of leukocyteendothelium interaction by intravital microscopy). These effects are due, at least in part, to an increased production of CINC- $2\alpha\beta$ (chemoattractant for neutrophils) by the tissue and by a direct action of SCFA through GPR43. The results reported herein are indicative that the SCFA present both pro- (increased leukocyte migration) and anti-inflammatory effects (reduced production of proinflammatory cytokines) depending on the parameter analyzed. These results may have implications in immune response to anaerobic bacteria and in inflammatory diseases that affect the GI tract.

Key-words: Short chain fatty acids. Neutrophils. Inflammation. Fatty acids.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Processo de fermentação das fibras no TGI e formação dos AGCC 26
Figura 2. Esquema geral da interação entre endotélio e neutrófilos durante o
recrutamento desses para o foco inflamatório
Figura 3. Acoplamento dos componentes do sistema NADPH oxidase após
ativação dos neutrófilos
Figura 4. Possíveis espécies oxidantes produzidas pelos neutrófilos humanos
após ativação do sistema NADPH oxidase
Figura 5. Foto das células coletadas do peritôneo 4 horas após administração de
glicogênio de ostra
Figura 6. Esquema da placa transwell utilizada no ensaio de migração in vitro. 668
Figura 7. Figura esquemática da Câmara EzTaxiscan
Figura 8. Efeito dos AGCC na integridade da membrana plasmática e
fragmentação de DNA de neutrófilos de rato74
Figura 9. Efeito dos AGCC sobre a produção de peróxido de hidrogênio por
neutrófilos de rato
Figura 10. Efeito dos AGCC sobre a produção de peróxido de hidrogênio por
neutrófilos de rato
Figura 11. Efeito dos AGCC sobre a produção de superóxido por neutrófilos de
rato
Figura 12. Efeito dos AGCC sobre a produção de superóxido por neutrófilos de
rato
Figura 13. Efeito da toxina pertussis sobre a produção de superóxido por
neutrófilos
Figura 14. Efeito dos AGCC sobre a produção de HOCI por neutrófilos de rato83
Figura 15. Expressão de mRNA das proteínas p22 ^{phox} e p47 ^{phox} em neutrófilos de
rato após incubação com AGCC por 1 (A e B) ou 4 horas (C e D)
Figura 16. Efeito dos AGCC sobre a fosforilação da proteína p47 ^{phox}
Figura 17. Efeito do butirato sobre a concentração de AMP cíclico em
neutrófilos

Figura 18. Efeito dos AGCC sobre a capacidade fagocítica (A) e atividade
fungicida (B) de neutrófilos de rato
Figura 19. Efeito dos AGCC sobre a produção de citocinas por neutrófilos de rato.
Figura 20. Efeito da tricostatina A (TSA) sobre a produção de citocinas por
neutrófilos de rato
Figura 21. Efeito dos AGCC e tricostatina sobre a produção de NO por neutrófilos de rato
Figura 22. Expressão relativa do mRNA das citocinas TNF-α (A), CINC 2α (B), IL-
1β (C) e iNOS (D) em neutrófilos após incubação com AGCC por 1 (TNF-α) e
4 horas (CINC-2, IL-1β e iNOS) na presença de LPS (5 μg/mL)
Figura 23. Efeito dos AGCC sobre a atividade de histona desacetilases (HDACs).
Figura 24. Foto representativa de três experimentos
Figura 25. Efeito dos AGCC sobre a ativação por LPS do fator de transcrição
NFκB em neutrófilos de ratos98
Figura 26. Efeito dos AGCC sobre a quimiotaxia de neutrófilos
Figura 27. Efeito de diferentes concentrações de fMLP sobre a quimiotaxia de neutrófilos
Figura 28. Efeito de diferentes concentrações de propionato sobre a quimiotaxia de neutrófilos
Figura 29. Efeito do agonista do receptor GPR43 (CTMB) sobre a quimiotaxia de neutrófilos
Figura 30. Efeito de diferentes concentrações do agonista seletivo do receptor GPR43 (CTMB) sobre a quimiotaxia de neutrófilos
Figura 31. Análise da resposta quimiotática de neutrófilos isolados de animais que
não expressam o receptor GPR43 (GPR43 ^{-/-}) ao propionato, CTMB e fMLP.
Figura 32. Efeito dos AGCC sobre a migração de células para a bolsa de ar 108
Figura 22 Efeite des ACCC sobre a liberação de citorinas na holea de ar

Figura 33. Eteito dos AGCC sobre a liberação de citocinas na bolsa de ar. 108

- **Figura 34.** Histograma representativo das análises por citometria de fluxo da expressão de β2-integrina and L-selectina na membrana de neutrófilos..... 111
- Figura 35. Expressão de mRNA das proteínas L-selectina e β2 integrina em neutrófilos de rato após incubação com AGCC por uma (A e B) ou 4 (C e D) horas.
 Figura 36. Efeito dos inibidores de HDACs sobre a ativação e desativação do fator
 - de transcrição NFκB......125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração dos AGCC no organismo. 2	29
Tabela 2 - Genes regulados pelo NFκB	39
Tabela 3 - Temperatura de anelamento e seqüência dos primers utilizados	51
Tabela 4 - Concentração máxima tolerável dos AGCC por neutrófilos de rato 7	73
Tabela 5 - Efeito dos AGCC sobre o rolamento e adesão de leucócitos a	30
endotélio10)9
Tabela 6 - Efeito dos AGCC sobre a expressão de L-selectina e β 2-integrina r	າa
superfície de neutrófilos11	12
Tabela 7 - Efeito dos AGCC sobre a produção de mediadores inflamatórios p	or
diferentes tipos celulares12	22

LISTA DE ABREVIATURAS

- Ac acetato
- AGCC ácidos graxos de cadeia curta
- AMPc adenosina monofosfato cíclico
- APC célula apresentadora de antígeno
- Bt butirato
- CAM moléculas de adesão celular
- C/EBP proteína estimuladora de ligação a CCAAT
- CINC citocina indutora de quimiotaxia de neutrófilos
- CoA coativador
- CoR correpressor
- Cox- ciclooxigenase
- CREBP proteína ligante do elemento responsivo ao AMP cíclico
- ELAM molécula endotelial de adesão leucocitária
- EMSA ensaio de mobilidade eletroforética retardada
- ERO espécies reativas de oxigênio
- fMLP formil metionil-leucil-fenilalanina
- FPR receptor de fMLP
- G-CSF fator estimulator de colônias granulocíticas
- GIRK canais de potássio regulados pela proteína G
- GM-CSF fator estimulator de colônias grânulo- monocíticas
- GPR receptor acoplado a proteína G
- HAT histona acetiltransferase
- HBSS solução tamponada de Hanks
- HDAC histona desacetilase
- IBD doença inflamatória intestinal
- IBMX 3-isobutil-1- metilxantina
- ICAM molécula de adesão intercelular
- IFN-γ intérferon-γ
- IL-1 β interleucina-1β
- IL-10 interleucina-10

- IL-12 interleucina-12
- IL-2 interleucina-2
- IL-6 interleucina-6
- IL-8 interleucina-8
- iNOS forma induzida da óxido nítrico sintetase
- IP iodeto de propídio
- IP-10 proteína de 10 KDa induzida por intérferon
- LBP proteína ligadora de LPS
- LPS lipopolissacarídeo
- LTB4 leucotrieno B4
- MAPK proteína quinase ativada por mitógenos
- MIP proteína inflamatória de macrófagos
- MIG monocina induzida por intérferon
- mRNA RNA mensageiro
- NFκB fator nuclear κB
- NCBI National Center for Biotechnology Information
- NO óxido nítrico
- PAGE eletroforese em gel de poliacrilamida
- PAMPs padrões moleculares associados à patógenos
- PBS- solução tamponada de fosfato
- PCR reação em cadeia da polimerase
- PE ficoeritrina
- PGE2 prostaglandina E2
- PGI2 prostaciclina I2
- PI3K fosfatidillinositol 3-quinase
- PKA proteína quinase A
- PKC proteína quinase C
- PMA acetato de forbol miristato
- PMSF fluoreto de fenilmetanossulfonil
- Pr propionato
- PTX toxina pertussis

- TLR-4 receptor do tipo toll-4
- SDS dodecilsulfato de sódio
- SHN soro homólogo normal
- SOD superóxido dismutase
- SRC-1 coativador do receptor de esteróides
- TXB2 tromboxano B2
- TCR receptor de linfócitos T
- TGI trato gastrintestinal
- TGF fator de necrose tumoral
- TMB 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
- TNF- α fator de necrose tumoral- α
- TSA tricostatina A
- VCAM molécula de adesão vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
1.1 Ácidos graxos de cadeia curta	25
1.2 Processo inflamatório	30
1.2.1 Migração dos leucócitos durante o processo inflamatório	32
1.2.2 Mecanismos efetores dos neutrófilos	34
1.3 Efeitos dos AGCC sobre o processo inflamatório	39
1.3.1 Mecanismos de ação dos AGCC em leucócitos	42
1.4 Justificativa para a realização do estudo	44
2 OBJETIVOS	45
3 MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1 Preparo das soluções de ácidos graxos de cadeia curta	48
3.2 Obtenção de neutrófilos	48
3.2.1 Isolamento de neutrófilos de rato após administração i.p. de solução	de
glicogênio de ostra	48
3.2.2 Isolamento de neutrófilos da medula óssea de camundongos	49
3.3 Teste de citotoxicidade	51
3.3.1 Determinação da viabilidade celular	51
3.3.2 Determinação da fragmentação de DNA	51
3.4 Determinação da produção de ERO por neutrófilos	52
3.4.1 Determinação da produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	52
3.4.2 Determinação de superóxido (O2) pela técnica de qumioluminescên	cia
amplificada pela lucigenina	53
3.4.3 Determinação da produção de ácido hipocloroso (HOCI)	53
3.5 Avaliação da fosforilação de p47 ^{phox}	54
3.5.1 Extração e quantificação de proteínas	54
3.5.2 Imunoprecipitação	54
3.5.3 Eletroforese em gel de poliacriamida (SDS-PAGE) e imunoblotting	55
3.6 Determinação das concentrações intracelulares de AMP cíclico	56
3.7 Avaliação de fagocitose e da atividade fungicida <i>in vitro</i>	56

3.7.1 Obtenção de soro homólogo normal	56
3.7.2 Preparo e opsonização da suspensão de Candida albicans	57
3.7.3 Incubação dos neutrófilos com as leveduras	57
3.8 Determinação da produção de citocinas	58
3.9 Determinação de óxido nítrico (NO)	59
3.10 Determinação da atividade de HDAC	59
3.11 Avaliação da expressão gênica pela técnica de reação em cadeia	da
polimerase (PCR) em tempo real	60
3.12 Análise da ativação do fator de transcricao NF-κB pelo ensaio	de
mobilidade eletroforética retardada (EMSA) em gel de poliacrilamida	62
3.13 Avaliação da migração de neutrófilos <i>in vivo</i>	64
3.13.1 Ensaio da bolsa de ar	64
3.13.2 Microscopia intravital	65
3.14 Análise da expressão de moléculas de adesão (L-selectina e (32-
integrina) por citometria de fluxo	66
3.15 Avaliação do efeito quimiotático dos AGCC sobre neutrófilos	de
camundongo	67
3.15.1 Ensaio de quimiotaxia utilizando transwells	67
3.15.2 Ensaio de quimiotaxia utilizando o sistema EzTaxiscan®	68
3.16 Tratamento estatístico	71
4 RESULTADOS	72
4.1 Avaliação da citotoxicidade dos AGCC	73
4.1.1 Efeito dos AGCC sobre a integridade de membrana e a fragmentaç	ão
de DNA em neutrófilos de rato	73
4.2 Efeitos dos AGCC sobre a produção de ERO por neutrófilos de ratos	75
4.2.1 Produção de peróxido de hidrogênio	75
4.2.2 Produção de superóxido	78
4.2.3 Produção de ácido hipocloroso (HOCI)	83
4.3 Efeitos dos AGCC sobre a expressão gênica de p22 ^{phox} e p47 ^{phox} e	em
neutrófilos de ratos	84
4.4 Efeitos dos AGCC sobre a ativação da p47 ^{phox} em neutrófilos de ratos	86

4.5 Efeito dos AGCC sobre a produção de AMP cíclico por neutrófilos de
ratos
4.6 Efeito dos AGCC sobre a capacidade fagocítica e de destruição de C.
albicans
4.7 Efeito dos AGCC na produção de citocinas e NO por neutrófilos de rato90
4.7.1 Efeito dos AGCC e do inibidor de HDACs (tricostatina A) sobre a
produção de citocinas por neutrófilos de rato90
4.7.2 Efeito dos AGCC e do inibidor de HDAC (tricostatina A) sobre a
produção de óxido nítrico (NO) por neutrófilos de rato
4.8 Efeito dos AGCC sobre o conteúdo de mRNA de citocinas e iNOS em
neutrófilos de rato
4.9 Efeito dos AGCC sobre a atividade de histonas desacetilases (HDAC) 96
4.10 Efeito dos AGCC sobre a ativação do fator de transcrição NFκB em
neutrófilos de ratos
4.11 Efeito dos AGCC sobre o processo de migração de neutrófilos
4.11.1 Efeito quimiotático dos AGCC
4.11.2 Efeito quimiotático do agonista seletivo do receptor GPR43 (CTMB)103
4.11.3 Efeito dos AGCC sobre a migração de leucócitos para a bolsa de ar107
4.11.4 Efeito dos AGCC sobre a interação endotélio-leucócito
4.11.5 Efeito dos AGCC sobre a expressão de moléculas de adesão 110
4.11.6 Efeito dos AGCC sobre o conteúdo de mRNA das moléculas de
adesão (L-selectina e β2-integrina)113
5 DISCUSSÃO 114
5.1 Efeito dos AGCC sobre a produção de ERO por neutrófilos 115
5.2 Efeito dos AGCC sobre a produção de citocinas e NO por neutrófilos . 120
5.3 Efeito dos AGCC sobre a migração de neutrófilos 126
6 DISCUSSÃO 11430
REFERÊNCIAS133
ANEXOS146
ANEXO A - Artigo 1 - VINOLO, M. A.; HATANAKA, E.; LAMBERTUCCI, R. H.;
NEWSHOLME, P.; CURI, R. Effects of short chain fatty acids on effector

mechanisms of neutrophils. Cell. Biochem. Funct., v. 27, n. 1, p. 48-55, 2009.....147

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ácidos graxos de cadeia curta

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) são compostos orgânicos que possuem em sua estrutura de 1 a 6 átomos de carbono (CH₃-(CH₂)_X-COOH; 1<X<6). Podem ser obtidos endógena- (metabolismo de gorduras e carboidratos) ou exogenamente (absorção dos produtos formados pela fermentação bacteriana de carboidratos), sendo essa última a principal fonte de AGCC no organismo. Em certas condições, como no jejum prolongado (SCHEPPACH et al., 1991), intolerância à glicose (WOLEVER et al., 1997) e diabetes (AKANJI e HOCKADAY, 1990), nas quais há aumento considerável da oxidação de gorduras, e após ingestão de álcool (aumento de 10 vezes na concentração de acetato no sangue) (SILER et al., 1999), a via endógena contribui de maneira importante para as concentrações plasmáticas de AGCC.

As fibras provenientes da dieta são compostas, principalmente, por polissacarídeos e em menor parte por oligossacarídeos, que não são digeridos pelas enzimas intrínsecas do estômago e intestino humano. Durante a passagem das fibras pelo trato gastrintestinal (TGI), as mesmas são em grande parte degradadas pela microbiota intestinal, havendo formação e liberação de AGCC (acetato, propionato e butirato, mais abundantes) como subprodutos do processo. Além disso, parte dos AGCC formados no intestino é proveniente da fermentação de amido e alguns aminoácidos (TOPPING e CLIFTON, 2001). Outros ácidos graxos encontrados no TGI, como ácidos dicarboxílicos, ácidos carboxílicos (ácido pirúvico) e hidróxi-ácidos (ácido láctico), estão presentes em concentrações muito baixas (CUMMINGS, 1995).

A relação entre hospedeiro e microbiota é do ponto de vista nutricional mutuamente benéfica. A digestão microbiana de polímeros de carboidratos fornece ao hospedeiro nutrientes importantes para a manutenção do TGI. Por outro lado, os microorganismos que colonizam o TGI têm acesso a quantidades abundantes de fontes de carbono (HOOPER et al., 2002).

O processo de fermentação bacteriana de carboidratos (Figura 1) tem como principais produtos finais acetato, propionato e butirato. A produção diária de AGCC em humanos é de cerca de 100 a 200 mM (COOK e SELLIN, 1998; TOPPING e CLIFTON, 2001). A razão da concentração desses compostos no intestino é de, aproximadamente, 70:20:10, e suas concentrações estimadas no cólon proximal variam de 70 a 140 mM (COOK e SELLIN, 1998; TOPPING e CLIFTON, 2001) e caem para 20 a 70 mM no cólon distal (TOPPING e CLIFTON, 2001). Esses valores são influenciados pela dieta, porção do intestino e tipo de microbiota presente (HOOPER, MIDTVEDT et al., 2002). Vale ressaltar que a fermentação de alguns aminoácidos, particularmente daqueles de cadeia ramificada e metionina, também pode contribuir para as concentrações de AGCC encontradas no TGI (MACFARLANE et al., 1986).



Figura 1. Processo de fermentação das fibras no TGI e formação dos AGCC. Fonte: Adaptado de Hooper et al. (2002).

Os AGCC são liberados na luz intestinal e sua absorção ocorre rapidamente. A absorção de AGCC no ceco e cólon é um processo muito eficiente, sendo que apenas de 5 a 10% é excretado nas fezes (MCNEIL et al., 1978; RUPPIN et al., 1980; ROEDIGER e MOORE, 1981). Há dois mecanismos descritos para a absorção desses ácidos graxos: 1 – difusão simples da forma protonada dos AGCC (responsável por cerca de 60%) e 2 – absorção da forma ionizada dos AGCC envolvendo transporte de Na⁺ e K⁺ (COOK e SELLIN, 1998).

Após sua absorção, os AGCC são metabolizados essencialmente por três tecidos: mucosa intestinal (colonócitos), tecido hepático e tecido muscular, que utiliza, principalmente, acetato, como fonte de energia (COOK e SELLIN, 1998). A microbiota do TGI, através da fermentação e geração de AGCC, afeta o balanço energético do organismo, sendo que a produção desses compostos no TGI tem relação com o desenvolvimento de obesidade (BACKHED et al., 2004; BACKHED et al., 2007).

O butirato é o principal substrato energético utilizado pelos colonócitos. De 70 a 90% do butirato é metabolizado por essas células (COOK e SELLIN, 1998). Por sua vez, cerca de 90% do butirato presente no sangue portal é extraído pelo fígado, de modo que as concentrações plasmáticas deste AGCC são muito baixas (WOLEVER, JOSSE et al., 1997; WOLEVER et al., 2002). A metabolização do butirato ocorre exclusivamente no interior da mitocôndria (fonte de acetil-CoA independente de carnitina) e esse composto também constitui potencial substrato para a cetogênese (CUMMINGS, 1995).

O acetato, AGCC mais abundante, é pouco metabolizado no cólon devido em parte ao fato de ser rapidamente absorvido e transportado para o fígado (COOK e SELLIN, 1998). Após sua absorção, cerca de 75% do acetato é captado e metabolizado no fígado, onde pode ser utilizado por diversas vias: síntese de ácidos graxos de cadeia longa (lipogênese), cetogênese (síntese de corpos cetônicos), produção de colesterol (fonte primária para a síntese de colesterol), glutamina e glutamato. O restante do acetato, que atinge a circulação, é rapidamente captado e oxidado por vários tecidos como músculo e glândulas mamárias (AKANJI e HOCKADAY, 1990).

27

Apenas 10% do propionato absorvido permanece na corrente sanguínea após a passagem pelo fígado. Neste órgão, esse AGCC é metabolizado, inibe a síntese de colesterol e pode ser utilizado como substrato, via formação de piruvato, da gliconeogênese (WOLEVER et al., 1991). Esse AGCC pode ser formado no catabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada e metionina, sendo que sua concentração plasmática pode estar aumentada em condições nas quais há aumento das taxas de oxidação de aminoácidos (CUMMINGS, 1995).

As concentrações de AGCC no sangue periférico são normalmente muito baixas. O acetato, AGCC encontrado em maior concentração no organismo, está presente em concentrações que variam de 58 a 230 μ M no sangue (WOLEVER, JOSSE et al., 1997; WOLEVER, SCHRADE et al., 2002; VOGT, PENCHARZ et al., 2004). Concentrações séricas de 3 a 15 μ M e 1 a 28 μ M têm sido descritas para propionato e butirato (Tabela 1) (WOLEVER, JOSSE et al., 1997; WOLEVER, SCHRADE et al., 2004).

Os AGCC também são encontrados na cavidade oral em grandes quantidades (Tabela 1). Diversos trabalhos têm proposto que esses compostos modulam o processo inflamatório e a resposta imune a bactérias anaeróbias. Singer et al. (1988) foi um dos primeiros a indicar que os AGCC poderiam estar envolvidos na doença periodontal; esse grupo demonstra que propionato e butirato estão presentes no sobrenadante de culturas de material obtido da placa em concentrações suficientes inibir proliferação de para а fibroblastos. Posteriormente, outros trabalhos também relataram efeitos deletérios dos AGCC em linfócitos, células epiteliais e queratinócitos da gengiva (KURITA-OCHIAI et al., 1997; POLLANEN et al., 1997; SORKIN e NIEDERMAN, 1998). Após a ingestão e mastigação dos alimentos, as bactérias da cavidade oral produzem os AGCC, cujas concentrações máximas são alcançadas rapidamente (5 a 10 minutos), que permanecem associados a partículas de comida retidas na dentição (KASHKET et al., 1996). O acúmulo de AGCC após ingestão de alimentos e / ou a aplicação direta desses ácidos graxos na gengiva causam aumento significativo da temperatura subgengival e da migração de neutrófilos para o tecido sugerindo que o acetato, propionato e butirato produzidos na cavidade oral estão, ao menos em

parte, envolvidos nos efeitos inflamatórios de alimentos ingeridos sobre a gengiva (NIEDERMAN, ZHANG et al., 1997; KASHKET et al., 1998).

Os AGCC produzidos no TGI, além de constituírem fonte energética importante para diferentes células do organismo, também modulam a expressão de genes (OGAWA et al., 2003; RANGANNA et al., 2003; WEBER e KERR, 2006), ativação de fatores de transcrição (SEGAIN et al., 2000; ZAPOLSKA-DOWNAR et al., 2004), diferenciação, maturação e ativação de células (BOHMIG et al., 1999; MILLARD et al., 2002). Esses compostos modulam diferentes aspectos da fisiologia gastrintestinal como a liberação de hormônios (peptídeo Y) (SAMUEL et al., 2008) e absorção de eletrólitos e água (BINDER e MEHTA, 1989). Outros processos como adipogênese/lipólise (GE et al., 2008) e a resposta imune/inflamatória também são alvo da ação dos AGCC.

	Acetato	Propionate	Butirato	Referências
Íleo (mmol/Kg)	8	1,5	2,4	
Ceco (mmol/Kg)	70	25	26	
Cólon (mmol/Kg)	43 - 64	14 - 27	15 - 25	1907)
Plasma (µM)	58 - 230	3 - 15	1 - 28	(CUMMINGS, POMARE et al., 1987; WOLEVER, JOSSE et al., 1997; WOLEVER, SCHRADE et al., 2002; VOGT, ISHII-SCHRADE et al., 2004; ZHAO et al., 2007)
Fluido do suco gengival (indivíduos com periodontite) (mM)	nq	0,8 - 9,4	0,2 - 2,6	(NIEDERMAN, BUYLE- BODIN et al., 1997)
Saliva (indivíduos sem periodontite) (mM)	31,4 – 307,0	5,9 – 69,2	0 – 2,9	(SILWOOD et al., 2002)
A1 1.4	~			

 Tabela 1 - Concentração dos AGCC no organismo.

Abreviaturas: não quantificado (nq).

1.2 Processo inflamatório

A inflamação é o mecanismo básico de que o organismo, particularmente os tecidos vascularizados, dispõe para o reparo tecidual após injúria. Esse processo consiste em uma cascata de eventos celulares e microvasculares, organizados temporalmente, com a finalidade de retirar o estímulo agressor, seja este de caráter infeccioso ou não, degradar o tecido lesado e recuperar a sua integridade. A inflamação envolve a interação entre diferentes tipos celulares, dentre eles os leucócitos e as células endoteliais, sendo reconhecida pelos sinais clínicos clássicos: tumor, calor, rubor, dor e, eventualmente, perda de função (LEY, 2001; SCHMID-SCHONBEIN, 2006).

A inflamação é classicamente categorizada, de acordo com seu período de duração, em: aguda e crônica. A inflamação aguda é uma resposta rápida e curta (minutos a dias) caracterizada por acúmulo de fluido, plasma e granulócitos, e crônica, com duração mais prolongada, influxo de linfócitos e macrófagos e proliferação de fibroblastos. Apesar de o processo inflamatório ser iniciado por diferentes tipos de estímulos, as alterações desencadeadas pela ativação inicial são em geral as mesmas e envolvem:

 vasodilatação, que ocorre após um breve período inicial de vasoconstrição e leva a um aumento da perfusão sanguínea do tecido (calor e rubor);

 - aumento da permeabilidade vascular: as células endoteliais das veias se contraem e aumentam o espaço intercelular, facilitando a passagem de proteínas plasmáticas (tumor);

 ativação e recrutamento de leucócitos: diferentes mediadores químicos (dentre eles os derivados lipídicos e quimiocinas) liberados pelas células endoteliais, macrófagos e fibroblastos, ativam os leucócitos, particularmente, no início do processo, os neutrófilos, que atravessam o endotélio e sob a ação de fatores quimiotáticos se dirigem ao local da inflamação; febre, que decorre da ação de compostos endógenos, produzidos em resposta ao estímulo inicial, como as citocinas, ou mesmo compostos exógenos, por exemplo, o componente da parede de bactérias gramnegativas, lipopolissacarideo (LPS), os quais atuam sobre os mecanismos hipotalâmicos reguladores da temperatura corporal.

Caso não haja a total retirada do agente iniciador do processo inflamatório, este pode prosseguir e expandir o seu repertório de mediadores químicos e componentes celulares, levando ao processo inflamatório crônico (LEY, 2001).

Os leucócitos são particularmente importantes no processo inflamatório uma vez que são as células responsáveis pela destruição e remoção de patógenos, no caso em que a inflamação é decorrente da presença ou ação de um agente infeccioso. Além disso, liberam mediadores químicos que estimulam o crescimento celular e a regeneração tecidual (SCHMID-SCHONBEIN, 2006).

Os neutrófilos são produzidos em humanos adultos na medula óssea a partir de células precursoras denominadas mieloblastos. Estas células passam por processo de diferenciação e maturação altamente regulado por diferentes fatores como citocinas, fatores de crescimento e hormônios, além da estreita relação célula-célula e célula-estroma. Os neutrófilos constituem de 40 a 50% da população de leucócitos circulantes em humanos adultos. Morfologicamente, são caracterizados em humanos como células esféricas que apresentam de 12 a 15 µm de diâmetro, com núcleo segmentado em 3 a 5 lóbulos. Apresentam em seu citoplasma quatro tipos de grânulos:

 azurófilos ou primários, que possuem ampla gama de enzimas com ação antimicrobiana, por exemplo, a mieloperoxidase, catepsina, elastase, proteinase-3 e lisozima,

 específicos ou secundários, grânulos que, assim como os primários, contêm substâncias antimicrobianas dentre elas a lisozima e os quelantes de ferro e cobre (lactoferrina e transcobalamina),

- terciários, grânulos que são caracterizados por, assim como no caso dos secundários, serem peroxidase negativos (ausência de mieloperoxidase em seu interior) e constituirem importante fonte de proteínas que degradam a matriz extracelular (por exemplo, a metaloprotease-9) e de receptores de membrana necessários durante o processo de extravasamento e diapedese dos neutrófilos (dentre eles o receptor de fMLP (FPR) e CD11b),

- vesículas secretórias, que constituem um *pool* de reserva de receptores de membrana, que são incorporados a membrana plasmática após a liberação do grânulo. Dentre os receptores abundantes nessas vesículas vale ressaltar as β2-integrinas, CD14, CD16 e o FPR (SEGAL, 2005).

1.2.1 Migração dos leucócitos durante o processo inflamatório

Uma etapa fundamental do processo inflamatório é a migração dos leucócitos da circulação sanguínea para o tecido inflamado. O recrutamento de leucócitos ocorre via interação entre moléculas de adesão presentes nos mesmos e nas células endoteliais e de quimioatraentes endógenos (por exemplo, leucotrieno-B4 e interleucina-8) ou exógenos (por exemplo, formil metionil-leucil-fenilalanina (fMLP)), com seus respectivos receptores nos leucócitos.

Três famílias de moléculas de adesão participam do recrutamento dos leucócitos:

- Selectinas – glicoproteínas de membrana com domínio distal semelhante à lectina que interagem com grupos específicos de carboidratos. Essa classe de moléculas de adesão é particularmente importante no início das interações leucócitos-endotélio. Os leucócitos expressam a L-selectina (CD62L), enquanto que as células endoteliais, quando ativadas, expressam P-selectina (CD62P) e Eselectina (CD62E). A interação das selectinas presentes nessas células com seus respetivos ligantes diminui a velocidade dos leucócitos, o que aumenta a probabilidade de ativação dessas células pelos quimioatraentes presentes na camada endotelial e conseqüente adesão via integrinas (PETRI et al., 2008).

- Integrinas – são proteínas heterodiméricas contendo duas cadeias $\alpha \in \beta$. São receptores que permitem a interação intercelular e de células com componentes da matriz extracelular. Uma das maneiras de categorizar essas proteínas é separá-las de acordo com o tipo de cadeia β . As β 1-integrinas são expressas em diferentes células e estão envolvidas na interação célula-matriz extracelular (colágeno e fibronectina, por exemplo). Já as β2-integrinas são expressas nos leucócitos e interagem com as moléculas de adesão intercelular (ICAMs) expressas no endotélio. A interação entre as β2-integrinas e as ICAMs permite a adesão firme dos leucócitos ao endotélio.

Durante o processo inflamatório, há indução de moléculas de adesão no endotélio e leucócitos, além da produção e liberação de quimioatraentes por macrófagos e outros tipos celulares, culminando na passagem de grande número de leucócitos, inicialmente neutrófilos e depois monócitos, da circulação sanguínea para os tecidos. A migração de leucócitos do sangue para os tecidos não ocorre da mesma maneira nos diferentes tecidos do organismo. Por exemplo, sabe-se que nos pulmões o processo independe do rolamento inicial, enquanto que em outros tecidos como mesentério essa etapa é fundamental. Além disso, diferentes agentes indutores de migração (quimiocinas ou compostos liberados após a lise celular) podem desencadear a migração de leucócitos por mecanismos distintos. Por exemplo, a migração de leucócitos para os tecidos pode ocorrer predominantemente pela via transcelular (passando pelo interior das células endoteliais) ou paracelular (via junções entre as células endoteliais) dependendo do tipo de quimiocina liberado no local do processo inflamatório (PETRI, PHILLIPSON et al., 2008).

O paradigma de migração leucocitária conforme apresentado na Figura 2 consiste de uma etapa incial, nas quais os leucócitos rolam sobre a superfície endotelial (processo dependente da interação de selectinas e β2-integrinas com seus ligantes), são ativados por citocinas e outros mediadores "apresentados" pelas células endoteliais, aderem firmemente ao endotélio e, posteriomente, realizam a migração transendotelial.

			, Fluxo do sangu	he
		X + + + + + + +	*	
Contato inicial e rolamento	Ativezão			
	Alivação	Adesao firme	Transmigração	
Ligantes de selectina e α4 integrina	Receptores acoplados a proteína G	Adesao firme Integrinas (β2- e α4-integrina)	Transmigração Integrinas	Leucócito

Figura 2. Esquema geral da interação entre endotélio e neutrófilos durante o recrutamento desses para o foco inflamatório. Abreviaturas: moléculas de adesão celular (CAMs), moléculas de adesão intercelular (ICAM), moléculas de adesão celular vascular (VCAM), molécula de adesão juncional (JAM), molécula de adesão específica de células endoteliais (ESAM).

Devido ao fato das moléculas de adesão (selectinas, integrinas e ICAMs) serem essenciais ao processo de migração leucocitária, elas têm sido amplamente estudadas como possíveis alvos para o desenvolvimento de novas classes de drogas antiinflamatórias (MACKAY, 2008).

1.2.2 Mecanismos efetores dos neutrófilos

Neutrófilos destroem microrganismos basicamente através de dois mecanismos: 1) retirando fatores essenciais ao crescimento das bactérias (ação de enzimas como a lactoferrina, lipocalina-2 e transcobalamina) e 2) liberando compostos tóxicos às mesmas (produção de espécies reativas, liberação de proteases e outras enzimas com ação microbicida) (SEGAL, 2005; NATHAN, 2006). Além disso, os neutrófilos induzem a migração de outras células para o foco inflamatório (monócitos, células apresentadoras de antígenos (APC) e linfócitos), que contribuem para a destruição do microrganismo (NATHAN, 2006).

O complexo NADPH oxidase apresenta participação essencial no *Killling* de microrganismos. O complexo enzimático responsável pela produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) é mantido inativo. Quando o neutrófilo é ativado, os componentes citossólicos ($p40^{phox}$, $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ e Rac) e de membrana (Rap1A e citocromo b₅₅₈, complexo $p22^{phox}$ e gp91^{phox}) desse sistema são reorganizados (Figura 3). Com a ativação da célula, que pode ocorrer por ação de diferentes estímulos (por exemplo, acetato de forbol miristato (PMA), formil metilleucil-fenilalanina (fMLP), leucotrieno-B4 ou partículas opsonizadas) e envolver diferentes vias de sinalização, como a da proteína G (fMLP) ou a ativação direta da proteína quinase C (PMA), as proteínas $p47^{phox}$ e $p67^{phox}$ são fosforiladas pela proteína quinase C (PKC) e as subunidades citossólicas migram para a membrana, onde se associam ao citocromo b₅₅₈ (BABIOR, 1999).

A associação do citocromo b₅₅₈ com os componentes citossólicos torna a oxidase ativa, que catalisa a transferência de elétrons do NADPH para o oxigênio molecular gerando superóxido (BABIOR, 1999; SHEPPARD et al., 2005) (Figura 3).



Figura 3. Acoplamento dos componentes do sistema NADPH oxidase após ativação dos neutrófilos. Fonte: modificado de BABIOR, 1999.
O superóxido formado é rapidamente convertido espontaneamente ou via ação da superoxido dismutase (SOD) e mieloperoxidase (principalmente, no caso dos neutrófilos) a espécies reativas de oxigênio (ERO) mais tóxicas tais como: ácido hipocloroso (HOCL) e radical hidroxila (OH⁻) (SEGAL, 2005).

Neutrófilos também possuem a isoforma induzível da enzima óxido nítrico sintase (iNOS ou NOS 2), que, após o processo de ativação da célula por, por exemplo, intérferon-γ (IFN-γ), lipopolissacarídeo (LPS) ou fator de necrose tumoral (TNF), converte L-arginina a L-citrulina e óxido nítrico (NO). O NO é um dos principais mecanismos antimicrobianos de macrófagos e neutrófilos. Essa molécula reage com ERO (Figura 4) dando origem a compostos extremamente tóxicos, como o peroxinitrito (ONOO-), que oxidam grupamentos SH, lipídeos e DNA e, dessa forma, exercem efeito tóxico (BECKMAN et al., 1990; MACMICKING et al., 1997).

O óxido nítrico pode afetar diversas respostas celulares e sua produção por fagócitos tem função importante no processo de *killing* de microrganismos, na destruição de células tumorais e no controle da proliferação de linfócitos durante a resposta imune (MACMICKING, XIE et al., 1997). Vale ressaltar que, assim como as ERO (particularmente, o peróxido de hidrogênio), o NO atua como sinalizador intercelular, regulando a expressão de receptores de membrana, proteínas ligadoras de GTP, canais iônicos, fatores de transcrição e tirosinas quinases (FIALKOW et al., 2007).



Figura 4. Possíveis espécies oxidantes produzidas pelos neutrófilos humanos após ativação do sistema NADPH oxidase (HAMPTON et al., 1998). Abreviaturas: mieloperoxidase (MPO), superóxio dismutase (SOD).

Neutrófilos foram por muito tempo considerados células sem atividade transcricional e com reduzida capacidade de síntese de proteínas. Acreditava-se que apenas participavam do processo inflamatório realizando fagocitose e destruição de microrganismos via produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e desgranulação. Entretanto, essa visão reducionista da ação dos neutrófilos no processo inflamatório mudou com a demonstração de que os mesmos produzem diversas citocinas. Atualmente sabe-se que, durante a inflamação, os fagócitos migram para o local inflamado, produzem e secretam diversas citocinas e mediadores lipídicos que modulam sua função e a de outras células como linfócitos e células endoteliais (CASSATELLA, 1995).

Apesar de os neutrófilos produzirem menos citocina por célula do que os macrófagos, se considerarmos o processo inflamatórios agudo, no qual há predomínio inicial de neutrófilos, essas células constituem fonte importante de citocinas. Os neutrófilos produzem diversas citocinas cuja principal ação é recrutar leucócitos para o foco inflamatório (quimiocinas) como interleucina-8 (IL-8 ou CXCL8), proteína inflamatória de macrófagos (MIP-2 α ou CXCL2) e citocina indutora de quimiotaxia de neutrófilos (CINC ou CXCL3), que recrutam,

principalmente, neutrófilos; proteína de 10 KDa induzida por intérferon (IP10 ou CXCL10), monocina induzida por intérferon (MIG ou CXCL9) e quimioatraente de células T induzido por intérferon (ITAC ou CXCL11), cujo principal alvo são os linfócitos Th1; e as MIPs-1 α (também conhecida como CCL3) e -1 β (CCL4), que têm ação mais ampla (eosinófilos, basófilos e monócitos) (SCAPINI *et al.*, 2000). Além disso, essas células também constituem fonte importante de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina-1 β (IL-1 β) e antiinflamatórias como antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra), fator de crescimento tumoral- β (TGF- β) e interleucina-10 (IL-10) (CASSATELLA, 1995).

Macrófagos е neutrófilos reconhecem estruturas presentes em microrganismos, denominadas PAMP (padrões moleculares associados à patógenos). Dentre os PAMP vale ressaltar o lipopolissacarídeo (LPS). Esse componente da parede celular de bactérias gram-negativas interage com receptores presentes na membrana celular de neutrófilos e macrófagos (CD14 e receptor Toll like-4/MD-2), que ativam diversas vias de sinalização intracelular e fatores de transcrição como o fator nuclear kappa B (NFkB), culminando em intensa produção e liberação de citocinas (PALSSON-MCDERMOTT e O'NEILL, 2004). O fator de transcrição NFkB modula a expressão de diversas proteínas envolvidas no processo inflamatório (Tabela 2).

Tabela 2 - Genes regulados pelo NFkB. Fonte: modificado de Neurath et al., 1998.

Citocinas e fatores de crescimento	TNF-α, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, intérferon-					
	β, GM-CSF e G-CSF					
Moléculas de adesão	ELAM, VCAM-1					
	ICAM-1, E-selectina					
Fatores de transcrição	c-rel					
	c-myc					
Outros	iNOS, transportador de peptídeos TAP-					
	1, cadeias α e β do TCR					

Abreviaturas: fator estimulator de colônias grânulo- monocíticas (GM-CSF), fator estimulator de colônias granulocíticas (G-CSF), forma induzida da óxido nítrico sintetase, (iNOS), molécula de adesão intercelular (ICAM), molécula endotelial de adesão leucocitária (ELAM), molécula de adesão vascular (VCAM), receptor de linfócitos T (TCR).

1.3 Efeitos dos AGCC sobre o processo inflamatório

O interesse inicial a respeito do efeito dos AGCC no processo inflamatório surgiu do fato de que a ingestão de fibras reduz a incidência de doenças inflamatórias no TGI. Posteriormente, mostrou-se que esse efeito benéfico se devia aos AGCC gerados no processo de fermentação das fibras e que o uso de enemas ou outras formas farmacêuticas contendo esses ácidos graxos pode ser benéfico em condições inflamatórias do TGI (WONG et al., 2006). Além dos trabalhos que focavam no efeito dos AGCC como agentes antiinflamatórios, outros grupos sugeriram que esses ácidos graxos, os quais são produzidos em altas quantidades por bactérias anaeróbias causadoras de periodontites (por exemplo, bactéria *Porphyromonas gingivalis*) e iniciariam e ou intensificariam o processo inflamatório na cavidade oral (NIEDERMAN, BUYLE-BODIN et al., 1997; NIEDERMAN, ZHANG et al., 1997).

A maior parte dos estudos realizados com AGCC utilizou células isoladas para avaliar a ação desses compostos (SEGAIN, RAINGEARD DE LA BLETIERE et al., 2000; MILLARD, MERTES et al., 2002; RODRIGUEZ-CABEZAS et al., 2002; HUUSKONEN et al., 2004; WEBER e KERR, 2006). Os AGCC atuam sobre diferentes tipos celulares envolvidos no processo inflamatório e resposta imune e podem ser moduladores importantes do processo *in vivo*, tendo ações pró(NIEDERMAN, BUYLE-BODIN et al., 1997; BOCKER et al., 2003) e antiinflamatórias (RODRIGUEZ-CABEZAS, GALVEZ et al., 2002; HUUSKONEN, SUURONEN et al., 2004; DIANZANI et al., 2006), dependendo da função e tipo celular analisados.

Com relação aos neutrófilos, os AGCC causam: alteração do pH intracelular, mobilização de cálcio intracelular, produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, fagocitose e killing de microrganismos e distribuição de proteínas do citoesqueleto (EFTIMIADI et al., 1987; ROTSTEIN et al., 1989; TONETTI et al., 1991; BRUNKHORST et al., 1992; ROTSTEIN, 1993; NAKAO et al., 1998). A ação dos AGCC sobre fagócitos é até certo ponto paradoxal uma vez que alguns parâmetros funcionais são inibidos como, a desgranulação (EFTIMIADI, BUZZI et al., 1987) e a capacidade fagocítica e de destruição de bactérias Escherichia coli e Staphylococcus aureus (EFTIMIADI, BUZZI et al., 1987; ROTSTEIN, VITTORINI et al., 1989), enguanto outros, como alteração no estado da actina, mobilização de cálcio e mudanças no metabolismo de oxigênio, são ativados (EFTIMIADI, BUZZI et al., 1987; TONETTI, CAVALLERO et al., 1991; BRUNKHORST, KRAUS et al., 1992; NAKAO, MORIYA et al., 1998). Esse paradoxo pode ser explicado em parte devido ao fato dos AGCC atuarem sobre essas células por diferentes mecanismos e de diferenças técnicas entre os estudos. Por exemplo, enquanto em alguns trabalhos os AGCC são utilizados isoladadamente, em outros, o sobrenandante de culturas de bactérias anaeróbias, que contém os diferentes AGCC, são empregadas.

O butirato é o ácido graxo de cadeia curta mais estudado. Esse AGCC altera a produção e liberação de citocinas pró- e antiinflamatórias, regula o processo de apoptose e diferenciação, maturação e função de leucócitos, particularmente, dos monócitos/macrófagos (CHAKRAVORTTY et al., 2000; SAEMANN et al., 2000; PARK et al., 2007). Esse AGCC inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-12) e óxido nítrico e aumenta a liberação de IL-10 (citocina com ações antiinflamatórias) por macrófagos (CHAKRAVORTTY, KOIDE et al., 2000; SAEMANN, BOHMIG et al., 2000; PARK, LEE et al., 2007). Um dos mecanismos envolvidos nessas ações parece ser a

40

inibição da ativação do fator de transcrição NFκB (CHAKRAVORTTY, KOIDE et al., 2000; PARK, LEE et al., 2007).

Recentemente, em trabalho realizado com monócitos isolados do sangue de humanos e tratados com acetato, propionato ou butirato *in vitro*, mostrou-se que esses AGCC são capazes de estimulam, tanto na presença quanto na ausência de LPS, a produção de prostaglandina E2 (PGE2), sem qualquer efeito sobre a produção de outros mediadores lipídicos como prostaciclina I2 (PGI2), tromboxano B2 (TXB2) e leucotrieno B4 (LTB4) (COX et al., 2009). Esse efeito foi abolido pela toxina pertussis (inibidor de proteína Gi) e inibidor da ciclooxigenase 1 (COX-1), evidenciando que outros mecanismos participam na ação dos AGCC em leucócitos.

Os AGCC modificam diferentes aspectos funcionais de linfócitos: proliferação de células T: o butirato inibe a proliferação de linfócitos em resposta a diferentes estímulos, como a concanavalina- A e anticorpo monoclonal anti-CD3 (BOHMIG, KRIEGER et al., 1999; CAVAGLIERI et al., 2003); produção de citocinas: o butirato *in vitro* reduz a liberação de interleucina-2 (citocina que estimula a proliferação, diferenciação e sobrevivência de linfócitos T) e intérferon-γ (IFN-γ), que tem ações imunomodulatórias, sendo, particularmente, importante na resposta à infecção viral, células tumorais e em condições auto-imunes. Por outro lado, o butirato apresenta efeitos opostos sobre a produção de citocinas antiinflamatórias como interleucina-10 (IL-10) por linfócitos (CAVAGLIERI, NISHIYAMA et al., 2003).

Em neutrófilos, o efeito dos AGCC sobre a produção de mediadores inflamatórios foi investigado apenas em um estudo (TEDELIND et al., 2007). Os autores mostraram que não apenas butirato, mas também acetato e propionato inibem a produção de TNF- α por neutrófilos. Contudo, os mecanismos envolvidos nesse efeito não foram avaliados em neutrófilos (TEDELIND, WESTBERG et al., 2007).

Além de afetarem a produção de mediadores inflamatórios por neutrófilos, os AGCC também podem modificar o recrutamento dessas células para o processo inflamatório uma vez que alteram a expressão de moléculas de adesão expressas nas células endoteliais (ZAPOLSKA-DOWNAR, SIENNICKA et al., 2004; MILLER et al., 2005) e induzem *in vitro* a quimiotaxia de neutrófilos (LE POUL *et al.*, 2003). Os AGCC têm função importante no recrutamento de neutrófilos para o TGI durante doença inflamatória intestinal. A ativação do receptor de membrana GPR43, o qual será discutido no próximo tópico, pelos AGCC também pode regular o recrutamento e resolução do processo inflamatório em diferentes condições como artrite reumatóide e asma (MASLOWSKI et al., 2009; SINA et al., 2009).

1.3.1 Mecanismos de ação dos AGCC em leucócitos

Dentre os mecanismos propostos para as ações dos AGCC em leucócitos está a inibição de histonas desacetilases (HDAC) e a ativação do receptor de membrana GPR43.

O DNA nuclear encontra-se envolto por uma estrutura formada por proteínas denominadas histonas (duas moléculas de cada subunidade H2A, H2B, H3 e H4). Uma das estratégias utilizadas para modificar a expressão gênica em células eucarióticas envolve alteração do estado das histonas, sendo que a acetilação e a desacetilação dessas proteínas são um dos mecanismos importantes nesse controle.

No núcleo, existem enzimas denominadas histonas acetilases (acetila as histonas) e histonas desacetilases (retira o grupamento acetil das histonas) que regulam o estado das histonas com relação à acetilação. A acetilação das histonas em geral está relacionada com aumento da expressão gênica, contudo, a hiperacetilação também pode levar à supressão da expressão de certos genes (KIM et al., 2001; TONG et al., 2004). Isso em parte é devido ao fato de que proteínas não-histonas, particularmente, fatores de transcrição, também são reversivelmente acetilados, processo esse que pode modular as suas funções (KIM, KWON et al., 2001; YU et al., 2002; TONG, YIN et al., 2004). Um dos fatores de transcrição cuja atividade é em parte regulada pela acetilação é o NFκB que conforme descrito anteriormente possui participação destacada no processo inflamatório. A acetilação desse fator de transcrição regula diversas propriedades

do mesmo, como a capacidade de ligação a seu elemento responsivo no DNA e de ativar a transcrição de genes, além de modular a ligação do NFκB ao IκBα e com isso a sua inativação (CHEN et al., 2003; KIERNAN et al., 2003).

Os AGCC, principalmente butirato, mas também propionato inibem as histonas desacetilases (HDAC) e com isso aumentam a acetilação de histonas (BENJAMIN e JOST, 2001; HINNEBUSCH et al., 2002). Além dessa ação, diversos grupos (SEGAIN, RAINGEARD DE LA BLETIERE et al., 2000; ZAPOLSKA-DOWNAR, SIENNICKA et al., 2004; PARK, LEE et al., 2007; STEMPELJ et al., 2007) mostraram que ambos ácidos graxos modulam a atividade do fator NFκB, o que pode decorrer ou não da inibição de HDAC.

Outro mecanismo pelo gual os AGCC podem atuar em leucócitos é via ativação do receptor de membrana GPR43. Esse receptor pertence a família de receptores acoplados a proteína G inicialmente descrita por Swazdargo et al. (1997). Dessa família também fazem parte os receptores GPR 40, 41 e 42 (SAWZDARGO et al., 1997). O receptor GPR 43 é expresso em leucócitos, principalmente em neutrófilos e em menor abundância em células mononucleares do sangue, monócitos e linfócitos (BROWN et al., 2003; LE POUL, LOISON et al., 2003; NILSSON et al., 2003), sendo ativado pelos AGCC (BROWN, GOLDSWORTHY et al., 2003; LE POUL, LOISON et al., 2005).

O GPR43 está acoplado, não apenas a proteína Gi/o, mas também a proteína Gq. A ativação da proteína Gi/o leva à diminuição das concentrações de AMP cíclico por inibição da adenilato ciclase (algumas isoformas não são inibidas) e ativação dos GIRK (canais de potássio regulados pela proteína G). A proteína Gq ativa a fosfolipase C, levando à formação do inositol trisfosfato e diacilglicerol, os quais aumentam as concentrações intracelulares de cálcio e ativam a proteína quinase C, respectivamente (BROWN, GOLDSWORTHY et al., 2003; LE POUL, LOISON et al., 2003; HONG, NISHIMURA et al., 2005). Le Poul et al. (2003) sugerem que a ativação do GPR43 é responsável pelas ações dos AGCC sobre os neutrófilos (quimiotaxia) e que esse receptor apresenta função similar à do

receptor de fMLP no recrutamento de leucócitos para o local da infecção e ativação dos mesmos.

A farmacologia do GPR43 e sua distribuição específica em neutrófilos sugerem que este deve atuar no início do processo inflamatório, com possível envolvimento em doenças inflamatórias, principalmente do TGI (LE POUL, LOISON et al., 2003; SINA, GAVRILOVA et al., 2009).

1.4 Justificativa para a realização do estudo

Os AGCC apresentam importantes ações imunorregulatórias, as quais podem ter implicações fisiológicas, particularmente, no TGI, e em condições patológicas (infecções por bactérias anaeróbias). Contudo, não há trabalhos conclusivos sobre o efeito desses ácidos graxos em neutrófilos e os mecanismos envolvidos. A elucidação dos mecanismos de ação dos AGCC sobre neutrófilos, particularmente na produção de mediadores inflamatórios e quimiotaxia, pode ser a base para o entendimento da ação desses compostos em processos patológicos e o passo inicial no desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento de doenças inflamatórias.

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- avaliar *in vitro* o efeito dos AGCC (acetato, propionato e butirato) sobre a produção de mediadores inflamatórios por neutrófilos (ERO, citocinas (TNF- α , IL-1 β e CINC-2 $\alpha\beta$) e óxido nítrico), capacidade de fagocitose e destruição de *C.albicans*;

- analisar os efeitos dos AGCC sobre o recrutamento de neutrófilos;

- estudar os mecanismos envolvidos como, modulação da ativação do fator de transcrição NFκB, inibição de histonas desacetilases e a participação do receptor GPR43 no efeito quimiotático desses compostos sobre neutrófilos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparo das soluções de ácidos graxos de cadeia curta

Os ácidos graxos de cadeia curta, acetato, propionato e butirato, obtidos da Sigma Chemical Co (St Louis, MO, EUA), foram diluídos em solução tamponada de fosfato (PBS). Após a diluição, o pH das soluções foi ajustado para 7,4 com solução 10 N de hidróxido de sódio. As soluções foram esterilizadas por filtração (filtros de 0,22 µm).

3.2 Obtenção de neutrófilos

A maior parte dos experimentos foi realizada com neutrófilos obtidos de ratos após adminitração de glicogênio (ítem 3.2.1). Entretanto, no caso dos experimentos de quimiotaxia (técnicas da câmara EzTaxiscan® e o sistema *transwell*), utilizou-se neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos, conforme descrito na seção 3.2.2, uma vez que essas técnicas não apresentaram resultados satisfatórios quando realizadas com neutrófilos de ratos.

3.2.1 Isolamento de neutrófilos de rato após administração i.p. de solução de glicogênio de ostra

Ratos Wistar machos pesando 180 ± 20 gramas foram obtidos do Biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os ratos foram mantidos a temperatura de 23 °C, sob ciclo claro: escuro de 12 horas e tiveram acesso *ad libitum* a ração e água.

Para obtenção dos neutrófilos, injetou-se, intraperitonealmente, solução de glicogênio de ostra (Sigma, Tipo II) a 1% em PBS e, após 4 horas, os ratos foram sacrificados por decapitação. A coleta das células foi realizada lavando-se a cavidade peritoneal com cerca de 40 mL de PBS estéril. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas e mantidas em solução hipotônica de cloreto de amônio (lise das hemáceas) por 10 minutos a 4 °C. Após essa etapa, as células foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos a 4 °C. Após essa etapa, as células foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos a 4 °C. Após essa etapa, as células foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos a 4 °C, lavadas com PBS e, posteriormente, ressuspendidas em meio RPMI 1640 enriquecido com 10% de soro bovino fetal, glutamina 2 mM, tamponado com bicarbonato de

sódio 24 mM, HEPES 20 mM e adicionado de antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 μg/mL de estreptomicina). A contagem celular foi realizada em câmara de Neubauer utilizando líquido de Turk como diluente.

Utilizando o procedimento acima descrito, obtivemos preparações ricas em neutrófilos (>95% das células) conforme analisado por microscopia convencional (Figura 5).



Figura 5. Foto das células coletadas do peritôneo 4 horas após administração de glicogênio de ostra (aumento de 400x).

Todos os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (protocolo nº 51).

3.2.2 Isolamento de neutrófilos da medula óssea de camundongos

Camundongos C57/Black machos foram obtidos do Biotério do Babraham Institute (Universidade de Cambridge, Cambridge, UK). Os camundongos foram mantidos a temperatura de 23 °C, sob ciclo claro: escuro de 12 horas, tiveram livre acesso a ração e água. O sacrifício dos animais foi realizado em câmara de CO₂ de acordo com procedimentos aprovados pela Comissão de Ética do Babraham Institute (Cambridge, UK).

Após o sacrifício, coletou-se os ossos fêmur e tíbia dos animais. Os músculos e epífises dos ossos foram retirados e a cavidade óssea foi lavada com 1 mL de solução tamponada de Hanks (HBSS) sem cálcio ou magnésio (suplementado com 0,05% de BSA livre de ácido graxos e HEPES 15 mM, pH 7,2). A medula óssea foi homogeneizada (descartou-se grumos pesentes na preparação) e centrifugada (1200 rpm, 4 °C, 10 minutos). No caso dos experimentos com *transwell*, as células foram ressuspensas em tampão HBSS com cálcio e magnésio e utilizadas diretamente conforme procedimento descrito no ítem 3.15.1. No caso dos experimentos de quimiotaxia com a câmara EzTaxiscan® (ítem 3.15.2), procedeu-se a purificação dos neutrófilos, conforme descrito abaixo.

As células foram ressuspendidas em 3 mL de HBSS sem cálcio ou magnésio, aplicadas em gradiente descontínuo de Percoll® (Sigma-Aldrich Chemical Co (St Louis, MO, EUA)) (60%/70% percoll) e centrifugadas a 2400 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Os neutrófilos foram coletados da interface entre os gradientes 60% e 70% e diluídos em tampão HBSS sem cálcio ou magnésio. As células foram lavadas 3 vezes a 1200 rpm por 10 minutos e 4 °C com tampão HBSS sem cálcio ou magnésio. Após a última lavagem, as células foram contadas em câmara de Neubauer, centrifugadas (1200 rpm, 10 minutos, 4 °C) e ressuspensas em HBSS com cálcio e magnésio na concentração de 5 x 10⁵ células/mL. A pureza de cada preparação foi obtida após análise do citocentrifugado corado da amostra e foi em torno de 60-80%. As células obtidas por esse procedimento foram utilizadas para o ensaio de quimiotaxia na câmara EzTaxiscan® (seção 3.15.2).

3.3 Teste de citotoxicidade

Antes de iniciar os testes funcionais com os neutrófilos, determinou-se as concentrações não tóxicas dos AGCC. Os ensaios de determinação da integridade de membrana e fragmentação de DNA foram realizados conforme previamente descrito na literatura (NICOLETTI et al., 1991) e em artigos do grupo (CURY-BOAVENTURA et al., 2006; CURY-BOAVENTURA et al., 2008).

Neutrófilos obtidos de ratos (seção 3.2) foram colocados (6 x 10⁵ células/poço) em placas de 24 *wells* e tratados com diferentes concentrações de acetato (Ac), propionato (Pr) e butirato (Bt) por 4 ou 18 horas. Após o tratamento, as células foram utilizadas para a avaliação de integridade de membrana e fragmentação de DNA no citômetro de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson, EUA).

3.3.1 Determinação da viabilidade celular

A avaliação da integridade de membrana foi realizada utilizando iodeto de propídio (IP). Este é um composto fluorescente altamente solúvel em água e que não atravessa membranas intactas, de modo que apenas nas células com perda da integridade de membrana, o IP se intercala entre as bases do DNA. A fluorescência foi detectada no canal FL2. Foram adquiridos 10.000 eventos por amostra e a análise foi, posteriormente, realizada utilizando o programa Cell Quest (Becton Dickinson, EUA).

Para a análise de integridade de membrana (viabilidade celular), as células foram centrifugadas e o *pellet* foi ressuspenso em 500 μ L de PBS, ao qual se adicionou 50 μ L de solução de iodeto de propídio (IP) (20 μ g/mL). As células foram imediatamente analisadas no citômetro de fluxo.

3.3.2 Determinação da fragmentação de DNA

Para a análise da fragmentação de DNA, as células foram permeabilizadas com Triton X-100, permitindo a entrada do iodeto de propídio (IP). Dependendo do estado do DNA, fragmentado ou não, há maior ou menor incorporação do IP a este. A fluorescência foi detectada no canal FL2. Foram adquiridos 10.000

eventos por amostra e a análise foi, posteriormente, realizada utilizando o programa Cell Quest (BD Bioscience).

As células foram centrifugadas e o *pellet* foi ressuspenso em 300 μ L de solução hipotônica contendo 50 μ g/mL de IP, 0,1% de citrato de sódio e 0,1% de Triton X-100. Os tubos foram cobertos com papel alumínio e incubados por 1 hora a temperatura ambiente. Após esse período, as amostras foram analisadas no citômetro.

3.4 Determinação da produção de ERO por neutrófilos

A análise do efeito dos AGCC sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) por neutrófilos foi realizada por três técnicas: 1) técnica do vermelho de fenol, que detecta predominantemente peróxido de hidrogênio (intrae extracelular); 2) técnica de quimioluminescência amplificada pela lucigenina, utilizada na análise da produção extracelular de superóxido e 3) determinação do ácido hipocloroso.

3.4.1 Determinação da produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

A determinação do peróxido de hidrogênio foi realizada segundo técnica previamente descrita (PICK e KEISARI, 1980). O ensaio se baseia na oxidação do vemelho de fenol pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) mediada pela peroxidase. A reação leva à formação de um produto que apresenta absorbância a 620 nm.

A técnica utilizando o vermelho de fenol permite a detecção das ERO intrae extracelulares. Resumidamente, placas de 96 *wells* foram preparadas contendo 4 x 10^5 células por poço. Os neutrófilos foram incubados a 37 °C em PBS suplementado com cloreto de cálcio (1 mM), cloreto de magnésio (1,5 mM), glicose (10 mM), vermelho de fenol (0,28 mM) e peroxidase de raiz forte (*horseradish peroxidase*) tipo II (1U/mL) por 30 minutos. Após esse período, a reação foi interrompida pela adição de 10 µL de solução de hidróxido de sódio 1N e a concentração de H₂O₂ foi determinada por leitura da densidade ótica a 620 nm em espectrofotômetro (Spectra MAX plus, Molecular Devices, CA, EUA). A quantificação foi realizada utilizando curva padrão de H₂O₂ (5- 80 nM). A avaliação da produção de H_2O_2 por neutrófilos de rato foi realizada na presença ou não de dois estímulos: PMA (54 ng/mL) e fMLP (10⁻⁸ M). Foram utilizados controles negativos contendo todos os componentes com exceção das células, para avaliar se havia alguma interferência nas determinações.

3.4.2 Determinação de superóxido (O₂) pela técnica de qumioluminescência amplificada pela lucigenina

A sonda lucigenina é específica para avaliação da cinética de produção de superóxido (GYLLENHAMMAR, 1987; HATANAKA et al., 2006). Essa técnica se baseia na redução da sonda, que ocorre na presença de superóxido, e formação de um composto excitado (acridona), o qual ao retornar ao estado fundamental emite luminescência.

Resumidamente, placas opacas (brancas) de 96 *wells* foram preparadas contendo 4 x 10^5 células em 250 µL de PBS suplementado com CaCl₂ (1 mM), MgCl₂ (1,5 mM) e glicose (10 mM). A produção de superóxido foi monitorada, após a adição de lucigenina (1 mM), no luminômetro (EG&G Berthold Microplate Luminometer, Berthold Technologies, Germany), por 60 minutos. Foram utilizados controles negativos contendo todos os componentes exceto as células, para avaliar se havia alguma interferência nas determinações. A análise dos resultados foi realizada utilizando a integral das curvas obtidas ao longo do tempo para cada uma das amostras.

3.4.3 Determinação da produção de ácido hipocloroso (HOCI)

A produção de ácido hipocloroso (HOCI) por neutrófilos foi realizada de acordo com técnica previamente descrita na literatura (DYPBUKT et al., 2005). Resumidamente, o HOCI formado reage com taurina formando taurina cloroamina. Em meio ácido, na presença de iodeto, a taurina cloroamina é oxidada, havendo a formação de ácido hipoiodoso (HOI), o qual oxida o cromóforo 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (TMB), gerando produto de coloração azulada.

Os neutrófilos (2 x 10⁶ células) foram incubados a 37 °C em PBS suplementado com cloreto de cálcio (1 mM), cloreto de magnésio (1,5 mM),

glicose (10 mM) e 5 mM de taurina na presença dos AGCC. As células foram estimuladas com PMA (54 ng/mL). Após 30 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 20 µg/mL de catalase e os tubos foram mantidos por pelo menos 10 minutos no gelo. As células foram precipitadas por centrifugação (5 minutos a 12.000 rpm). Ao sobrenadante (200 uL) adicionou-se 50 uL de solução 2 mM de TMB, 100 µM de iodeto de sódio e 10% de dimetilformamida em 400 mM de tampão acetato (pH 5,4). Após 5 minutos, a concentração de HOCI foi determinada por leitura de densidade ótica em espectrofotômetro a 650 nm (Spectra MAX plus, Molecular Devices, CA, EUA). A quantificação foi realizada utilizando curva padrão de ácido hipocloroso (1 – 40 µM).

3.5 Avaliação da fosforilação de p47^{phox}

A análise do efeito dos AGCC sobre a fosforilação da proteína p47^{phox} foi realizada utilizando anticorpo anti-p47 para a imunoprecipitação e quantificação pela técnica de *Western Blotting* com anticorpo anti-fosfoserina.

3.5.1 Extração e quantificação de proteínas

Neutrófilos (1 x 10^7 células) foram incubados na presenca de acetato (25 mM), propionato (12 mM) ou butirato (12 mM) e PMA (54 ng/mL) por 30 minutos. Após essa etapa, as células foram sonicadas em tampão de extração (Trizma 100 mM, pH 7.5; EDTA 10 mM; NaF 100 mM; pirofosfato de sódio 10 mM; ortovanadato de sódio 10 mM; fluoreto de fenilmetanossulfonil (PMSF) 2 mM; aprotinina 0,01 mg/mL) a 4 °C por 30 segundos. Triton X-100 foi adicionado na concentração final de 1%. As amostras foram incubadas por 30 minutos a 4 °C. Posteriormente, foram centrifugadas a 12000 rpm por 20 minutos a 4 °C. Alíquotas (10 μ L) do sobrenandante foram removidas para determinação de proteínas (BRADFORD, 1976).

3.5.2 Imunoprecipitação

Quantidades iguais de proteína de cada amostra (150 μ g) foram incubadas com anticorpo anti-p47^{phox} (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Ca, USA) na diluição 1:

300 durante uma noite à 4 °C. Posteriormente, para a imunopreciptação, adicionou-se proteína A-Sepharose (Sigma-Aldrich Co. St Louis, MO, EUA) por 4 horas a 4 °C. As amostras foram então submetidas à eletroforese e *imunoblotting* com anticorpo anti-fosfoserina conforme previamente descrito (TOWBIN et al., 1979).

3.5.3 Eletroforese em gel de poliacriamida (SDS-PAGE) e imunoblotting

Após extração e quantificação, 30 µg de proteína foram submetidas à eletroforese em gel de acrilamida a 10% utilizando tampão de corrida (tris base 50 mM; glicina 0,38 M; EDTA 1,8 mM; SDS 0,1%). As proteínas fracionadas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (BioRad Laboratories, Hercules, CA, EUA) utilizando tampão de transferência (Trisma base 25 mM; glicina 192 mM; metanol 20%; SDS 0,02%) e tensão de 100V (120 minutos).

A membrana foi bloqueada com leite desnatado a 5% em solução basal (Trizma 10 mM, pH 7.5; NaCl 150 mM; Tween 20 0,05%), a temperatura ambiente, por 2 horas. As membranas foram lavadas três vezes por 10 minutos cada com solução basal e incubadas com anticorpo anti-fosfoserina (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Ca, USA) na diluição 1: 20.000 em solução basal contendo 3% de leite desnatado a temperatura ambiente por 3 horas. Após esse período, as membranas foram lavadas novamente (três vezes de 10 minutos cada) e incubadas com anticorpo anti-IgG conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich Co. St Louis, MO, EUA) na diluição de 1: 20.000 em solução basal contendo 1% de leite desnatado, a temperatura ambiente, por 1 hora. Após lavagem, as membranas foram incubadas com o substrato da peroxidase e intensificador de quimioluminescência (ECL Western Blotting System Kit, GE Health Care, Buckinghamshire, England) por 1 minuto e, imediatamente, exposto ao filme de raios-X.

Os filmes foram revelados e a intensidade das bandas foi avaliada por densitometria óptica utilizando o programa Image J (ImageJ 1.37, Wayne Rasband, NIH, USA, <u>http://rsb.info.nih.gov/ij/</u>).

3.6 Determinação das concentrações intracelulares de AMP cíclico

A concentração de AMP cíclico nos neutrófilos foi determinada usando kit de ensaio imuno enzimático direto competitivo de acordo com protocolo do fornecedor (Sigma Chemical Co St. Louis, MO, USA). Resumidamente, as células (3×10^6) foram incubadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal por 20 minutos a 37 °C. Às mesmas adicionou-se o inibidor de fosfodiesterase, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) na concentração final de 1 mM e os AGCC. Forscolina (10 µM), que é um ativador da adenilato ciclase, foi utilizada como controle positivo nos experimentos. Após incubação, as células foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. As células foram lisadas com 100 µL de HCl 0,1 M, sendo, posteriormente, centrifugadas a 1500 rpm a temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C até a realização do ensaio.

O ensaio (*EIA cyclic AMP kit*) utiliza anticorpos que se ligam ao AMP cíclico proveniente da amostra ou ao AMP cíclico fornecido pelo kit, o qual se encontra conjugado a fosfatase alcalina. Resumidamente, 100 µL das amostras ou padrões foram incubados na presenca de AMP ciclico ligado a fosfatase alcalina em placas contendo anticorpo anti-AMP cíclico durante 2 horas a temperatura ambiente. O excesso dos reagentes foi removido e o substrato (para-nitrofenil fosfato) foi adicionado aos poços. Após incubação por 1 hora, a reação foi interrompida e a placa foi lida em leitor de ELISA a 405 nm. A quantificação foi realizada utilizando curva padrão de AMP cíclico (0,78 – 200 pmol/mL).

3.7 Avaliação de fagocitose e da atividade fungicida in vitro

3.7.1 Obtenção de soro homólogo normal

O sangue foi coletado após decaptação dos ratos. Cerca de 30 minutos depois (tempo necessário à retração do coágulo), o sangue foi centrifugado (4 °C, 3.000 rpm, 15 minutos). O soro homólogo normal (SHN) foi separado, constituindo-se um *pool*, que foi dividido em alíquotas de 1 mL e congelado a -80 °C. Este *pool* foi utilizado para posterior opsonização da *Candida albicans*.

3.7.2 Preparo e opsonização da suspensão de Candida albicans

As leveduras — *Candida albicans* da linhagem ATCC 537y — foram obtidas após cultura de 24 horas em meio com 8% de ágar-Sabouraud (Difco, Lawrence, Kansas, EUA). Uma suspensão de leveduras foi preparada em 3 mL de tampão PBS, pH 7,4, estéril. Posteriormente, as leveduras foram contadas em câmara de Neubauer e sua viabilidade avaliada por meio de solução de azul de metileno (1%). Foram utilizadas somente suspensões de leveduras que apresentavam viabilidade acima de 95%.

Após contagem das leveduras, retirou-se alíquotas contendo o número de *Candida Albicans* necessárias para o ensaio e procedeu-se à opsonização das mesmas. A opsonização foi realizada pela adição de volume igual de SHN e incubação por 30 minutos a 37 °C sob agitação constante. Após esse período, a suspensão de leveduras foi centrifugada e lavada duas vezes com meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal e sem antibióticos.

3.7.3 Incubação dos neutrófilos com as leveduras

Suspensão de neutrófilos de rato, obtidos conforme descrito anteriormente, teve sua concentração ajustada para 1,0 x 10⁶ células/mL em meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino (10%) sem antibióticos. Às células adicionouse acetato, propionato e butirato nas concentrações de 25 mM, 12 mM e 12 mM, respectivamente. As leveduras previamente opsonizadas foram adicionadas de modo a manter uma razão de 10 leveduras para 1 neutrófilo. Os tubos foram incubados a 37 °C, sob agitação constante, durante 60 minutos.

Após esse período, lâminas foram preparadas por citocentrifugação (500 rpm, 5 minutos) de alíquotas com 200 µL das suspensões, imediatamente fixadas e coradas com May-Grunwald-Giemsa modificado (ROSENFELD, 1947)

Para avaliação da fagocitose, foram contadas, no mínimo, 200 células. A atividade fagocítica foi expressa como porcentagem de células que fagocitaram duas ou mais leveduras.

A atividade fungicida foi avaliada por meio da técnica de coloração conforme critério utilizado em trabalho prévio do grupo (SAMPAIO et al., 2001).

Nesta técnica, as leveduras vivas, intracelulares, coram-se em azul pelo corante de May-Grunwald-Giemsa, enquanto que as leveduras mortas não se coram. A atividade fungicida foi avaliada contando-se, ao menos, 200 neutrófilos que fagocitaram *Candida albicans*. Como o número de leveduras fagocitadas e mortas é variável, a atividade fungicida foi expressa por meio de escore, conforme descrito abaixo:

Resultado	Escore
№ de células sem <i>Candida albicans</i> morta	X 0
№ de células com 1 a 2 <i>Candida albicans</i> mortas	X 1
№ de células com 3 a 4 <i>Candida albicans</i> mortas	X 2
№ de células com mais de 4 <i>Candida albicans</i> mortas	X 3

3.8 Determinação da produção de citocinas

A concentração de citocinas no sobrenadante das culturas celulares foi avaliada pelo método de ELISA utilizando o Kit Duo Set (R&D System, Mineapolis, MN, USA).

Os neutrófilos de rato foram plaqueados na concentração de 2,5 x 10^6 células/mL a 37 °C, atmosfera com 5% de CO₂, em placas de cultura de 24 poços. As células foram mantidas em meio RPMI 1640 contendo soro fetal bovino (10%). A concentração de lipolissacarídeo (LPS) utilizada nos experimentos foi de 5 µg/mL e os períodos de coleta do sobrenadante foram 4 (TNF- α) ou 18 horas (CINC-2 α e IL-1 β). Concentrações não tóxicas de acetato (10 e 25 mM), propionato (0,4, 4, 8 e 12 mM) e butirato (0,4, 0,8, 1,6 e 3,2 mM) foram utilizadas nesses ensaios. Tricostatina A (TSA), potente inibidor de histonas desacetilases (YOSHIDA et al., 1995), foi utilizado na concentração de 25 nM. O sobrenadante das culturas foi obtido por centrifugação (1200 rpm, 10 minutos) e congelado (-80 °C) para posterior determinação das citocinas. A quantificação das citocinas foi realizada de acordo com procedimento descrito no kit.

3.9 Determinação de óxido nítrico (NO)

A determinação de nitrito presente no sobrenadante das culturas é uma forma indireta de avaliar a produção de óxido nítrico (NO) pelas células. O nitrito foi determinado utilizando o reagente de Griess (DING et al., 1988). Esse método se baseia na reação entre nitrito e o reagente de Griess (sulfanilamida e α -naftil-etilenodiamina) formando um azo composto que absorve luz no comprimento de 550 nm.

O sobrenadante das culturas de neutrófilos foi coletado e armazenado a -80 °C Para o ensaio de determinação de nitrito, 100 μ L do sobrenadante das culturas de 18 horas de neutrófilos foram transferidos para placa de 96 *wells* e, posteriormente, adicionou-se igual volume do reagente de Griess (solução de sulfanilamida a 1% e solução de α naftiletilenodiamina a 0,1%). A concentração de nitrito foi determinada por densidade ótica em espectrofotômetro a 550 nm (Spectra MAX plus). A quantificação foi realizada utilizando curva padrão de nitrito de sódio (5 – 80 μ M).

3.10 Determinação da atividade de HDAC

A atividade de histonas desacetilases (HDAC) obtidas de neutrófilos foi determinada na presença de diferentes concentrações de AGCC. Para isso, utilizou-se kit fornecido pela Cayman (Cayman Chemical Company, EUA). O princípio do ensaio é que a desacetilação do substrato pela HDAC libera composto fluorescente, o qual é mensurado no fluorímetro.

Resumidamente, extratos nucleares de neutrófilos foram obtidos conforme indicado pelo fornecedor. Amostras contendo 5 μ g de proteína foram incubadas na presença de substrato acetilado (25 a 200 μ M) em 160 μ L de tampão e os AGCC (10, 25 e 100 mM de acetato e 0,1, 1, 10, 25 e 100 mM de propionato ou butirato). A reação de desacetilação do substrato foi realizada a 37 °C durante 30 minutos e interrompida pela adição de 40 μ L do reagente *HDAC developer*. A desacetilação da lisina do substrato faz com que, após a adição do *HDAC developer*, ocorra a liberação de produto fluorescente, que foi mensurado usando o leitor de placa

Fluorocount[™] (Packard BioScience, USA) (excitação 360 nm e emissão 465 nm). A medida da atividade de HDAC obtida na ausência de ácidos graxos ou controle positivo (tricostina A, TSA) foi considerada como atividade máxima (100%) e os resultados foram expressos como percentagem da atividade máxima.

3.11 Avaliação da expressão gênica pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

A avaliação do conteúdo de RNA mensageiro (mRNA) dos componentes do complexo da NADPH oxidase ($p22^{phox}$ e $p47^{phox}$), de moléculas de adesão (L-selectina e $\beta2$ integrina), de citocinas (TNF- α , CINC-2 e IL-1 β) e da iNOS foi realizada pela técnica de PCR em tempo real (HIGUCHI et al., 1992) usando o equipamento ROTOR GENE 3000 (Corbett Research, Mortlake, Australia).

O RNA total de 1 x 10⁷ células foi obtido usando o reagente Trizol[™] (Invitrogen Life Technologies, Rockville, MD, USA), conforme previamente descrito (CHOMCZYNSKI e SACCHI, 1987). Resumidamente, as células foram lisadas com 1 mL de Trizol e, após 5 minutos de incubação a temperatura ambiente, 200 µL de clorofórmio foram adicionados aos tubos e centrifugados a 12.000 rpm. A fase aquosa foi transferida para outro tubo e o RNA foi sedimentado por centrifugação (12.000 rpm) com isopropanol. O precipitado de RNA foi lavado com etanol a 75%, centrifugado a 7500 rpm por 5 minutos e seco a temperatura ambiente. O RNA foi dissolvido em água livre de RNAse e tratado com DNase I. Após tratamento, o RNA foi armazenado a −70 °C até que a transcrição reversa fosse realizada. O RNA foi quantificado através da medida da sua absorbância a 260 nm. A pureza do RNA foi avaliada pela razão 260/280 nm (SAMBROOK, 2001).

O cDNA foi sintetizado utilizando $3 \mu g$ de RNA e uma mistura dos seguintes reagentes: 146 ng de *random primers*, 200 U de transcriptase reversa (Invitrogen Life Technologies, Rockville, MD, USA), tampão de reação 5X (50 mM Tris–HCl, pH 8,0, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂), 5 mM DTT e 500 μ M dNTP em um volume final de 20 μ L. A reação foi incubada por 2 minutos a 25 °C, seguida por

aquecimento a 42 °C por 50 minutos. O cDNA foi armazenado a −20 °C antes da realização da PCR.

Para a realização da reação de PCR, 1 μ L de cDNA foi adicionado a um volume final de 25 μ L, contendo 100 μ M de dNTPs, tampão de reação 10X (10 mM Tris–HCI, 50 mM KCI, 2 mM MgCl₂), 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, Rockville, MD, USA), 0,1 μ M de cada *primer* (sense e antisense) e *SYBR GREEN* (1000× diluído) (Invitrogen Life Technologies, Rockville, MD, USA) como sonda fluorescente. As seqüências dos *primers* foram desenhadas usando informação disponível no GeneBank do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). A temperatura de anelamento e a seqüência dos *primers* são mostradas na Tabela 3. A quantificação da expressão gênica foi realizada de acordo com método previamente descrito (LIU e SAINT, 2002), usando o gene β 2 microglobulina (*housekeeping*) como controle interno. Esse gene foi escolhido por ser o mais estável de acordo com o programa GNORM.

Gene	Primer sense	Primer antisense	Temperatura
			(°C)
β2 microglobulina	CTCAGTTCCACCCACCTCAG	GCAAGCATATACATCGGTCTCG	56°C
p22 ^{phox}	CAGAAGTACCTGACCGCTGTGG	GGTAGATCACACTGGCAATGGC	57°C
p47 ^{phox}	CACCTTCATTCGCCACATCGC	ACGCTGCCCATCATACCACCTG	58°C
L-selectina	AAATGTGGACATGGGTGGGAAC	CCTTGGACTTCTTGTTGTTGGG	56 °C
β2 integrina	TGGCACACAAACTTTCCGAGAG	TAGGTGACTTTCAGGGTGTCCG	56 °C
iNOS	GGATATCTTCGGTGCGGTCTT	GCTGTAACTCTTCTGGGTGTCAGA	58°C
IL-1β	AGGCAGTGTCACTCATTGTGGC	TCACATGGGTCAGACAGCACG	60°C
CINC-2	TGTACTGGTCCTGCTCCTCCTG	GGGCTTCAGGGTTGAGACAAAC	60°C
TNF-α	GCCTCTTCTCATTCCTGCTCGTGG	TTCTCCTCCTTGTTGGGACCGATC	60°C

Tabela 3	- T(emperatura	de ane	lamento e	e sec	nüência	dos	primers	utilizados
		cimporatura			,	100100	u00	printiolo	atimzaaoo

Abreviaturas: citocina indutora de quimiotaxia de neutrófilos (CINC), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), forma induzível da óxido nítrico sintetase (iNOS), interleucina-1 β (IL-1 β).

As condições de incubação (período de tempo, presença ou não de AGCC e adição ou não de LPS) dos neutrófilos antes da extração do RNA foram diferentes dependendo dos genes a serem analisados. Em todos os casos, as células foram incubadas a 37 °C. Abaixo segue uma descrição detalhada das condições utilizadas nos ensaios:

componentes do complexo da NADPH oxidase (p22^{phox} e p47^{phox}) – os neutrófilos foram incubados por 1 ou 4 horas na presença de acetato (25 mM), propionato (12 mM) ou butirato (12 mM).

moléculas de adesão (L-selectina e β2 integrina) – os neutrófilos foram incubados por 1 ou 4 horas na presença de acetato (25 mM), propionato (12 mM) ou butirato (12 mM).

- citocinas (TNF- α , CINC-2 e IL-1 β) e iNOS – os neutrófilos foram incubados por 1 (TNF- α) ou 4 horas (CINC-2, IL-1 β E iNOS) na presença de acetato (25 mM), propionato (12 mM) ou butirato (1,6 mM) e LPS (5 µg/mL).

3.12 Análise da ativação do fator de transcricao NF-κB pelo ensaio de mobilidade eletroforética retardada (EMSA) em gel de poliacrilamida

A atividade do fator de transcrição NF-κB foi avaliada por EMSA. Neste ensaio, o extrato protéico nuclear é incubado com um oligonucleotídeo dupla fita de DNA contendo a sequência consenso do fator de transcrição e marcado radiativamente. O fator de transcrição ativo se liga ao oligonucleotídeo e, após eletroforese em gel de poliarilamida em condições não-denaturantes, pode ser quantificado, uma vez que, sob essas condições, o complexo oligo- NFκB apresenta mobilidade menor que o oligo não ligado ao fator de transcrição.

A sequência dupla fita utilizada no ensaio para avaliar a ativação do NFκB está descrita abaixo:

5'- AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC- 3'

Os oligonucleotídeos foram marcados por fosforilação da extremidade 5' com [γ^{32} P]-ATP (GE Healthcare Life Sciences, EUA) catalisada pela enzima T4

polinucleotídeo quinase (Life Technologies, Inc.). A reação, que continha 10 pmol de oligonucleotídeo, 15 pmol de [γ^{32} P]-ATP, 1 U de T4 quinase e tampão de enzima 1X, foi incubada a 37 °C por 1 hora. A reação foi interrompida pela adição de tampão TE (Tris HCI (10 mM), EDTA (1 mM), pH 8,0) contendo NaCI (0,1 M) e o excesso de [γ^{32} P]-ATP foi removido por centrifugação do volume da reação utilizando colunas MicroSpin S-300 HR (GE Healthcare Life Sciences, EUA).

Para o preparo do extrato de proteínas nucleares utilizou-se cerca de 1 x 10⁷ células por tratamento. As células foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos a 4 °C e o sedimento foi lavado com 1 mL de tampão HBS (Hepes (25 mM) pH 7,6; NaCl (15 mM)) por duas vezes. Em seguida, o sedimento foi lavado uma vez com tampão RBI (KCI (100 mM); MgCl₂ (5 mM); EGTA (5 mM); Na₄P₂O₇ (5 mM); PMSF (1 mM); aprotinina (2 µg/mL); leupeptina (2 µg/mL)) e incubado por 5 minutos com 1 mL do mesmo tampão. Após a incubação, o sedimento foi lavado e incubado por 5 minutos com 1 mL de tampão RBII (KCI (50 mM); MgCl₂ (5 mM)) EGTA (1 mM); Na₄P₂O₇ (1 mM); PMSF (1 mM); aprotinina (2 µg/mL); leupeptina (2 µg/mL)). Em seguida, o sedimento foi incubado com tampão LBS (Tris (25 mM) pH 7,5; MES (25 mM); Triton X-100 (0,1%); DTT (1 mM); PMSF (1 mM); aprotinina (2 µg/mL); leupeptina (2 µg/mL)) por 30 minutos no gelo. O lisado foi centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos e o sedimento restante contendo as proteínas nucleares foi ressuspenso em tampão de extração (Hepes (20 mM) pH 7,6; NaCI (0,45 M); EDTA (2,5 mM); glicerol (25%); DTT (2,5 mM); PMSF (1 mM); aprotinina (2 µg/mL) e leupeptina (2 µg/mL)). Após incubação por 30 minutos a 4 °C sob agitação, a suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 4 °C na rotação máxima (13.000 rpm) e o sobrenadante contendo as proteínas nucleares foi armazenado a -70 °C. As proteínas nucleares foram quantificadas conforme descrito por Bradford (1976).

Para a formação dos complexos proteína-DNA, as reações (volume final 20 μ L) foram preparadas em gelo, contendo 5 μ g de extrato nuclear, 1,5 μ g de Poli dldC, 1 pmol de oligonucleotídeo marcado e 6 μ L de tampão de ligação (Hepes (60 mM) pH 7,6; glicerol (10%); KCI (150 mM); EDTA (0,6 mM), DTT (3 mM). As reações foram incubadas à temperatura ambiente por 20 minutos. A seguir, as amostras foram aplicadas em gel contendo 6% de poliacrilamida (30:1) em tampão TBE (Tris base (45 mM), ácido bórico (45 mM) e EDTA (1 mM)) e submetidas à eletroforese a 150 V por 2 horas. Após a realização de eletroforese, o gel foi seco a vácuo a 80 °C e exposto em um filme de raio-X por uma semana. Os resultados foram analisados por densitometria utilizando o equipamento STORM 840 (Dynamic Molecular, Sunnyvale, USA).

Para avaliar a ativação do NFκB em neutrófilos, as células foram tratadas por 30 minutos com os AGCC (acetato 25mM, propionato 12mM e butirato 1,6mM) na presença de 5 μg/mL de LPS.

3.13 Avaliação da migração de neutrófilos in vivo

Duas técnicas foram utilizadas com o intuito de analisar o efeito dos AGCC sobre a migração de neutrófilos *in vivo*: o ensaio da bolsa de ar e a técnica de microscopia intravital. A descrição detalhada de cada uma dessas técnicas e as condições utilizadas nos experimentos seguem abaixo.

3.13.1 Ensaio da bolsa de ar

A indução das bolsas de ar na pele dos ratos foi realizada de acordo com protocolo previamente descrito (EDWARDS et al., 1981). Resumidamente, injetouse 20 mL de ar estéril (usando filtros com poros de 0,22 µm) no dorso de ratos anestesiados. Após 7 dias, nova injeção de ar foi realizada juntamente com a aplicação de 1mL de solução de acetato (25 mM), propionato (12 mM) ou butirato (12 mM) em PBS. Controles negativos receberam 1 mL de tampão PBS estéril e nos controles positivos aplicou-se 1 mL de tampão PBS contendo fMLP na concentração de 10 nM.

Após 4 horas, os ratos foram anestesiados, coletou-se o exsudato presente nas bolsas e as mesmas foram lavadas com 2 mL de PBS. Posteriormente, os animais foram eutanasiados. A suspensão de células foi centrifugada a 1200 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sobrenandante obtido foi separado para determinação de citocinas (TNF- α , IL-1 β e CINC-2 $\alpha\beta$) e o precipitado foi ressuspenso em 1 mL de PBS. O número de células foi contado em câmara de Neubauer. Os valores de cada experimento foram normalizados pelos resultados do controle (PBS sem fMLP)

Lâminas obtidas após citocentrifugação das amostras foram coradas com coloração padrão May-Grunwald e Giemsa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). A contagem diferencial foi realizada avaliando-se morfologicamente 100 células por lâmina.

3.13.2 Microscopia intravital

Os ratos foram anestesiados e o mesentério exteriorizado. Os animais foram mantidos em placa com temperatura de 37 °C, que incluía uma plataforma na qual o tecido a ser transiluminado foi posicionado. A preparação foi mantida umedecida e aquecida através da irrigação do tecido com solução Ringer-Locke (pH: 7,2– 7,4; NaCl 154 mM; KCl 5,6 mM; CaCl₂·2H₂O 2 mM; NaHCO₃ 6 mM e glicose 5 mM) aquecida a 37 °C contendo 1% de gelatina. O tecido exposto foi mantido em contato com um fino filme líquido. As imagens foram obtidas por microscópio óptico (Axioplan II, equipado com objetivas de 5,0x/0,30 plan-neofluar ou 10,0 x/0,25 Achroplan). As imagens foram capturadas por camera de vídeo (ZVS, 3C75DE, Carl Zeiss) e transmitidas simultaneamente para o monitor da TV e o computador. As imagens obtidas foram gravadas em computador, digitalizadas e analisadas usando o software KS 300 (Kontron, Alemanha).

A interação dos leucócitos com as células endoteliais das paredes dos vasos foi analisada pela determinação do número de células aderidas e em rolamento (*rolling*) na parede de vênulas pós-capilares (20–30 µm diâmetro, 200 µm de comprimento) do mesentério a intervalos de 10 minutos. Três campos de cada animal foram avaliados após aplicação tópica de 10 µL de solução dos ácidos graxos. Leucócitos movendo-se no fluxo axial periférico, em contato com o endotélio, foram contados como células rolando (DAHLEN et al., 1981). Esses leucócitos se moviam lentamente o suficiente para serem individualmente visualizados. O número de leucócitos aderidos ao endotélio (parados na parede dos vasos) foi determinado no mesmo segmento após 10 minutos da aplicação dos ácidos graxos. O agente quimioático fMLP foi utilizado na concentração de 10

nM como controle positivo. Os valores de cada experimento foram normalizados pelos resultados do controle (PBS = 100%).

3.14 Análise da expressão de moléculas de adesão (L-selectina e β2integrina) por citometria de fluxo

O sangue dos ratos foi coletado da aorta abdominal com EDTA (100 mg/mL). Os neutrófilos foram isolados utilizando gradiente Histopaque® (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Resumidamente, a cada 3 mL de Histopaque-1077 adicionou-se, cuidadosamente pela parede do tubo, o mesmo volume de sangue. O tubo foi então centrifugado a 2400 rpm, 4 °C, por 30 minutos. Ao final da centrifugação identificou-se três fases. As duas fases superiores (plasma, células mononucleares e Histopaque- 1077) foram descartadas e a inferior, rica em neutrófilos e eritrócitos, foi coletada e ressuspensa em PBS. A lise dos eritrócitos foi realizada usando solução de cloreto de amônio (0,13 M) e os leucócitos foram recuperados após lavagem com PBS. Usando essa metodologia de separação, preparações ricas em neutrófilos (mais de 90% dos leucócitos, conforme avaliado em microscópio óptico) foram obtidas.

Os neutrófilos (1,0 ×10⁶) foram pré-incubados durante 4 horas com acetato (25 mM), propionato (12 mM) ou butirato (12 mM) e depois estimulados com *N*-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP; 10 nM durante 10 minutos para avaliação de L-selectina e 30 minutos para β_2 -integrina). Após lavagem, os leucócitos foram incubados por 30 minutos a 4 °C no escuro com 10 µL de anticorpo monoclonal anti-CD62L ou anti- β_2 integrina (BD Biosciences PharmigenTM). Após incubação, as células foram analisadas em citômetro de fluxo FACScalibur (Becton & Dickinson, San Jose, CA, USA). Foram analisadas 10.000 células de cada amostra. Os resultados foram normalizados pela fluorescência média dos controles (PBS).

3.15 Avaliação do efeito quimiotático dos AGCC sobre neutrófilos de camundongo

Utilizou-se dois sistemas para avaliar o efeito dos AGCC sobre a qumiotaxia de neutrófilos: *transwells* (Seção 3.15.1) e a câmara EzTaxican (Seção 3.15.2).

Em parte dos experimentos de quimiotaxia, utilizou-se a fenilacetamida-1 (2-(4-clorofenil)-3-metil-N-(2-tiazolil) butanamida) também conhecida como CTMB. Esse composto foi recentemente descrito como agonista potente e seletivo do receptor GPR43 (LEE et al., 2008). O CTMB utilizado nesses experimentos foi sintetizado e purificado por Jonathan Clark (Babraham Bioscience Technologies, Cambridge, UK).

Com o intuito de explorar o mecanismo de ação dos AGCC na quimiotaxia de neutrófilos, utilizou-se nesses experimentos células isolados de camundongos que não expressam o receptor GPR43 (GPR43-/-). Esses camundongos foram produzidos pela Deltagen (CA, USA) e fornecidos pela AstraZeneca Transgenic and Comparative Genomic R&D MonIdal (Suécia) após estabelecimento de acordo de colaboração com o Babraham Institute (Cambridge, UK).

3.15.1 Ensaio de quimiotaxia utilizando transwells

O ensaio foi realizado em placas de 24 poços contendo filtros do tipo *transwell* (Corning Incorporated, NY, USA). Os filtros possuiam membrana contendo poros de 5 μ m, que separavam os compartimentos superior e inferior (Figura 6).



Figura 6. Esquema da placa *transwell* utilizada no ensaio de migração *in vitro*. No compartimento inferior é colocada a solução contendo os AGCC e no compartimento superior, em contato com a membrana, são colocadas as células.

Brevemente, 200 µL de solução contendo os AGCC, PBS ou o controle positivo (fMLP a 10 µM) foram aplicados no compartimento inferior. O mesmo volume (200 µL) de suspensão de células da medula óssea a 5 x 10⁶ células/mL em tampão HBSS com Ca²⁺ e Mg²⁺ (suplementado com BSA a 0,25% e HEPES 15 mM, pH 7,2) foi adicionado ao compartimento superior e a placa foi incubada a 37 °C por 1 hora. Após incubação, as células que atravessaram a membrana para o compartimento inferior foram contadas durante 1 minuto a 60 µL/mL em citômetro de fluxo (FACS Calibur, BD). A população referente aos neutrófilos foi identificada utilizando o marcador de superfície GR-1. Para tanto, parte das amostras foi incubada com anticorpo anti-GR-1 marcado com ficoeritrina (PE) durante 30 minutos a 4 °C. Após lavagem das células com PBS, as amostras foram analisadas no citômetro e a população com alta marcação para GR-1 foi considerada como sendo de neutrófilos. O total de neutrófilos que migraram para o compartimento inferior foi normalizado pelo número de células que migraram na condição controle (PBS).

3.15.2 Ensaio de quimiotaxia utilizando o sistema EzTaxiscan®

EzTaxiscan® (Effector Cell Institute, Japan) é um sistema desenvolvido (KANEGASAKI et al., 2003) para análise de quimiotaxia em tempo real. Nesse sistema, utiliza-se um dispositivo que apresenta seis compartimentos isolados em paralelo feitos em silicone moldado, conforme pode ser observado na Figura 7A. Cada compartimento, por sua vez, possui dois poços: um para aplicação da substância a ser testada e o outro para as células (Figura 7B). O espaço entre os poços (distância de 300 µm) é denominado ponte. Na ponte é possível visualizar a migração dos neutrófilos em direção ao poço contendo o quimiotraente. Vale ressaltar que, conforme mostrado na Figura 7D, o dispositivo de silicone é posicionado sobre uma lâmina de vidro coberta com lamínula, sendo que entre o mesmo e a lamínula há um canal de 5 µm. É via esse canal que ocorre a

interligação entre a solução adicionada em um dos poços e as células presentes no outro poço.

A EzTaxiscan foi montada conforme descrito na Figura 7C e coberta com tampão HBSS (com Ca²⁺ e Mg²⁺). O dispositivo de silicone foi posicionado na câmara e seus poços foram alinhados. Após a retirada das bolhas do sistema através da ejecão de tampão no interior dos pocos utilizando uma seringa. 3 µL da suspenção de neutrófilos na concentração de 5 x 10⁵ células/mL (obtidas conforme descrito no seção 3.2.2) foram adicionados aos seis poços e após a retirada do tampão pelo outro poço, o que gerou uma diferença de pressão e um fluxo, as células foram alinhadas na ponte. Uma vez que o espaço entre o dispositivo de silicone e a lâmina de vidro é de apenas 5 μ m, os neutrófilos, que possuem cerca de 10 µm de diâmetro, foram impedidos de atravessar diretamente a ponte e permaneceram alinhados. Após o alinhamento, adicionou-se 4 mL de tampão para impedir a continuação do fluxo e 1 µL de AGCC, PBS (controle negativo) ou fMLP (controle positivo) foi injetado no outro poço utilizando seringa Hamilton. A câmara montada foi posicionada no microscópio (temperatura mantida a 37 °C) e a movimentação dos neutrófilos nos seis compartimentos foi acompanhada através de fotos tiradas a cada 30 segundos durante 30 minutos usando objetiva de 10x no sistema de visualização Discovery (Universal Imaging Corporation).

Os vídeos obtidos no microscópio foram transferidos para o programa Metamorph (Molecular Devices), no qual se obteve as coordenadas *x*,*y* de cada neutrófilo em cada foto. Os arquivos contendo a posição das células ao longo do tempo foram analizados no software Mathematica (Wolfram Research), utilizando arquivo previamente desenvolvido por Gareth Jones (ZICHA et al., 1997). Simplificadamente, o programa converteu as coordenadas x e y dos neutrófilos ao longo do tempo em gráficos mostrando o caminho percorrido pelas células. As análises foram realizadas levando-se em conta a distância de 50 µm como valor percorrido mínimo para considerar que a célula se moveu. Além do caminho percorrido, o programa de análise forneceu gráfico mostrando a direcionalidade do movimento das células. Foi realizado o teste estatístico unimodal de Rayleigh para

determinar se houve ou não movimentação significativa de neutrófilos em uma direção.



Figura 7. Figura esquemática da Câmara EzTaxiscan. A Ez Taxiscan consiste em um dispositivo de silicone, que possui 6 compartimentos (A). Cada compartimento possui (B) 2 poços: 1 para células (a) e 1 para adição do quimioatraente (b). Entre esses poços há uma região chamada de ponte (distância de 300 μm), na qual é possível visualizar a migração dos neutrófilos (c). Montagem da câmara (C). O suporte de vidro (d) foi posicionado juntamente com a lamínula (e) no interior de uma das unidades da câmara (f). O dispositivo de silicone (g) foi inserido na região central da câmara, a qual foi selada com a parte superior (h). Para estabelecer o gradiente de agonista a ser testado (D), o tampão foi retirado do reservatório superior (i) e os neutrófilos foram adicionadas nos poços (a). Após alinhamento das células na ponte (c), a substância a ser testada quanto a sua capacidade quimioatraente foi adicionada aos outros poços (b). O agonista (j) se difundiu do poço b sobre a ponte (c) gerando o gradiente. Fonte: Adaptado de esquema fornecido por John Ferguson, Babraham Institute, Cambridge, UK.

3.16 Tratamento estatístico

Os resultados estão expressos como média <u>+</u> erro padrão da média de ao menos 3- 4 ensaios independentes. Comparações entre os diferentes grupos experimentais foram realizadas por análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. Para a realização das análises estatísticas foram utilizados os programas Prisma 3.0 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA) e Origin 7.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). As diferenças foram consideradas significativas para p<0,05.
4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da citotoxicidade dos AGCC

4.1.1 Efeito dos AGCC sobre a integridade de membrana e a fragmentação de DNA em neutrófilos de rato

Neutrófilos foram incubados com diferentes concentrações dos AGCC (acetato, propionato e butirato) e, após 4 ou 18 horas, avaliou-se por citometria de fluxo, utilizando o fluoróforo iodeto de propídio, a integridade de membrana e a fragmentação de DNA.

Neutrófilos incubados por 4 horas com acetato (5 - 100 mM), propionato (0,2 – 24 mM) ou butirato (0,2 – 24 mM) não apresentaram fragmentação de DNA ou perda de integridade de membrana. Já no caso das células incubadas por 18 horas com acetato, propionato e butirato, nas concentrações, respectivamente, de 50 mM, 24 mM e 4 mM, houve redução significativa da viabilidade celular. Acetato na concentração de 100 mM, propionato 24 mM e butirato a partir de 4 mM induziram aumento significativo da fragmentação de DNA (Figura 8).

Com base nos resultados de integridade de membrana e fragmentação de DNA foram estabelecidas as concentrações máximas toleráveis dos AGCC para os neutrófilos (Tabela 4).

AGCC/Período	4 horas	18 horas
Acetato	>100 mM	25 mM
Propionato	>24 mM	12 mM
Butirato	>24 mM	2 mM

Tabela 4 - Concentração máxima tolerável dos AGCC por neutrófilos de rato.

Abreviatura: ácidos graxos de cadeia curta (AGCC).



Figura 8. Efeito dos AGCC na integridade da membrana plasmática e fragmentação de DNA de neutrófilos de rato. A porcentagem de células com a membrana intacta (◆) e DNA fragmentado (■) após tratamento por 18 horas com diferentes concentrações de acetato (A), propionato (B) e butirato (C) está indicada. Os valores representam a média ± erro padrão da média de 4 experimentos em triplicata. * p< 0,05 vs células sem AGCC.

4.2 Efeitos dos AGCC sobre a produção de ERO por neutrófilos de ratos4.2.1 Produção de peróxido de hidrogênio

Os neutrófilos foram analisados quanto à produção de peróxido de hidrogênio em duas condições diferentes: 1 – na presença de AGCC (Figura 9) e em 2 – após prévia incubação de 4 horas com os AGCC (Figura 10). Dois estímulos foram utilizados nesses experimentos: o acetato de forbol miristato (PMA), ativador de PKC, e o formil metil-leucil-fenilalanina (fMLP), que induz a produção de ERO via ativação de receptor de membrana do tipo GPCR (receptor acoplado a proteína G) por múltiplas vias de sinalização, incluindo via das MAPK, ativação de fosfolipases e PKC (CHEN et al., 2005; RANE et al., 1997).

Quando a produção de peróxido de hidrogênio foi avaliada na presença de AGCC, houve redução significativa nas células tratadas com butirato (12 e 24 mM). No caso das células estimuladas com PMA, houve redução significativa da produção de H₂O₂ em todos os tratamentos com AGCC em comparação com o controle não tratado (Figura 9A). Já para as células estimuladas com fMLP, a redução ocorreu nos tratamentos com propionato (24 mM) e butirato (12 e 24 mM) (Figura 9B). Houve aumento da produção de peróxido de hidrogênio pelas células incubadas na presença de acetato (10 mM) (Figuras 9A e 9B).

Após incubação dos neutrófilos por 4 horas com os AGCC, houve redução na produção de peróxido de hidrogênio em resposta ao PMA nas células prétratadas com propionato (8 mM) e butirato (4, 8 e 12 mM) (Figura 10A) e em resposta ao fMLP após incubação com butirato (12 mM) (Figura 10B). Neutrófilos pré-tratados com 10 e 25 mM de acetato apresentaram produção de peróxido de hidrogênio aumentada em relação ao controle (Figuras 10A e 10B). A produção de peróxido de hidrogênio em resposta ao fMLP pelas células incubadas com os AGCC não diferiu em relação às não tratadas, com exceção do tratamento com acetato na concentração de 25 mM, que aumentou a resposta ao fMLP (Figura 10B).



Figura 9. Efeito dos AGCC sobre a produção de peróxido de hidrogênio por neutrófilos de rato. A produção de H₂O₂ foi avaliada após 30 minutos de incubação na presença de diferentes concentrações de AGCC com ou sem estímulo, PMA (A) ou fMLP (B). Os valores representam a média ± erro padrão da média de 4 ensaios em duplicata. * p< 0,05 vs células sem AGCC (PBS) com PMA ou fMLP. # p< 0,05 vs células sem AGCC (PBS) sem PMA ou fMLP.</p>



Figura 10. Efeito dos AGCC sobre a produção de peróxido de hidrogênio por neutrófilos de rato. As células foram previamente incubadas por 4 horas na presença de diferentes concentrações de AGCC e, após esse período, a produção de H₂O₂ foi avaliada por 30 minutos com ou sem estímulo, PMA (A) ou fMLP (B). Os valores representam a média ± erro padrão da média de 4 ensaios em duplicata. * p< 0,05 vs células sem AGCC (PBS) com PMA ou fMLP. # p< 0,05 vs células sem AGCC (PBS) sem PMA ou fMLP.</p>

77

4.2.2 Produção de superóxido

A produção de superóxido pelos neutrófilos, da mesma maneira que o peróxido de hidrogênio, foi avaliada em duas condições diferentes: na presença de AGCC (Figura 11) e após prévia incubação de 4 horas com os AGCC (Figura 12). Nesses experimentos, utilizou-se a sonda lucigenina que, diferentemente do vermelho de fenol (técnica utilizada na quantificação de peróxido de hidrogênio), detecta a produção extracelular de ERO, particularmente, de superóxido. Novamente, dois estímulos foram utilizados: PMA e fMLP.

A produção de superóxido por neutrófilos estimulados com PMA na presença de butirato (12 e 24 mM) foi inferior a das células não tratadas (Figura 11A). Apesar de não ter havido diferença significativa quanto à produção de superóxido pelos neutrófilos estimulados com fMLP na presença de AGCC, observou-se tendência à inibição no caso das células tratadas com butirato (Figura 11B). Acetato aumentou a produção de superóxido nas células não estimuladas (Figura 11A).

A produção de superóxido pelas células previamente incubadas com AGCC por 4 horas e estimuladas com PMA, diferententemente dos resultados obtidos para peróxido de hidrogênio, não variou em comparação com o controle (células não incubadas com AGCC) (Figura 12A). Contudo, a produção de superóxido por neutrófilos pré-tratados com acetato (25 mM), propionato (8 e 12 mM) ou butirato (8 e 12 mM) e estimulados com fMLP foi significativamente menor que a do controle (Figura 12B).

Uma vez que uma das hipóteses para explicar os efeitos dos AGCC sobre leucócitos é a de que os mesmos atuem via receptor GPR43, que está acoplado às proteínas Gi/o e Gq, o próximo passo foi analisar o efeito da toxina pertussis (inibidor de proteína Gi) sobre a ação dos AGCC. Para tanto, neutrófilos foram incubados por 1 hora a 37 °C na presença de toxina pertussis (100 ng/mL) (BADOLATO et al., 2000). Após esse período, procedeu-se a adição dos AGCC (acetato e butirato), do estímulo (PMA) e a quantificação da produção de superóxido.

A produção de superóxido por neutrófilos aumentou na presença de acetato sem estímulo, enquanto que o butirato inibiu a produção de superóxido após adição de PMA (Figura 13A). Na presença de toxina pertussis, ação estimulatória do acetato sobre a produção de superóxido foi mantida, porém, o efeito inibitório do butirato foi abolido (Figura 13B), o que sugere a participação da proteína Gi na inibição da produção de ERO pelo butirato.



Figura 11. Efeito dos AGCC sobre a produção de superóxido por neutrófilos de rato. A produção de superóxido foi avaliada por 30 minutos na presença de diferentes concentrações de AGCC com ou sem estímulo, PMA (A) ou fMLP (B). Os valores representam a média ± erro padrão da média de 4 ensaios em quadruplicata. * p< 0,05 vs células sem AGCC (PBS) com PMA ou fMLP. # p< 0,05 vs células sem AGCC (PBS) sem PMA ou fMLP.</p>

80

Α



Figura 12. Efeito dos AGCC sobre a produção de superóxido por neutrófilos de rato. As células foram previamente incubadas por 4 horas na presença de diferentes concentrações de AGCC e, após esse período, a produção de superóxido foi avaliada por 30 minutos com ou sem estímulo, PMA (A) ou fMLP (B). Os valores representam a média ± erro padrão da média de 4 ensaios em quadruplicata. * p< 0,05 vs células sem AGCC (PBS) com PMA ou fMLP. # p< 0,05 vs células sem AGCC (PBS) sem PMA ou fMLP.</p>



Figura 13. Efeito da toxina pertussis sobre a produção de superóxido por neutrófilos. A produção de superóxido foi avaliada, após incubação prévia das células por 1 hora com (B) ou sem toxina pertussis (A), na presença de acetato (10 mM) e butirato (12 mM) com ou sem estímulo (PMA). Os valores representam a média ± erro padrão da média de 2 ensaios em duplicata. * p< 0,05 vs células sem AGCC (PBS) com PMA. # p< 0,05 vs células sem AGCC (PBS) sem PMA.</p>

4.2.3 Produção de ácido hipocloroso (HOCI)

O ácido hipocloroso é formado na reação de óxido-redução do cloreto (sofre oxidação) com o peróxido de hidrogênio (sofre redução). Essa reação é catalisada pela enzima mieloperoxidase (Figura 4). O ácido hipocloroso, por sua vez, reage com aminas gerando as cloroaminas, compostos altamente reativos que possuem importante ação bactericida (NATHAN, 2006). Com o intuito de avaliar o efeito dos AGCC sobre a produção dessa importante espécie reativa, utilizou-se a técnica descrita por Dypbukt et al. (2005). Para tanto, os neutrófilos foram incubados na presença dos AGCC, taurina (composto que reagiu com o ácido hipocloroso formando cloroamina) e PMA.

Da mesma maneira que o observado para a produção de superóxido (técnica da lucigenina) e do peróxido de hidrogênio (técnica do vermelho de fenol), o butirato (12 mM) reduziu a produção do ácido hipocloroso após estimulação com PMA (Figura 14). Na ausência de PMA, os AGCC não tiveram qualquer efeito sobre a produção de ácido hipocloroso pelos neutrófilos (Figura 14).



Figura 14. Efeito dos AGCC sobre a produção de HOCI por neutrófilos de rato. As células foram tratadas com acetato (25 mM), propionato (12 mM) e butirato (12 mM) na presença ou não de PMA (54 ng/mL). Os valores representam a média ± erro padrão da média de 3 ensaios em triplicata. * p< 0,05 vs controle sem AGCC (PBS) com PMA.

4.3 Efeitos dos AGCC sobre a expressão gênica de p22^{phox} e p47^{phox} em neutrófilos de ratos

Uma das hipóteses para explicar o efeito inibitório, particularmente do butirato, sobre a produção de ERO, seria a de que esse ácido graxo modularia a expressão dos componentes do sistema NADPH oxidase. Para verificar essa possibilidade, neutrófilos foram incubados por 1 e 4 horas na presença dos AGCC e, posteriormente, avaliou-se a expressão gênica de dois componentes do sistema NADPH oxidase: $p22^{phox}$ (componente de membrana do complexo NADPH oxidase) e $p47^{phox}$ (componente citosólico do complexo NADPH oxidase). O gene β 2 microglobulina foi utilizado como controle interno e todos os resultados foram normalizados pelo controle (PBS).

Conforme pode ser observado na Figura 15, os AGCC, à exceção do propionato, o qual causou aumento da expressão de p47^{phox} após 4 horas de incubação (Figura 15B), não tiveram qualquer efeito sobre a expressão desses genes nos períodos de tempo analisados.



Figura 15. Expressão de mRNA das proteínas p22^{phox} e p47^{phox} em neutrófilos de rato após incubação com AGCC por 1 (A e B) ou 4 horas (C e D). Os resultados foram corrigidos pela expressão do mRNA da β2 microglobulina (controle interno) e normalizados pelos valores obtidos na ausência de AGCC (PBS). Os valores representam a média ± erro padrão da média de 3 ensaios. * p< 0,05 vs controle sem AGCC (PBS).</p>

4.4 Efeitos dos AGCC sobre a ativação da p47^{phox} em neutrófilos de ratos

A fosforilação da proteína p47^{phox} é um dos eventos cruciais no processo de ativação do complexo NADPH oxidase. Para avaliar a ativação dessa proteína, realizou-se a imunoprecipitação do extrato protéico dos neutrófilos utilizando anticorpo anti-p47^{phox} e posterior detecção por *Western blotting* com anticorpo anti-fosfoserina.

Neutrófilos foram estimulados com PMA na presença de acetato (25 mM), propionato (12 mM) ou butirato (12 mM) por 30 minutos e posteriormente avaliouse a ativação da p47^{phox}. Os resultados de cada experimento foram normalizados pelo controle (PBS). O único ácido graxo que teve efeito sobre a ativação da p47^{phox} foi o butirato, que conforme pode ser visto na Figura 16, reduziu a quantidade de p47^{phox} fosforilada.



Figura 16. Efeito dos AGCC sobre a fosforilação da proteína p47^{phox}. Neutrófilos de rato foram incubados na presença de acetato (25 mM), propionato (12 mM) ou butirato (12 mM) e PMA (54 ng/mL) por 30 minutos e posteriormente avaliou-se a ativação da p47^{phox}. Os valores representam a média ± erro padrão da média de 3 ensaios em duplicata. * p< 0,05 vs controle (PBS).</p>

4.5 Efeito dos AGCC sobre a produção de AMP cíclico por neutrófilos de ratos

O segundo mensageiro adenosina monofosfato cíclico (AMP cíclico) é gerado a partir da adenosina trifosfato (ATP) e dentre outras ações ativa a proteína quinase A (PKA), que é inibidora da ativação do sistema NADPH oxidase (O'DOWD et al., 2004). Com o intuito de avaliar se o efeito inibitório do butirato sobre a produção de ERO poderia estar relacionado com uma ação sobre o conteúdo intracelular de AMP cíclico, as concentrações intracelulares desse mensageiro foram determinadas em neutrófilos incubados na presença de butirato (AGCC que inibiu a produção de ERO por neutrófilos).

A concentração de butirato utilizada nesse experimento foi de 12 mM, menor concentração desse ácido graxo que foi capaz de inibir a produção de superóxido pelos neutrófilos. As células foram incubadas durante 20 minutos com butirato ou forscolina (ativador da adenilato ciclase) na presença de isobutilmetilxantina (IBMX), inibidor da fosfodiesterase.

A forscolina e em menor grau o butirato aumentaram significativamente as concentrações intracelulares de AMP cíclico (Figura 17). Com a finalidade de analisar a participação da proteína Gi no aumento de AMP cíclico, esse segundo mensageiro foi quantificado em neutrófilos pré-tratados com toxina pertussis (PTX) e estimulados com butirato. O efeito estimulatório do butirato foi abolido nas células tratadas com PTX (Figura 17).



Figura 17. Efeito do butirato sobre a concentração de AMP cíclico em neutrófilos. As células foram tratadas por 20 minutos com butirato (12 mM) e, posteriormente, determinou-se o conteúdo de AMP cíclico nas mesmas. Forscolina foi utilizada como controle positivo dos experimentos. Os valores representam a média ± erro padrão da média de 3 ensaios em duplicata. * p< 0,05 vs controle (PBS).</p>

4.6 Efeito dos AGCC sobre a capacidade fagocítica e de destruição de *C. albicans*

Uma vez que os AGCC modificaram a produção de ERO pelos neutrófilos, importante mecanismo envolvido na destruição de microrganismos, avaliou-se também o efeito desses ácidos graxos sobre a capacidade dos neutrófilos de fagocitar e destruir leveduras de *Candida albicans*. Para tanto, leveduras previamente opsonizadas foram incubadas com neutrófilos na presença dos AGCC (acetato 25 mM, propionato 12 mM e butirato 12 mM). Conforme pode ser observado na Figura 18, os AGCC, à exceção do butirato, não tiveram qualquer efeito sobre os parâmetros avaliados nas concentrações testadas. Por outro lado, na presença de butirato, houve redução significativa do número de células que fagocitaram leveduras e da capacidade de destruição das mesmas (Figuras 18A e 18B).



Figura 18. Efeito dos AGCC sobre a capacidade fagocítica (A) e atividade fungicida (B) de neutrófilos de rato. Neutrófilos foram incubados na presença de AGCC e *Candida albicans* opsonizadas durante 1 hora e, posteriormente, avaliou-se a fagocitose e destruição das mesmas. Os valores representam a média ± erro padrão da média de 3 ensaios em duplicata. * p< 0,05 vs controle (PBS).</p>

4.7 Efeito dos AGCC na produção de citocinas e NO por neutrófilos de rato

4.7.1 Efeito dos AGCC e do inibidor de HDACs (tricostatina A) sobre a produção de citocinas por neutrófilos de rato

Os neutrófilos foram avaliados quanto à capacidade de produzir citocinas (TNF- α , IL-1 β e CINC-2 $\alpha\beta$) na presença de concentrações não tóxicas dos ácidos graxos de cadeia curta e LPS (5 µg/mL). A quantificação das citocinas no sobrenadante foi realizada após 4 (TNF- α) ou 18 horas (IL-1 β e CINC-2 $\alpha\beta$) de cultura.

Propionato e butirato inibiram o efeito estimulatório do LPS sobre a produção de TNF- α (Figuras 19B e 19C) e CINC-2 $\alpha\beta$ (Figuras 18H e 18I). No caso da IL-1 β , propionato (8 e 12 mM) e butirato (1,6 e 3,2 mM) apresentaram efeito aditivo sobre a produção e liberação dessa citocina em resposta ao LPS (Figuras 19E e 19F). O acetato não apresentou qualquer efeito sobre a produção das citocinas avaliadas (Figuras 19A, 19D e 19G).

Neutrófilos incubados na presença do inibidor de histona desacetilase, tricostatina (TSA), na concentração de 25 nM e LPS (5 μ g/mL) produziram quantidades menores de TNF- α e CINC-2 $\alpha\beta$ em comparação com células incubadas apenas com LPS (Figuras 20A e 20C). TSA apresentou efeito aditivo em relação ao LPS sobre a produção de IL-1 β por neutrófilos (Figura 20B).



Figura 19. Efeito dos AGCC sobre a produção de citocinas por neutrófilos de rato. Neutrófilos foram incubados na presença de diferentes concentrações de acetato (A, D e G), propionato (B, E e H) ou butirato (C, F e I) e LPS por 4 (TNF-α) ou 18 horas (IL-1β e CINC-2αβ). Posteriormente, avaliou-se no sobrenadante das culturas as concentrações de TNF-α (A, B e C), IL-1β (D, E e F) e CINC-2αβ (G, H e I). Os valores representam a média ± erro padrão da média de 3 ensaios em duplicata. * p< 0,05 vs controle (ausência de AGCC).</p>



Figura 20. Efeito da tricostatina A (TSA) sobre a produção de citocinas por neutrófilos de rato. Neutrófilos foram incubados na presença de tricostatina (TSA; 25 nM) e LPS por 4 (TNF-α) ou 18 horas (IL-1β e CINC-2αβ), posteriormente, avaliou-se as concentrações de TNF-α (A), IL-1β (B) e CINC-2αβ (C) no sobrenadante das culturas. Os valores representam a média ± erro padrão da média de 3 ensaios em duplicata. * p< 0,05 vs controle (PBS).</p>

4.7.2 Efeito dos AGCC e do inibidor de HDAC (tricostatina A) sobre a produção de óxido nítrico (NO) por neutrófilos de rato

Os neutrófilos foram avaliados quanto à capacidade de produzir NO na presença dos AGCC ou tricostatina (TSA - 25 nM) e LPS (5 µg/mL). A quantificação de NO presente no sobrenadante das culturas foi realizada após 18 horas de incubação.

Neutrófilos incubados com acetato e estimulados com LPS apresentaram a mesma produção de NO que as células apenas estimuladas com LPS (Figura 21A). Contudo, propionato (12 mM), butirato (1,6 mM e 3,2 mM) e TSA atenuaram o efeito estimulatório do LPS sobre a produção desse mediador (Figuras 21B, 21C e 21D).



Figura 21. Efeito dos AGCC e tricostatina sobre a produção de NO por neutrófilos de rato. Neutrófilos foram incubados na presença de acetato (A), propionato (B), butirato (C) ou TSA (D) e LPS por 18 horas e, posteriormente, avaliou-se no sobrenadante das culturas as concentrações de nitrito. Os valores representam a média ± erro padrão da média de 3 ensaios em duplicata. *p< 0,05 vs controle (sem AGCC ou TSA).

4.8 Efeito dos AGCC sobre o conteúdo de mRNA de citocinas e iNOS em neutrófilos de rato

Considerando os resultados obtidos para produção de citocinas e NO por neutrófilos na presença de AGCC, avaliou-se o efeito dos mesmos sobre a expressão de mRNA desses mediadores. Para tanto, neutrófilos foram incubados por 1 e 4 horas na presença de AGCC (acetato 25 mM, propionato 12 mM e butirato 1,6 mM) e LPS (5 µg/mL). As concentrações utilizadas dos AGCC nestes experimentos foram as menores que modificaram a produção das citocinas e NO. No caso do acetato, o qual não teve qualquer efeito sobre a produção desses mediadores, utilizou-se a concentração de 25 mM.

Neutrófilos tratados com propionato e butirato apresentaram diminuição da expressão do mRNA de CINC-2 e TNF-α (Figuras 22A e 22B). Já a expressão do mRNA da IL-1β aumentou significativamente na presença de butirato (Figura 22C).

Com relação à expressão da iNOS, apenas o butirato teve efeito; reduziu significativamente a expressão de mRNA dessa enzima (Figura 22D). Vale ressaltar que em todos esses experimentos os períodos de tempo utilizados para a avaliação da expressão do mRNA das citocinas foram escolhidos com base no pico de expressão desses genes após estimulação com LPS.



Figura 22. Expressão relativa do mRNA das citocinas TNF-α (A), CINC 2α (B), IL-1β (C) e iNOS (D) em neutrófilos após incubação com AGCC por 1 (TNF-α) e 4 horas (CINC-2, IL-1β e iNOS) na presença de LPS (5 µg/mL). Os resultados foram corrigidos pela expressão do mRNA da β2 microglobulina (controle interno) e normalizados pelos valores obtidos na ausência de AGCC (PBS). Os valores representam a média ± erro padrão da média de 3 ensaios em duplicata. * p< 0,05 vs controle (PBS).</p>

4.9 Efeito dos AGCC sobre a atividade de histonas desacetilases (HDAC)

Um dos mecanismos pelo qual os AGCC atuam nas células é via inibição da atividade das HDAC. Essas enzimas via controle do estado de acetilação de fatores de transcrição e de histonas modulam a expressão gênica. O efeito de diferentes concentrações de AGCC sobre a atividade de HDAC foi avaliado em extratos nucleares obtidos de neutrófilos.

Os três AGCC (acetato, propionato e butirato) inibiram a atividade da HDAC (Figura 23). Contudo, houve diferença entre os mesmos com relação à potência de inibição; o butirato foi o mais potente com uma concentração inibitória 50% estimada (IC_{50}) igual a 2,8 mM. Propionato apresentou IC_{50} igual a 8,7 mM. O menos potente foi o acetato (IC_{50} = 66 mM).



Figura 23. Efeito dos AGCC sobre a atividade de histona desacetilases (HDACs). A atividade de HDACs de extratos nucleares de neutrófilos foi avaliada na presença de diferentes concentrações de AGCC. Os valores representam a média ± erro padrão da média de dois ensaios em duplicata.

4.10 Efeito dos AGCC sobre a ativação do fator de transcrição NFκB em neutrófilos de ratos

Conforme descrito anteriormente, o fator de transcrição NFκB controla a expressão de genes envolvidos no processo inflamatório como citocinas, moléculas de adesão e enzimas (por exemplo, ciclooxigenase e iNOS). O efeito dos AGCC sobre a ativação do NFκB foi avaliado em neutrófilos estimulados com LPS pela técnica de EMSA (ensaio de mobilidade eletroforética retardada).

Acetato, propionato e butirato nas concentrações, respectivamente, de 25, 12 e 1,6 mM não tiveram qualquer efeito sobre a ativação basal do fator de transcrição NFκB (dados não mostrados). Entretanto, propionato e butirato inibiram a ativação do NFκB induzida por LPS (Figuras 24 e 25).



Figura 24. Foto representativa de três experimentos. Ativação do fator de transcrição NFκB em células incubadas por 30 minutos na presença de PBS (controle), acetato (Ac), propionato (Pr) ou butirato (Bt) e estimuladas ou não com LPS.



Figura 25. Efeito dos AGCC sobre a ativação por LPS do fator de transcrição NFκB em neutrófilos de ratos. Neutrófilos foram incubados na presença de AGCC e LPS por 30 minutos e, posteriormente, avaliou-se pela técnica de ensaio de mobilidade eletroforética retardada a ativação do NFκB. Os valores representam a média ± erro padrão da média de 3 ensaios. Os valores foram corrigidos pelo controle (PBS) * p< 0,05 vs controle (PBS).</p>

4.11 Efeito dos AGCC sobre o processo de migração de neutrófilos *4.11.1 Efeito quimiotático dos AGCC*

O efeito quimiotático dos AGCC foi avaliado por duas técnicas diferentes: 1) membranas porosas acopladas a placas de cultura (sistema *Transwell*), que permite uma análise mais rápida e barata do efeito dos AGCC sobre a quimiotaxia de neutrófilos e 2) o sistema EzTaxiscan®, que possibilita acompanhar a trajetória das células em tempo real.

Em todos os experimentos utilizou-se o composto fMLP como controle positivo. No *transwell*, esse quimioatraente (concentração 1 µM) aumentou em 12 vezes o número de neutrófilos migrados para o compartimento inferior em comparação com o controle (PBS). Conforme pode ser observado na Figura 26, os três AGCC induziram quimiotaxia de neutrófilos. Acetato e butirato aumentaram significativamente o número de neutrófilos migrados a partir da concentração de 0,1 mM, enquanto que esse efeito só foi verificado com propionato a partir de 0,3 mM. Contudo, o propionato foi mais efetivo na indução de quimiotaxia que os outros, uma vez que aumentou em cerca de 4 a 5 vezes o número de neutrófilos migrados enquanto que acetato e butirato aumentaram de 2 a 3 vezes (Figura 26).

Os experimentos utilizando o sistema EzTaxiscan foram realizados apenas com o propionato. Nesses experimentos, o fMLP também foi empregado como controle positivo. Esse quimioatraente mesmo em concentrações baixas (0,067 e 0,125 μ M) induziu aumento significativo na porcentagem de neutrófilos em movimento comparado com a condição controle (PBS) (Figura 27). Contudo, o movimento direcionado de neutrófilos ocorreu apenas a partir de concentrações mais altas (0,25 μ M a 1 μ M). Assim como observado nos experimentos com *transwell*, o propionato induziu quimiotaxia de neutrófilos (Figura 28). Entretanto, no caso da câmara EzTaxiscan as concentrações necessárias para haver a migração dos neutrófilos foram mais elevadas (a partir de 10 mM), o que pode em parte decorrer de diferenças entre os dois sistemas; no *transwell* a distância entre as células e o quimiotraente é bem menor do que na EzTaxiscan, além do fato de que o gradiente formado pelo agonista se mantém por um período de tempo maior na EzTaxiscan (KANEGASAKI, NOMURA et al., 2003).



Figura 26. Efeito dos AGCC sobre a quimiotaxia de neutrófilos. Neutrófilos foram testados quanto a quimiotaxia frente a diferentes concentrações de acetato (A), propionato (B) e butirato (C) Os valores representam a média ± erro padrão da média de 3 ensaios em duplicata. * p< 0,05 vs controle (PBS).



Figura 27. Efeito de diferentes concentrações de fMLP sobre a quimiotaxia de neutrófilos. O trajeto percorrido pelos neutrófilos e a direcionalidade da movimentação dessas células na presença de diferentes concentrações de fMLP foram avaliados durante 30 minutos na câmara EzTaxiscan (A). A porcentagem de células em movimento foi analisada considerando 50 μm como a distância mínima a ser percorrida pela célula para a mesma ser considerada em movimento (B). Os valores representam a média ± erro padrão da média de 6-9 vídeos obtidos de 2 ensaios independentes. * p< 0,05 vs controle (sem fMLP).



Figura 28. Efeito de diferentes concentrações de propionato sobre a quimiotaxia de neutrófilos. O trajeto percorrido pelos neutrófilos e a direcionalidade da movimentação dessas células na presença de diferentes concentrações de propionato foram avaliados durante 30 minutos na câmara EzTaxiscan (A). A porcentagem de células em movimento foi analisada considerando 50 μm como a distância mínima a ser percorrida pela célula para a mesma ser considerada em movimento (B). Os valores representam a média ± erro padrão da média de 6- 9 vídeos obtidos de 2 ensaios independentes. * p< 0,05 vs controle.

4.11.2 Efeito quimiotático do agonista seletivo do receptor GPR43 (CTMB)

Com o intuito de avaliar se os efeitos dos AGCC sobre a quimiotaxia de neutrófilos envolviam a ativação do receptor GPR43 utilizou-se agonista seletivo do receptor GPR43, o CTMB, e neutrófilos isolados de camundongos GPR43-/-.

Conforme pode ser observado na Figura 29, o CTMB induziu aumento significativo do número de neutrófilos que migraram para o compartimento inferior no sistema de *transwells*. O efeito quimiotático do CTMB foi confirmado utilizando a câmara EzTaxiscan; esse composto a partir de 25 µM aumentou significativamente o número de neutrófilos em movimento (Figura 30). Vale ressaltar que em acordo com os resultados obtidos pelo grupo que inicialmente descreveu o CTMB como agonista seletivo do receptor GPR43 (LEE, SCHWANDNER et al., 2008), as concentrações necessárias desse composto para induzir a migração de neutrófilos foram cerca de 1000 vezes menores do que a dos AGCC.

Neutrófilos isolados de animais GPR43^{-/-} apresentaram resposta quimiotática ao propionato e CTMB reduzida, nos experimentos com *Transwell* e na câmara EzTaxiscan, em comparação com os animais selvagens (WT) (Figura 31). Entretanto, não houve qualquer diferença na quimiotaxia desses neutrófilos em resposta ao fMLP (Figura 31).



Figura 29. Efeito do agonista do receptor GPR43 (CTMB) sobre a quimiotaxia de neutrófilos. Neutrófilos foram testados quanto a quimiotaxia frente a diferentes concentrações de acetato (A), propionato (B) e butirato (C) Os valores representam a média ± erro padrão da média de 3 ensaios em duplicata. * p< 0,05 vs controle (PBS).



Figura 30. Efeito de diferentes concentrações do agonista seletivo do receptor GPR43 (CTMB) sobre a quimiotaxia de neutrófilos. O trajeto percorrido pelos neutrófilos e a direcionalidade da movimentação dessas células na presença de diferentes concentrações de CTMB foram avaliados durante 30 minutos na câmara EzTaxiscan (A). A porcentagem de células em movimento foi analisada considerando 50 μm como a distância mínima a ser percorrida pela célula para a mesma ser considerada em movimento (B). Os valores representam a média ± erro padrão da média de 6- 9 vídeos obtidos de 3 ensaios independentes. * p< 0,05 vs controle.</p>



Figura 31. Análise da resposta quimiotática de neutrófilos isolados de animais que não expressam o receptor GPR43 (GPR43^{-/-}) ao propionato, CTMB e fMLP. Neutrófilos de animais GPR43^{-/-} e seus controles (WT) foram testados quanto à quimiotaxia frente a diferentes agonistas (propionato, CTMB e fMLP). Os valores representam a média ± erro padrão da média de 3 ensaios em duplicata. * p< 0,05 vs controle (PBS).</p>

4.11.3 Efeito dos AGCC sobre a migração de leucócitos para a bolsa de ar

Com o objetivo de avaliar o efeito dos AGCC sobre a migração de leucócitos *in vivo*, utilizou-se o ensaio de bolsa de ar em ratos. Após 4 horas da aplicação dos AGCC, do controle positivo (fMLP) ou PBS, determinou-se o número de células que migraram para a bolsa de ar. As células coletadas das bolsas de ar consistiam predominantemente de neutrófilos (mais de 90%), conforme verificado após confecção das lâminas e análise em microscópio óptico.

O tratamento com fMLP ou AGCC aumentou significativamente o número de células que migraram para a bolsa de ar em comparação com o controle (PBS) (Figura 32).

A quantidade das citocinas (CINC- $2\alpha\beta$, IL- 1β e TNF- α) liberadas na bolsa de ar foi determinada no exsudato obtido após 4 horas da aplicação dos AGCC, do controle positivo (fMLP) ou PBS. Conforme pode ser visualizado na Figura 32, os AGCC não tiveram efeito significativo sobre a quantidade de IL- 1β e TNF- α liberadas na bolsa. Contudo, houve aumento de 1,7-, 3,8- e 2,7- vezes na quantidade da quimiocina CINC- $2\alpha\beta$ presente na bolsa de ar quando da aplicação de acetato, propionato e butirato, respectivamente (Figura 33).


Figura 32. Efeito dos AGCC sobre a migração de células para a bolsa de ar. O número de células que migraram para a bolsa de ar foi quantificado 4 horas após adição de PBS, AGCC ou fMLP. Os valores de cada experimento foram normalizados pelo número de células obtido na condição controle (PBS). Os valores representam a média ± erro padrão da média de 4 ensaios. * p< 0,05 vs controle (PBS).</p>



Figura 33. Efeito dos AGCC sobre a liberação de citocinas na bolsa de ar. As citocinas CINC-2αβ (A), TNF-α (B) e IL-1β (C) liberadas no exsudato da bolsa de ar foram quantificadas 4 horas após adição de PBS, AGCC ou fMLP. Os valores representam a média ± erro padrão da média de 3 ensaios. * p< 0,05 vs controle (PBS).</p>

4.11.4 Efeito dos AGCC sobre a interação endotélio-leucócito

Os AGCC foram aplicados topicamente nas vênulas mesentéricas de ratos e avaliou-se o efeito dos mesmos sobre o rolamento e adesão de leucócitos ao endotélio por microscopia intravital. As análises (contagem do número de células rolando e aderidas) foram realizadas 10 minutos após a aplicação dos AGCC, PBS ou fMLP.

Acetato, propionato e butirato nas concentrações, respectivamente, de 25, 24 e 24 mM aumentaram o número de células rolando e aderidas ao endotélio em comparação com o grupo controle (aplicação de PBS) (Tabela 5). Em concentrações menores, os AGCC não tiveram efeito significativo sobre os parâmetros avaliados.

Tratamentos	Células rolando	Adesão	
	(valores relativos)	(valores relativos)	
Controle	98 ± 10	91 ± 5	
Acetato (25 mM)	170 ± 21*	144 ± 21*	
Propionato (12 mM)	90 ± 9	99 ± 8	
Propionato (24 mM)	170 ± 14*	135 ± 6*	
Butirato (12 mM)	92 ± 19	114 ± 10	
Butirato (24 mM)	146 ± 23*	129 ± 24*	
fMLP (10 nM)	155 ± 24*	207 ± 14*	

 Tabela 5 - Efeito dos AGCC sobre o rolamento e adesão de leucócitos ao endotélio.

Células rolando e aderidas às vênulas mesentéricas após aplicação tópica de PBS, AGCC ou fMLP. Os valores de cada experimento foram normalizados pelo número de células obtido na condição controle (PBS). Os valores representam a média \pm erro padrão da média de 5 ensaios. * p< 0,05 vs controle (PBS).

4.11.5 Efeito dos AGCC sobre a expressão de moléculas de adesão

O efeito estimulatório dos AGCC no rolamento e adesão de leucócitos ao endotélio nos levou a investigar a ação desses compostos sobre a expressão das moléculas de adesão L-selectina e β2-integrina na superfície de neutrófilos. Para tanto, neutrófilos foram pré-incubados por 4 horas na presença de acetato (25 mM), propionato (12 mM) ou butirato (12 mM). As células foram posteriormente estimuladas com fMLP e procedeu-se à mensuração de L-selectina e β2-integrina na membrana dos neutrófilos por citometria de fluxo.

A expressão de L-selectina na superfície de neutrófilos pré-incubados com AGCC ou fMLP foi significativamente maior do que nas células tratadas com PBS (Tabela 6). A expressão de β2-integrina aumentou após tratamento das células com fMLP, porém, não se observou efeito dos AGCC sobre a expressão dessa molécula de adesão (Figura 34 e Tabela 6). Não houve efeito dos AGCC sobre a expressão de L-selectina ou β2-integrina estimulada por fMLP (dados não mostrados).



Figura 34. Histograma representativo das análises por citometria de fluxo da expressão de β2-integrina and L-selectina na membrana de neutrófilos. Células estimuladas com fMLP (histogramas não preenchidos) ou não (histogramas preenchidos).

Tratamentos	L-selectina	β2-Integrina
	(valores relativos)	(valores relativos)
Controle (PBS)	1,0	1,0
Acetato (25 mM)	1,55 ± 0,30*	1,14 ± 0,08
Propionato(12 mM)	1,52 ± 0,20*	1,24 ± 0,13
Butirato (12 mM)	1,44 ± 0,24*	1,16 ± 0,11
fMLP (10 nM)	1,90 ± 0,24*	1,99 ± 0,16*
Propionato(12 mM) Butirato (12 mM) MLP (10 nM)	1,52 ± 0,20* 1,44 ± 0,24* 1,90 ± 0,24*	1,24 ± 0,13 1,16 ± 0,11 1,99 ± 0,16*

Tabela 6 - Efeito dos AGCC sobre a expressão de L-selectina e β 2-integrina na superfície de neutrófilos.

A expressão de L-selectina e β 2-integrina na superfície de neutrófilos foi avaliada por citometria de fluxo após pré-tratamento (4 horas) com PBS ou AGCC. fMLP foi usado como controle positivo. Os valores representam a média ± erro padrão da média de 3 ensaios. * p< 0,05 vs controle (PBS).

4.11.6 Efeito dos AGCC sobre o conteúdo de mRNA das moléculas de adesão (Lselectina e β2-integrina)

O conteúdo de mRNA das moléculas de adesão L-selectina e β2 integrina foi avaliado em neutrófilos previamente incubados com acetato (25 mM), propionato (12 mM) e butirato (12 mM) por 1 ou 4 horas.

Após 1 hora de incubação com os AGCC, não houve alteração no conteúdo de mRNA das moléculas de adesão em neutrófilos (Figuras 35A e 35B). Contudo, após 4 horas, houve aumento da expressão gênica de L-selectina em neutrófilos incubados na presença de acetato, propionato ou butirato e de β2 integrina nas células incubadas com propionato (Figuras 35C e 35D).



Figura 35. Expressão de mRNA das proteínas L-selectina e β2 integrina em neutrófilos de rato após incubação com AGCC por uma (A e B) ou 4 (C e D) horas. Os resultados foram corrigidos pela expressão do mRNA da β2 microglobulina (controle interno) e normalizados pelos valores obtidos na ausência de AGCC (PBS). Os valores representam a média ± erro padrão da média de 3 experimentos em duplicata. * p< 0,05 vs controle (PBS).</p>

5 DISCUSSÃO

5.1 Efeito dos AGCC sobre a produção de ERO por neutrófilos

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pelos leucócitos é essencial para o processo de defesa contra microrganismos (BABIOR, 1999; SEGAL, 2005). Na doença granulomatosa crônica, doença genética caracterizada por alteração funcional do sistema NADPH oxidase (principal via de produção de ERO em fagócitos), há maior susceptibilidade dos indivíduos a infecções bacterianas e fúngicas, evidenciando a importância das ERO na defesa do organismo (SEGAL, 1989). Além disso, as ERO participam na ativação e/ou regulação de importantes vias de sinalização celular e modulam diferentes aspectos do processo inflamatório (SUZUKI et al., 1997; FIALKOW, WANG et al., 2007). As ERO também podem ter efeitos deletérios ao organismo; o aumento de sua produção por leucócitos é um dos mecanismos que contribuem para a destruição tecidual observada em diversas patologias como na doença inflamatória intestinal (IBD) (REZAIE et al., 2007) e na artrite reumatóide (FILIPPIN et al., 2008).

Em trabalhos prévios nos quais foram analisados os efeitos dos AGCC sobre a produção de ERO por neutrófilos, foi relatada estimulação (STRINGER *et al.*, 1996; NAKAO, MORIYA et al., 1998) e inibição (EFTIMIADI, BUZZI et al., 1987; TONETTI, CAVALLERO et al., 1991; LIU et al., 2001; DIANZANI, CAVALLI et al., 2006; MILLS et al., 2006; SANDOVAL et al., 2007). Essa variação decorre em parte do uso de diferentes células, concentrações de AGCC e técnicas de avaliação da produção de ERO. Considerando a contradição entre os resultados da literatura e a falta de descrição de mecanismos envolvidos nos efeitos, avaliamos a produção de ERO em neutrófilos de ratos e alguns dos possíveis mecanismos envolvidos como, por exemplo, a modulação da expressão gênica, das concentrações intracelulares de AMP cíclico e envolvimento da proteína G.

Neste trabalho verificamos que os AGCC, particularmente o butirato, alteram a produção de ERO por neutrófilos. O butirato reduziu significativa da produção de superóxido e peróxido de hidrogênio na presença de fMLP e PMA (Figuras 9, 10 e 11). Em concordância com nossos resultados, outros autores

também demonstraram que esse ácido graxo inibe a produção de ERO por neutrófilos (EFTIMIADI, BUZZI et al., 1987; TONETTI, CAVALLERO et al., 1991; LIU, SHIMOYAMA et al., 2001; DIANZANI, CAVALLI et al., 2006; MILLS, MONTGOMERY et al., 2006; SANDOVAL, TRIVINOS et al., 2007). Tonetti et al. (1993) mostraram redução da produção de superóxido e aumento de H₂O₂ por neutrófilos humanos em resposta a um análogo do diacilglicerol (acetato de tetradecanoil-forbol ou TPA) na presenca de 30 mM de butirato. Segundo esses autores, a redução da produção de superóxido e o aumento da de peróxido de hidrogênio decorrem da diminuição do pH intracelular pelo butirato. No presente estudo não avaliamos o pH intracelular após a adição dos AGCC. Contudo, acreditamos que esse efeito não esteja envolvido uma vez que, acetato e propionato também alteram o pH intracelular de neutrófilos, causando acidificação inicial e, posterior, alcalinização, porém o efeito final desses três AGCC (acetato, propionato e butirato) na produção de superóxido é, conforme demonstrado por nós e outros autores (BRUNKHORST, KRAUS et al., 1992; MILLS, MONTGOMERY et al., 2006; SANDOVAL, TRIVINOS et al., 2007), diferente e, em alguns casos, até mesmo oposto.

Outra hipótese que justificaria o efeito do butirato sobre a produção de ERO seria a modulação da expressão gênica de componentes do sistema NADPH oxidase. Os componentes da NADPH oxidase (p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, Rac, Rap1A, p22^{phox} e gp91^{phox}) podem, sob determinadas condições, terem sua expressão modificada alterando a produção de ERO. Sabe-se, por exemplo, que neutrófilos de pacientes com mielodisplasia produzem menor quantidade de ERO em resposta a fMLP devido, ao menos em parte, a uma menor expressão de p22^{phox} e gp91^{phox} (FUHLER et al., 2003). Contudo, em nosso estudo, os AGCC não tiveram qualquer efeito sobre a expressão dos componentes da NADPH oxidase, descartando assim essa possibilidade (Figura 15). Contrário a essa hipótese (butirato modulando a expressão de componentes da NADPH oxidase e com isso alterando a produção de ERO) também está o fato de que o efeito do butirato foi observado de maneira mais intensa nos experimentos em que as células foram analisadas quanto à produção de ERO na presença deste AGCC

117

(Figuras 9 e 11) e nem tanto após pré-incubação de 4 horas (Figuras 10 e 12). Ou seja, as células foram expostas ao butirato por um período muito curto de tempo (1 hora), que pode não ser suficiente para modificar a expressão gênica.

Outra etapa crucial no processo de ativação do sistema NADPH oxidase e da produção de ERO por neutrófilos é o recrutamento das subunidades citossólicas para a membrana citoplasmática. Nesse contexto, a fosforilação da proteína p47^{phox} é um evento chave (BABIOR, 1999; SHEPPARD, KELHER et al., 2005). Essa proteína apresenta em sua estrutura guatro domínios conhecidos: domínio N-terminal homólogo ao phox (PX), domínio interno SH3, domínio autoinibitório e domínio C-terminal rico em prolina (FINAN et al., 1994; YUZAWA et al., 2004). Em repouso, o domínio SH3 permanece ligado ao domínio auto-inibitório, impedindo a interação dos domínios PX e rico em prolina com a p67^{phox} e p40^{phox} (SUMIMOTO et al., 1994). A fosforilação em serina do domínio PX, a qual pode ser decorrente da ação de diferentes guinases como a proteína guinase C (PKC), a p38 MAPK (proteína quinase ativada por mitógenos) e a fosfatidilinositol 3quinase (PI3K), permite a ativação da p47^{phox} e sua interação com os outros componentes (SHEPPARD, KELHER et al., 2005). No presente estudo, verificouse que o butirato inibiu a fosforilação da p47^{phox} (Figura 16). Esse efeito pode ser, ao menos em parte, responsável pela redução ora observada na produção estimulada de superóxido e peróxido de hidrogênio.

O receptor GPR43, que se acopla às proteínas Gi/o e Gq, pode estar envolvido nos efeitos dos AGCC sobre a produção de ERO em neutrófilos. A ativação de Gq, dentre outros efeitos, por aumentar as concentrações de cálcio intracelular e com isso a atividade da PKC, pode, conforme discutido adiante, ser o mecanismo pelo qual o acetato aumenta a produção de ERO (efeito verificado de maneira mais intensa pela técnica do vermelho de fenol, que detecta principalmente peróxido de hidrogênio) na ausência de estímulo (Figuras 9 e 10).

A proteína Gi ativa diferentes efetores como fosfolipases, canais iônicos e adenilato ciclase, enzima que converte ATP em AMP cíclico. O fato do efeito do butirato ter sido abolido pelo inibidor de Gi (toxina pertussis) (Figura 13) sugere que essa proteína deva estar envolvida na ação do butirato sobre a produção de

ERO. Sabe-se que a subunidade G α i da proteína Gi tem ação inibitória sobre a atividade da adenilato ciclase, o que, conseqüentemente, diminui a formação de AMP cíclico e a ativação da proteína quinase A (PKA). Contudo, existem ao menos nove isoformas de adenilato ciclase que, apesar de serem estimuladas pela subunidade α da proteína Gs, não são todas inibidas pela subunidade α da proteína Gs, não são todas inibidas pela subunidade α da proteína Gi (TANG e HURLEY, 1998). Em neutrófilos, a ativação da proteína Gi, por exemplo, por fMLP, leva ao aumento das concentrações de AMP cíclico e não a diminuição, como seria esperado (SIMCHOWITZ et al., 1980; SUZUKI et al., 1996; ALI et al., 1998; MAHADEO et al., 2007). Esse efeito pode ser explicado pelo fato de neutrófilos expressarem isoformas da adenilato ciclase insensíveis a G α i (HACKER et al., 1998) e pelas subunidades G $\beta\gamma$ atuarem direta ou indiretamente sobre a adenilato ciclase, estimulando-a (MAHADEO, JANKA-JUNTTILA et al., 2007).

Uma de nossas propostas para explicar o efeito do butirato sobre a produção de ERO consistia na ativação por esse AGCC do receptor GPR43, o qual está acoplado à proteína Gi e aumento das concentrações de AMP cíclico (Figura 17), que por sua vez ativa PKA, enzima que sabidamente inibe a fosforilação da p47^{phox} e a produção de ERO (BENGIS-GARBER e GRUENER, 1996). Contrário a essa hipótese, estão os resultados obtidos com o agonista sintético do receptor GPR43 (CTMB), que não apresentou qualquer efeito inibitório sobre a produção estimulada por PMA de ERO por neutrófilos (resultados preliminares não apresentados) e o fato de que os outros AGCC, acetato e propionato, que também ativam o receptor GPR43, não apresentam o mesmo efeito que o butirato. Considerando esses resultados acreditamos que o aumento de AMP cíclico decorrente da ação do butirato no GPR43 pode contribuir para a inibição de ERO nessas células, contudo outros efeitos devem participar na ação do butirato como, conforme observado em trabalho prévio (RICKARD et al., 2000), a inibição por esse AGCC da ativação de isoformas da proteína quinase C (PKC), como a PKC α e a PKC ϵ .

O butirato inibiu a produção de superóxido e peróxido de hidrogênio pelos neutrófilos em resposta a estímulos como fMLP e PMA, bem como a produção de

118

ácido hipocloroso (HOCI) (Figura 14). A maior parte do peróxido de hidrogênio formado pelos neutrófilos é consumida pela mieloperoxidase na formação de ácido hipocloroso (KETTLE et al., 1997), que é considerado por muitos autores como o principal agente de destruição de microrganismos (KLEBANOFF, 2005; SHEPPARD, KELHER et al., 2005). A redução do conteúdo de HOCI pode ser decorrente da menor disponibilidade de substrato para a mieloperoxidase (H₂O₂), redução da desgranulação dos neutrófilos, como demonstrado por Dianzani et al. (2006), e/ou da inibição dessa enzima pelo butirato, conforme sugerido por Liu et al. (2001).

O acetato, na ausência de estímulo (PMA ou fMLP), aumentou a produção de peróxido de hidrogênio (Figuras 9 e 10) pelos neutrófilos, mas não teve efeito sobre a produção de ácido hipocloroso. Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos por outros autores (MILLS, MONTGOMERY et al., 2006; MASLOWSKI, VIEIRA et al., 2009).

Dados da literatura corroboram a idéia de que o acetato poderia estimular a produção de ERO via ativação do receptor GPR43. Nakao et al. (1992) observaram que o acetato, assim como o propionato, aumenta as concentrações intracelulares de cálcio em neutrófilos e que essa ação ocorre via proteína G, uma vez que a adição de toxina pertussis (inibidor de proteína Gi) atenua o aumento de cálcio causado por propionato e acetato. O aumento de cálcio intracelular ativa a proteína quinase C, que fosforila a p47^{phox} e a p67^{phox} ativando dessa maneira o sistema NADPH oxidase. Nakao et al. (1992) também mostraram que acetato e propionato aumentam a atividade da PKC. Maslowski et al. (2009) demonstram que o acetato induz a produção de ERO via receptor GPR43, uma vez que o esse efeito foi abolido em neutrófilos obtidos de animais knockout para esse receptor. Em nosso trabalho, apesar da toxina pertussis não ter afetado a ação estimulatória do acetato, como seria de se esperar devido ao acoplamento do GPR43 a Gi, acreditamos que a ação do acetato seja via receptor GPR43 uma vez que, com o agonista desse receptor (CTMB) encontramos resultados similares aos obtidos com acetato na produção de ERO (resultados não mostrados).

O propionato não teve efeito sobre a produção de superóxido (exceção no caso da produção de superóxido estimulada por fMLP), ácido hipocloroso e a fosforilação de p47phox em neutrófilos. Trabalhos anteriores mostram que o propionato induz a formação de inositol trisfosfato (IP3) e aumenta as concentrações intracelulares de cálcio (NAKAO, MORIYA et al., 1998; SANDOVAL, TRIVINOS et al., 2007). Contudo, esse ácido graxo por si só não modifica a produção de superóxido por neutrófilos (NAKAO, MORIYA et al., 1998; SANDOVAL, TRIVINOS et al., 2007), o que de acordo com esses autores decorre do fato de que o aumento de cálcio causado por esse AGCC é insuficiente para estimular a produção de superóxido.

Uma vez que as concentrações de AGCC no trato gastrintestinal são elevadas, estes poderiam modular a produção de ERO por neutrófilos e macrófagos, os quais migram para a mucosa intestinal durante o processo inflamatório. Alterações nas concentrações dos AGCC poderiam modificar a produção de ERO no trato gastrintestinal e ser em parte responsáveis pelo desenvolvimento e/ou agravamento dos processos inflamatórios nesse tecido. Além disso, devido ao fato de as concentrações de AGCC em locais de infecções por bactérias anaeróbias serem altas (concentrações entre 10 e 30 mM), esses ácidos graxos poderiam alterar a resposta dos fagócitos às bactérias e favorecer a evasão das mesmas do sistema imune (NIEDERMAN, BUYLE-BODIN et al., 1997; NIEDERMAN, ZHANG et al., 1997).

5.2 Efeito dos AGCC sobre a produção de citocinas e NO por neutrófilos

Neutrófilos não são apenas *killers*, mas também importante fonte de citocinas como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-8 (IL-8) e o fator transformador de crescimento- β (TGF- β), que juntamente com outros mediadores como o óxido nítrico (NO) e os eicosanóides são liberados no local inflamatório e coordenam diferentes etapas do processo (CASSATELLA, 1995).

Neutrófilos recrutam e ativam outras células além de modularem não apenas o processo inflamatório, mas também a resposta immune adaptativa: por

120

exemplo, os neutrófilos produzem quimiocinas como IL-8, citocina indutora de quimiotaxia de neutrófilos (CINC-2) e proteína inflamatória de macrófagos-1 (MIP-1 α and MIP-1 β), que induzem a migração de neutrófilos, monócitos e linfócitos (CASSATELLA, 1995); TNF- α e outras citocinas produzidas por neutrófilos atuam na ativação e diferenciação de células dendríticas e macrófagos (BENNOUNA et al., 2003; TSUDA et al., 2004).

Neste trabalho, avaliou-se o efeito dos AGCC sobre a produção de quatro mediadores inflamatórios produzidos por neutrófilos: TNF- α , citocina próinflamatória com importantes efeitos locais (por exemplo, efeito *priming* sobre neutrófilos e macrófagos) e sistêmicos (liberação de proteínas de fase aguda pelo fígado, ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, supressão do apetite e indução de febre); IL-1 β , que juntamente com TNF- α e IL-6, desempenha papel crucial na indução da resposta de fase aguda no fígado e induz febre, além de agir sobre diferentes tipos celulares como neutrófilos e macrófagos estimulando a secreção de outros mediadores e dessa maneira amplificando o processo inflamatório; a quimiocina CINC-2 $\alpha\beta$ e o NO. Esse último mediador (NO) é um radical livre com ampla gama de efeitos nas células que participam do processo inflamatório incluindo vasodilatação, regulação da função de plaquetas, neutrófilos e macrófagos (HICKEY, 2001; ABBAS, 2003).

Em neutrófilos, assim como já observado em outros tipos celulares (Tabela 7), os AGCC alteram a produção de mediadores inflamatórios. No presente trabalho observou-se que propionato e butirato reduziram a produção de TNF- α , CINC-2 $\alpha\beta$ e óxido nítrico (NO) estimulada por LPS nessas células (Figuras 19 e 21). Esses efeitos decorrem, ao menos em parte, de ação a nível transcricional (Figura 22) e sobre a ativação do fator de transcrição NF κ B (Figura 23).

Tipo celular	Efeito	AGCC	Referência
Macrófago (células	↓TNF-α, IL-6, NO	Dt	(PARK, LEE et al.,
Raw 264.7)	∱IL-10	ы	2007)
Células			(USAMI et al
mononucleares do	↓ TNF-α, ↑PGE2	Bt	2008)
sangue			2000)
Monócitos e		Bt	(FUKAE et al.,
macrófagos	↓ ΠΝΙ -α		2005)
	↓IL-2, IL-4, IL-5, IL-	Pr and Bt	(KURITA-OCHIAI
	6, IL-10	FT and Dt	et al., 1995)
	↓IL-2, IFN-γ e IL-		
Linfócitos	10 (Bt)		(CAVAGLIERI,
		Ac, Pr and Bt	NISHIYAMA et al.,
	∱IFN-γ e IL-10 (Ac		2003)
	e Pr)		
		Rt	(WANG et al.,
Celulas denunticas	↓IL-12, IL-0	Di	2008)
Células humanas			
endoteliais da	↓IL-6 and PGE2	Rt	(OGAWA, RAFIEE
microvasculatura	= IL-8	Di	et al., 2003)
intestinal (HIMEC)			
Células endoteliais			
de camundongo	*NO	Bt	(MORIKAWA et
(END-D)			al., 2004)

Tabela 7 - Efeito dos AGCC sobre a produção de mediadores inflamatórios por diferentes tipos celulares.

Abreviaturas: acetato (Ac), propionato (Pr), butirato (Bt), interferon- γ (IFN- γ), interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), interleucina-12, (IL-12), óxido nítrico, (NO), prostaglandina E2 (PGE2), fator de necrose tumoral- α (TNF- α). (\uparrow) aumento, (\downarrow) redução e (=) sem efeito.

Propionato e butirato também aumentaram a produção de IL-1β por neutrófilos estimulados com LPS (Figura 19). Uma vez que o gene da IL-1β

também é regulado pelo NFkB e esses ácidos graxos inibiram a ativação desse fator, esperava-se que a expressão desta citocina, assim como ocorreu para o TNF- α , estivesse reduzida. Entretanto, verificou-se aumento da expressão de mRNA de IL-1β (Figura 22) em neutrófilos estimulados com LPS na presença de propionato e butirato. Apesar de não se saber o porquê da diferença de efeito dos AGCC sobre a expressão dos genes TNF- α e IL-1 β , que normalmente são expressos em respostas aos mesmos estímulos e têm ações redundantes, há algumas hipóteses para explicar esse achado: 1) dependência para a expressão gênica de outros fatores de transcrição, como AP-1, Cdx2 e a proteína estimuladora de ligação a CCAAT (C/EBP) isoforma β (também conhecida como NF-IL-6), os quais, em oposição ao NFκB, podem ter sua atividade aumentada na presença dos AGCC (ANDOH et al., 1999; DALMASSO et al., 2008) e 2) a hiperacetilação das histonas pode diretamente aumentar a expressão de certos genes. Ou seja, independentemente do efeito nos fatores de transcrição, a hiperacetilação aumentaria a expressão de determinados genes devido a sua ação sobre histonas. Esse efeito pode ser mais importante para alguns genes do que para outros, uma vez que os mesmos ocupam posições diferentes no DNA e podem sofrer maior ou menor influência do estado de acetilação da cromatina.

Os AGCC (acetato, propionato e butirato) inibiram a atividade de HDAC em extrato nuclear de neutrófilos, sendo que o butirato foi o mais potente, enquanto que o acetato foi o menos. As ações do propionato e butirato sobre a produção de citocinas e NO pelos neutrófilos estimulados com LPS foram mimetizadas pelo TSA (potente inibidor de HDAC), sugerindo que o mecanismo de ação desses compostos sobre neutrófilos pode envolver a inibição de HDAC.

HDAC são enzimas que juntamente com as histonas acetiltransferases (HAT) controlam o estado de acetilação das histonas. A importância da modificação covalente das histonas advém do fato de que a adição do grupo acetila em lisinas modifica a carga dessas proteínas e o espaço ocupado pelas mesmas. A cadeia lateral do aminoácido lisina possui em pH fisiológico carga positiva, o que aumenta a afinidade das histonas pelo DNA (carga negativa). Com a adição do grupo acetila à cadeia lateral, ocorre diminuição da interação do DNA

com as histonas devido à perda da carga positiva (diminuição da afinidade eletrostática) e por impedimento estérico. A conseqüência dessa modificação é maior abertura do DNA e favorecimento da ligação de fatores de transcrição, por isso, em geral, a hiperacetilação está relacionada com um aumento de expressão e a hipoacetilação com redução da transcrição gênica (VERDIN et al., 2003).

Contudo, a hiperacetilação do DNA causada pela inibição de HDAC também leva à supressão de certos genes conforme observado, por exemplo, para o fator induzido por hipóxia-1a (HIF-1a), o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e a ciclooxigenase-2 (COX-2) (KIM, KWON et al., 2001; TONG, YIN et al., 2004). Isso decorre em parte do fato de que proteínas não histonas, particularmente, fatores de transcrição, também são reversivelmente acetilados, processo esse que modula suas atividades (XU et al., 2007). Um dos fatores de transcrição cuja atividade é em parte regulada pela acetilação é o NFkB (CALAO et al., 2008). O mecanismo pelo qual os inibidores de HDAC atuam sobre a ativação do NFkB não está totalmente esclarecido, mas parece envolver diferentes etapas da via de ativação e desativação desse fator de transcrição (Figura 35): 1) redução da expressão do receptor do tipo toll-4 (TLR- 4) (BOCKER, NEBE et al., 2003) e/ou da sinalização do TLR (por exemplo, modificação na via das MAPK) (CAO et al., 2008), 2) inibição da atividade do proteassoma e da degradação do IκB (YIN et al., 2001), 3) a transcrição gênica decorrente da ativação do NFκB requerer múltiplos coativadores (CoA) como a proteína ligante do elemento responsivo ao AMP cíclico (CREBP, também conhecida como p300) (GERRITSEN et al., 1997) e o coativador do receptor de esteróides (SRC-1) (NA et al., 1998), que são histonas acetiltransferases. A ativação do NFkB também recruta correpressores (CoR), que são em grande parte proteínas HDACs (CALAO, BURNY et al., 2008). A acetilação de CoA ou CoR pode modular a eficiência do fator de transcrição em aumentar a transcrição gênica. 4) A atividade do NFkB também pode ser modulada diretamente por acetilação (CHEN et al., 2001; CALAO, BURNY et al., 2008). A acetilação de lisinas presentes na estrutura das subunidades do NFkB modula diferentes aspectos da ativação e desativação desse fator de transcrição: o recrutamento das subunidades para o promotor dos genes, a afinifidade entre NFκB e DNA, a ligação do NFκB com IκBα e a saída do fator de transcrição do núcleo para o citplasma (desativação do NFκB) (CALAO, BURNY et al., 2008) (Figura 36).

Condição controle



Via de ativação e desativação do NFKB

Figura 36. Efeito dos inibidores de HDACs sobre a ativação e desativação do fator de transcrição NFκB. Abreviaturas: butirato (Bt), coativador (CoA), correpressor (CoR), proteína ligadora de LPS (LBP), lipopolissacarídeo (LPS), propionate (Pr), tricostatina A (TSA).

Considerando-se os resultados ora apresentados e obtidos em trabalhos prévios que avaliaram o efeito dos AGCC em outros tipos celulares, acredita-se que o efeito inibitório desses ácidos graxos sobre a produção de citocinas e NO em neutrófilos decorra da ação dos mesmos sobre a atividade das HDACs que, por sua vez, modulam direta- ou indiretamente a expressão gênica (ação sobre fatores de transcrição, por exemplo), conforme descrito acima. O fato dos AGCC, particularmente o butirato, atenuarem a produção de mediadores pró-inflamatórios, à exceção da IL-1 β , por neutrófilos, pode ao menos em parte explicar os efeitos benéficos atribuídos a esses ácidos graxos no tratamento de

Inibição de HDACs

doenças inflamatórias intestinais e de outras condições como doenças neurodegenerativas com componente inflamatório, sepse e artrite reumatóide (FUKAE, AMASAKI et al., 2005; PARK et al., 2005; ZHANG et al., 2007).

5.3 Efeito dos AGCC sobre a migração de neutrófilos

A migração dos leucócitos da circulação para os tecidos envolve complexa interação destes com o endotélio, a matriz extracelular e fatores solúveis como citocinas e mediadores lipídicos que conjuntamente atuam no controle do processo. No foco inflamatório, a infiltração excessiva de neutrófilos por curto ou longo período de tempo leva a destruição e agravamento da injúria tecidual. Por outro lado, a redução da capacidade de migração dessas células para o local da injúria aumenta a suscetibilidade do organismo a infecções conforme pode ser observado, por exemplo, na deficiência de adesão leucocitária, condição caracterizada por imunodeficiência causada por alteração no processo de migração de leucócitos.

Quanto ao efeito dos AGCC sobre a migração leucocitária, nossos resultados são indicativos de que esses ácidos graxos interferem nessa etapa fundamental do processo inflamatório. Os AGCC aumentaram a quimiotaxia de neutrófilos in vitro (Figuras 26 e 27), efeito esse que também foi evidenciado por Le Poul et al. (2003). Os AGCC induzem em neutrófilos a liberação de cálcio no citoplasma, remodelamento de actina modificações morfológicas е (BRUNKHORST, KRAUS et al., 1992; NAKAO et al., 1992). Esses efeitos são inibidos pela toxina pertússica (inibidor de proteína Gi) (BRUNKHORST, KRAUS et al., 1992), indicando possível participação de receptores de membrana acoplados a proteína G. Os resultados obtidos neste trabalho utilizando o CTMB (agonista seletivo do receptor GPR43) e neutrófilos de camundongos nocautes para esse receptor indicam que o efeito quimiotático dos AGCC sobre essas células depende da ativação do receptor GPR43.

Recentemente dois trabalhos foram publicados a respeito da participação do receptor GPR43 na migração de neutrófilos (MASLOWSKI, VIEIRA et al., 2009; SINA, GAVRILOVA et al., 2009). Nesses trabalhos mostrou-se que além de estar

envolvido no efeito quimiotático *in vitro* dos AGCC em neutrófilos, o receptor GPR43 é importante para o recrutamento de neutrófilos em condições inflamatórias *in vivo*, particularmente, no trato gastrintestinal. Contudo, nesses dois trabalhos, há resultados contraditórios e conclusões opostas com relação à função do GPR43 *in vivo*. Malowski et al. (2009) mostraram que em animais nocautes para o receptor GPR43 (GPR43 KO) há exacerbação do processo inflamatório, o que sugere uma ação antiinflamatória do receptor. Contudo, Sina et al. (2009) observaram menor migração de neutrófilos para o foco inflamatório na ausência do GPR43 e sugerem que esse receptor tem efeito pró-inflamatório e sua ativação por AGCC levaria a emigração de neutrófilos para tecidos como a mucosa intestinal.

Confirmando os resultados *in vitro*, os AGCC aumentaram a migração de neutrófilos *in vivo* no ensaio da bolsa (Figura 32) e o número de células rolando e aderidas ao endotélio conforme observado por microscopia intravital (Tabela 5). Em estudos anteriores, mostrou-se que os AGCC modificam a interação entre endotélio e leucócitos. Entretanto, o foco desses estudos foi células endoteliais (ZAPOLSKA-DOWNAR, SIENNICKA et al., 2004; MILLER, ZALOGA et al., 2005) e os resultados são contraditórios. Zapolska-Downar et al. (2004) demonstraram que o pré-tratamento de células HUVEC (células endoteliais humanas da veia umbilical) com butirato inibe a expressão de VCAM-1 (molécula de adesão celular vascular-1) e ICAM-1 (molécula de adesão celular intercelular-1) induzida por TNF- α e IL-1 β , sugerindo um efeito antiinflamatório deste ácido graxo. No entanto, Miller et al. (2005), utilizando as mesmas células, mostraram que o butirato aumenta a expressão de ICAM-1 e E-selectina, mas não tem efeito sobre a expressão VCAM-1.

Em neutrófilos, os AGCC aumentaram a expressão de L-selectina, mas não tiveram qualquer efeito sobre a expressão de β2-integrinas (Figuras 34 e 35). A expressão de L-selectina na membrana é controlada transcricionalmente e por *shedding* (quebra de moléculas de L-selectina da membrana). O aumento induzido pelos AGCC na expressão de L-selectina na superfície de neutrófilos decorre, ao menos em parte, de aumento na quantidade de mRNA dessa molécula de adesão

127

(Figura 36). Esse efeito, juntamente com o aumento da expressão de E-selectina, conforme mostrado por Miller et al. (2005), pode ser responsável pela maior interação entre leucócitos e endotélio observada *in vivo* na presença dos AGCC.

A expressão de β 2-integrinas, dentre as quais as mais importantes para a adesão de neutrófilos durante a resposta inflamatória aguda são Mac-1 (macrófago-1) e LFA-1 (antígeno associado à função linfocitária-1) (DING et al., 1999), não foi modificada pelos AGCC (Figuras 34 e 35). No entanto, observou-se aumento do número de leucócitos aderidos ao endotélio, efeito esse que pode decorrer do aumento no número de neutrófilos rolando e/ou do aumento da expressão dos ligantes endoteliais das integrinas, como já demonstrado por Miller et al. (2005)

No rato, uma importante família de quimiocinas para neutrófilos é a CINC (citocinas indutoras de quimiotaxia de neutrófilos) (SHIBATA et al., 1995). Um dos componentes dessa família é a CINC-2 (também conhecida como CXCL3). Essa citocinas existe em duas isoformas, CINC-2 α e CINC-2 β , geradas por *splicing* alternativo (SHIBATA et al., 1998). Neutrófilos são tanto fonte quanto principal alvo dessas quimiocinas, cuja importância no recrutamento de neutrófilos já foi demontrado em diferentes modelos de inflamação (SHIBATA, KONISHI et al., 1995; ULICH et al., 1995; SHANLEY et al., 1997).

Os AGCC injetados na bolsa de ar aumentaram a liberação da quimiocina CINC-2αβ (Figura 33). Corroborando esse resultado, em trabalhos anteriores foi mostrado que os AGCC aumentam a produção de quimiocinas produzidas por diferentes tipos celulares: células epiteliais do cólon (WILSON et al., 1999; BOCKER, NEBE et al., 2003), células cervicais (HeLa) (ADAM et al., 2003) e células da microglia (N9) (HUUSKONEN, SUURONEN et al., 2004) e a aplicação direta de AGCC na gengiva de indivíduos saudáveis aumenta localmente as concentrações de IL-8 (principal quimiocina atraente de neutrófilos em humanos) e induz uma resposta inflamatória (ZHANG, 1996).

Os resultados ora apresentados indicam ação pró-inflamatória dos AGCC (induzem a migração de neutrófilos), o que pode decorrer tanto do efeito quimiotático direto dos AGCC sobre os neutrófilos (via receptor GPR43), quanto

128

do aumento da produção de quimiocinas como CINC-2, o que provavelmente envolve ação desses ácidos graxos sobre HDAC.

Os AGCC, conforme anteriormente descrito, são encontrados em altas concentrações no trato gastrintestinal (TGI) e em locais de infecções por bactérias anaeróbias, particularmente, na cavidade oral. No trato gastrintestinal, o aumento das concentrações de AGCC no lúmen não desencadeia processo inflamatório. Há indícios de que esses ácidos graxos apresentam efeitos antiinflamatórios no TGI, o que pode decorrer da ação dos mesmos sobre os colonócitos, macrófagos e neutrófilos presentes, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias. Contudo, em outras locais, como por exemplo, na cavidade oral ou em abscessos, os AGCC produzidos por bactérias anaeróbias podem ser responsáveis pelo inicío e ou exacerbação do processo inflamatório uma vez que eles aumentam o recrutamento de neutrófilos por ação direta (ativando o receptor GPR43) e indireta (liberação de quimiocinas), o que explicaria a correlação entre as concentrações de AGCC nos locais das infecções e a intensidade do processo inflamatório (NIEDERMAN, BUYLE-BODIN et al., 1997).

6 CONCLUSÃO

Os AGCC afetam diferentes aspectos funcionais de neutrófilos e interferem com o processo inflamatório.

- Acetato e butirato alteram a produção de ERO por neutrófilos; o primeiro aumenta a produção não estimulada de peróxido de hidrogênio, efeito esse que provavelmente envolve a ativação do receptor GPR43, enquanto que o butirato inibe a produção de ERO estimulada por fMLP ou PMA. O efeito do butirato pode envolver aumento das concentrações intracelulares de AMP cíclico via GPR43, porém essa ação não explica a inibição da produção de ERO por esse ácido graxo, uma vez que o agonista sintético do receptor GPR43 (CTMB) não apresentou tal efeito. Butirato também reduz a fagocitose e *killing* de levedura, efeito esse que pode ou não ter relação com a redução na produção de ERO.

- Os AGCC propionato e butirato reduzem a produção de TNF-α, CINC-2αβ e óxido nítrico (NO) e aumentam a síntese e liberação de IL-1β por neutrófilos estimulados com LPS. Esse efeito decorre, ao menos em parte, de ação a nível transcricional e envolve inibição da atividade de HDAC e, como consequência direta ou indireta dessa ação, atenuação da ativação do fator de transcrição NFκB.

- Os AGCC aumentam a migração de neutrófilos *in vitro* (ensaios de quimiotaxia) e *in vivo* (ensaio da bolsa e análise da interação leucócito-endotélio por microscopia intravital). Essas ações decorrem, ao menos em parte, de aumento da produção de CINC- $2\alpha\beta$ (quimioatraente para neutrófilos) pelo tecido e da ação direta dos AGCC via receptores GPR43.

Os resultados ora relatados têm implicações em diversas condições fisiológicas e patológicas como: resposta imune a bactérias anaeróbias, por exemplo, nas doenças periodontais e abcessos, na fisiologia do sistema gastrintestinal (relação entre microbiota e hospedeiro) e nas doenças inflamatórias que afetam esse sistema. Além disso, os resultados obtidos com butirato em relação à produção de mediadores inflamatórias, explicam, em parte, os efeitos benéficos atribuídos a esse ácido graxo no tratamento de doenças inflamatórias e

suportam a realização de novos estudos que visem o desenvolvimento de alternativas terapêuticas ao uso de antiinflamatórios convencionais.

REFERÊNCIAS*

ABBAS, A. K. L.; POBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003.

ADAM, E. et al. Potentiation of tumor necrosis factor-induced NF-kappa B activation by deacetylase inhibitors is associated with a delayed cytoplasmic reappearance of I kappa B alpha. **Mol. Cell. Biol.**, v. 23, n. 17, p. 6200-9, 2003.

AKANJI, A. O.; HOCKADAY, T. D. Acetate tolerance and the kinetics of acetate utilization in diabetic and nondiabetic subjects. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 51, n. 1, p. 112-8, 1990.

ALI, H. et al. Differential regulation of formyl peptide and platelet-activating factor receptors. Role of phospholipase Cbeta3 phosphorylation by protein kinase A. J. Biol. Chem., v. 273, n. 18, p. 11012-6, 1998.

ANDOH, A. et al. Counter-regulatory effect of sodium butyrate on tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-induced complement C3 and factor B biosynthesis in human intestinal epithelial cells. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 118, n. 1, p. 23-9, 1999.

BABIOR, B. M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, v. 93, n. 5, p. 1464-76, 1999.

BACKHED, F. et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 101, n. 44, p. 15718-23, 2004.

BACKHED, F. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 104, n. 3, p. 979-84, 2007.

BADOLATO, R. et al. Serum amyloid A is an activator of PMN antimicrobial functions: induction of degranulation, phagocytosis, and enhancement of anti-Candida activity. **J. Leukoc. Biol.**, v. 67, n. 3, p. 381-6, 2000.

BECKMAN, J. S. et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 87, n. 4, p. 1620-4, 1990.

BENGIS-GARBER, C.; GRUENER, N. Protein kinase A downregulates the phosphorylation of p47 phox in human neutrophils: a possible pathway for inhibition of the respiratory burst. **Cell Signal**, v. 8, n. 4, p. 291-6, 1996.

BENJAMIN, D.; JOST, J. P. Reversal of methylation-mediated repression with short-chain fatty acids: evidence for an additional mechanism to histone deacetylation. **Nucleic Acids Res.**, v. 29, n. 17, p. 3603-10, 2001.

^{*}De acordo com a Associação brasileira de Normas Técnicas NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro. 2002.

BENNOUNA, S. et al. Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. **J. Immunol.**, v. 171, n. 11, p. 6052-8, 2003.

BINDER, H. J.; MEHTA, P. Short-chain fatty acids stimulate active sodium and chloride absorption in vitro in the rat distal colon. **Gastroenterology**, v. 96, n. 4, p. 989-96, 1989.

BOCKER, U. et al. Butyrate modulates intestinal epithelial cell-mediated neutrophil migration. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 131, n. 1, p. 53-60, 2003.

BOHMIG, G. A. et al. Stable prodrugs of n-butyric acid: suppression of T cell alloresponses in vitro and prolongation of heart allograft survival in a fully allogeneic rat strain combination. **Transpl. Immunol.**, v. 7, n. 4, p. 221-7, 1999.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-54, 1976.

BROWN, A. J. et al. The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 13, p. 11312-9, 2003.

BRUNKHORST, B. A. et al. Propionate induces polymorphonuclear leukocyte activation and inhibits formylmethionyl-leucyl-phenylalanine-stimulated activation. **Infect. Immun.**, v. 60, n. 7, p. 2957-68, 1992.

CALAO, M. et al. A pervasive role of histone acetyltransferases and deacetylases in an NF-kappaB-signaling code. **Trends Biochem. Sci.**, v. 33, n. 7, p. 339-49, 2008.

CAO, W. et al. Acetylation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 inhibits Toll-like receptor signaling. **J. Exp. Med.**, v. 205, n. 6, p. 1491-503, 2008.

CASSATELLA, M. A. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. **Immunol. Today**, v. 16, n. 1, p. 21-6, 1995.

CAVAGLIERI, C. R. et al. Differential effects of short-chain fatty acids on proliferation and production of pro- and anti-inflammatory cytokines by cultured lymphocytes. **Life Sci.**, v. 73, n. 13, p. 1683-90, 2003.

CHAKRAVORTTY, D. et al. The inhibitory action of butyrate on lipopolysaccharideinduced nitric oxide production in RAW 264.7 murine macrophage cells. **J Endotoxin Res.**, v. 6, n. 3, p. 243-7, 2000. CHEN, J. S. et al. Short-chain fatty acid inhibitors of histone deacetylases: promising anticancer therapeutics? **Curr. Cancer Drug Targets**, v. 3, n. 3, p. 219-36, 2003.

CHEN, L. et al. Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation. **Science**, v. 293, n. 5535, p. 1653-7, 2001.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal. Biochem.**, v. 162, n. 1, p. 156-9, 1987.

COOK, S. I.; SELLIN, J. H. Review article: short chain fatty acids in health and disease. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 12, n. 6, p. 499-507, 1998.

COX, M. A. et al. Short-chain fatty acids act as antiinflammatory mediators by regulating prostaglandin E(2) and cytokines. **World J. Gastroenterol.**, v. 15, n. 44, p. 5549-57, 2009.

CUMMINGS, J. H. et al. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. **Gut**, v. 28, n. 10, p. 1221-7, 1987.

CUMMINGS, J. H. R.; SAKATA, T. **Physiology and clinical aspects of short chain fatty acids.** Cambridge University Press, 1995.

CURY-BOAVENTURA, M. F. et al. Effect of olive oil-based emulsion on human lymphocyte and neutrophil death. **JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.**, v. 32, n. 1, p. 81-7, 2008.

CURY-BOAVENTURA, M. F. et al. Toxicity of a soybean oil emulsion on human lymphocytes and neutrophils. **JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.**, v. 30, n. 2, p. 115-23, 2006.

DAHLEN, S. E. et al. Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 78, n. 6, p. 3887-91, 1981.

DALMASSO, G. et al. Butyrate transcriptionally enhances peptide transporter PepT1 expression and activity. **PLoS One**, v. 3, n. 6, p. e2476, 2008.

DIANZANI, C. et al. Cholesteryl butyrate solid lipid nanoparticles inhibit adhesion of human neutrophils to endothelial cells. **Br. J. Pharmacol.**, v. 148, n. 5, p. 648-56, 2006.

DING, A. H. et al. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating

cytokines and evidence for independent production. **J. Immunol.**, v. 141, n. 7, p. 2407-12, 1988.

DING, Z. M. et al. Relative contribution of LFA-1 and Mac-1 to neutrophil adhesion and migration. **J. Immunol.**, v. 163, n. 9, p. 5029-38, 1999.

DYPBUKT, J. M. et al. A sensitive and selective assay for chloramine production by myeloperoxidase. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 39, n. 11, p. 1468-77, 2005.

EDWARDS, J. C. et al. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture system. **J. Pathol.**, v. 134, n. 2, p. 147-56, 1981.

EFTIMIADI, C. et al. Short-chain fatty acids produced by anaerobic bacteria alter the physiological responses of human neutrophils to chemotactic peptide. **J. Infect.**, v. 14, n. 1, p. 43-53, 1987.

FIALKOW, L. et al. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 42, n. 2, p. 153-64, 2007.

FILIPPIN, L. I. et al. Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 152, n. 3, p. 415-22, 2008.

FINAN, P. et al. An SH3 domain and proline-rich sequence mediate an interaction between two components of the phagocyte NADPH oxidase complex. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 19, p. 13752-5, 1994.

FUHLER, G. M. et al. Reduced expression of flavocytochrome b558, a component of the NADPH oxidase complex, in neutrophils from patients with myelodysplasia. **Exp. Hematol.**, v. 31, n. 9, p. 752-9, 2003.

FUKAE, J. et al. Butyrate suppresses tumor necrosis factor alpha production by regulating specific messenger RNA degradation mediated through a cis-acting AU-rich element. **Arthritis Rheum.**, v. 52, n. 9, p. 2697-707, 2005.

GE, H. et al. Activation of G protein-coupled receptor 43 in adipocytes leads to inhibition of lipolysis and suppression of plasma free fatty acids. **Endocrinology**, v. 149, n. 9, p. 4519-26, 2008.

GERRITSEN, M. E. et al. CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 94, n. 7, p. 2927-32, 1997.

GYLLENHAMMAR, H. Lucigenin chemiluminescence in the assessment of neutrophil superoxide production. **J. Immunol. Methods**, v. 97, n. 2, p. 209-13, 1987.

HACKER, B. M. et al. Cloning, chromosomal mapping, and regulatory properties of the human type 9 adenylyl cyclase (ADCY9). **Genomics**, v. 50, n. 1, p. 97-104, 1998.

HAMPTON, M. B. et al. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood**, v. 92, n. 9, p. 3007-17, 1998.

HATANAKA, E. et al. Systematic study on ROS production induced by oleic, linoleic, and gamma-linolenic acids in human and rat neutrophils. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 41, n. 7, p. 1124-32, 2006.

HICKEY, M. J. Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of leucocyte recruitment. **Clin. Sci. (Lond)**, v. 100, n. 1, p. 1-12, 2001.

HIGUCHI, R. et al. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. **Biotechnology (N Y)**, v. 10, n. 4, p. 413-7, 1992.

HINNEBUSCH, B. F. et al. The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. **J. Nutr.**, v. 132, n. 5, p. 1012-7, 2002.

HONG, Y. H. et al. Acetate and propionate short chain fatty acids stimulate adipogenesis via GPCR43. **Endocrinology**, v. 146, n. 12, p. 5092-9, 2005.

HOOPER, L. V. et al. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 22, p. 283-307, 2002.

HUUSKONEN, J. et al. Regulation of microglial inflammatory response by sodium butyrate and short-chain fatty acids. **Br. J. Pharmacol.**, v. 141, n. 5, p. 874-80, 2004.

KANEGASAKI, S. et al. A novel optical assay system for the quantitative measurement of chemotaxis. **J. Immunol. Methods**, v. 282, n. 1-2, p. 1-11, 2003.

KASHKET, S. et al. Gingival inflammation induced by food and short-chain carboxylic acids. **J. Dent. Res.**, v. 77, n. 2, p. 412-7, 1998.

KASHKET, S. et al. Accumulation of fermentable sugars and metabolic acids in food particles that become entrapped on the dentition. **J. Dent. Res.**, v. 75, n. 11, p. 1885-91, 1996.

KETTLE, A. J. et al. Peroxynitrite and myeloperoxidase leave the same footprint in protein nitration. **Redox Rep.**, v. 3, n. 5-6, p. 257-8, 1997.

KIERNAN, R. et al. Post-activation turn-off of NF-kappa B-dependent transcription is regulated by acetylation of p65. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 4, p. 2758-66, 2003.

KIM, M. S. et al. Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. **Nat. Med.**, v. 7, n. 4, p. 437-43, 2001.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **J. Leukoc. Biol.**, v. 77, n. 5, p. 598-625, 2005.

KURITA-OCHIAI, T. et al. Volatile fatty acids, metabolic by-products of periodontopathic bacteria, inhibit lymphocyte proliferation and cytokine production. **J. Dent. Res.**, v. 74, n. 7, p. 1367-73, 1995.

KURITA-OCHIAI, T. et al. Butyric acid-induced apoptosis of murine thymocytes, splenic T cells, and human Jurkat T cells. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 1, p. 35-41, 1997.

LE POUL, E. et al. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 28, p. 25481-9, 2003.

LEE, T. et al. Identification and functional characterization of allosteric agonists for the G protein-coupled receptor FFA2. **Mol. Pharmacol.**, v. 74, n. 6, p. 1599-609, 2008.

LEY, K. Physiology of inflammation. Oxford: Oxford University Press, 2001.

LIU, Q. et al. Effect of sodium butyrate on reactive oxygen species generation by human neutrophils. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 36, n. 7, p. 744-50, 2001.

LIU, W.; SAINT, D. A. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. **Anal. Biochem.**, v. 302, n. 1, p. 52-9, 2002.

MACFARLANE, G. T. et al. Protein degradation by human intestinal bacteria. **J. Gen. Microbiol.**, v. 132, n. 6, p. 1647-56, 1986.

MACKAY, C. R. Moving targets: cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies. **Nat. Immunol.**, v. 9, n. 9, p. 988-98, 2008.

MACMICKING, J. et al. Nitric oxide and macrophage function. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 15, p. 323-50, 1997.

MAHADEO, D. C. et al. A chemoattractant-mediated Gi-coupled pathway activates adenylyl cyclase in human neutrophils. **Mol. Biol. Cell.**, v. 18, n. 2, p. 512-22, 2007.

MASLOWSKI, K. M. et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. **Nature**, v. 461, n. 7268, p. 1282-6, 2009.

MCNEIL, N. I. et al. Short chain fatty acid absorption by the human large intestine. **Gut**, v. 19, n. 9, p. 819-22, 1978.

MILLARD, A. L. et al. Butyrate affects differentiation, maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells and macrophages. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 130, n. 2, p. 245-55, 2002.

MILLER, S. J. et al. Short-chain fatty acids modulate gene expression for vascular endothelial cell adhesion molecules. **Nutrition**, v. 21, n. 6, p. 740-8, 2005.

MILLS, S. W. et al. Evaluation of the effects of short-chain fatty acids and extracellular pH on bovine neutrophil function in vitro. **Am. J. Vet. Res.**, v. 67, n. 11, p. 1901-7, 2006.

MORIKAWA, A. et al. Butyrate enhances the production of nitric oxide in mouse vascular endothelial cells in response to gamma interferon. **J. Endotoxin Res.**, v. 10, n. 1, p. 32-8, 2004.

NA, S. Y. et al. Steroid receptor coactivator-1 interacts with the p50 subunit and coactivates nuclear factor kappaB-mediated transactivations. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 18, p. 10831-4, 1998.

NAKAO, S. et al. Alteration of cytoplasmic Ca2+ in resting and stimulated human neutrophils by short-chain carboxylic acids at neutral pH. **Infect. Immun.**, v. 60, n. 12, p. 5307-11, 1992.

NAKAO, S. et al. Propionic acid stimulates superoxide generation in human neutrophils. **Cell Biol. Int.**, v. 22, n. 5, p. 331-7, 1998.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, n. 3, p. 173-82, 2006.

NICOLETTI, I. et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **J. Immunol. Methods**, v. 139, n. 2, p. 271-9, 1991.

NIEDERMAN, R. et al. Short-chain carboxylic acid concentration in human gingival crevicular fluid. **J. Dent. Res.**, v. 76, n. 1, p. 575-9, 1997.

NIEDERMAN, R. et al. Short-chain carboxylic-acid-stimulated, PMN-mediated gingival inflammation. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 8, n. 3, p. 269-90, 1997.

NILSSON, N. E. et al. Identification of a free fatty acid receptor, FFA2R, expressed on leukocytes and activated by short-chain fatty acids. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 303, n. 4, p. 1047-52, 2003.

O'DOWD, Y. M. et al. Inhibition of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-stimulated respiratory burst in human neutrophils by adrenaline: inhibition of Phospholipase A2 activity but not p47phox phosphorylation and translocation. **Biochem. Pharmacol.**, v. 67, n. 1, p. 183-90, 2004.

OGAWA, H. et al. Butyrate modulates gene and protein expression in human intestinal endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 309, n. 3, p. 512-9, 2003.

PALSSON-MCDERMOTT, E. M.; O'NEILL, L. A. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. **Immunology**, v. 113, n. 2, p. 153-62, 2004.

PARK, J. S. et al. Anti-inflammatory effects of short chain fatty acids in IFNgamma-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cells: involvement of NFkappaB and ERK signaling pathways. **Int. Immunopharmacol.**, v. 7, n. 1, p. 70-7, 2007.

PARK, J. S. et al. Repression of interferon-gamma-induced inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expression in microglia by sodium butyrate is mediated through specific inhibition of ERK signaling pathways. **J. Neuroimmunol.**, v. 168, n. 1-2, p. 56-64, 2005.

PETRI, B. et al. The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective. **J. Immunol.**, v. 180, n. 10, p. 6439-46, 2008.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **J. Immunol. Methods**, v. 38, n. 1-2, p. 161-70, 1980.

POLLANEN, M. T. et al. Bacterial metabolites sodium butyrate and propionate inhibit epithelial cell growth in vitro. **J. Periodontal. Res.**, v. 32, n. 3, p. 326-34, 1997.

RANGANNA, K. et al. Gene expression profile of butyrate-inhibited vascular smooth muscle cell proliferation. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 254, n. 1-2, p. 21-36, 2003.

REZAIE, A. et al. Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: an epiphenomenon or the cause? **Dig. Dis. Sci.**, v. 52, n. 9, p. 2015-21, 2007.

RICKARD, K. L. et al. Short-chain fatty acids reduce expression of specific protein kinase C isoforms in human colonic epithelial cells. **J. Cell. Physiol.**, v. 182, n. 2, p. 222-31, 2000.

RODRIGUEZ-CABEZAS, M. E. et al. Dietary fiber down-regulates colonic tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production in trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitic rats. **J. Nutr.**, v. 132, n. 11, p. 3263-71, 2002.

ROEDIGER, W. E.; MOORE, A. Effect of short-chaim fatty acid on sodium absorption in isolated human colon perfused through the vascular bed. **Dig. Dis. Sci.**, v. 26, n. 2, p. 100-6, 1981.

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudos de diversos fatores. . **Mem. Inst. Butantan**, v. 20, p. 315-328., 1947.

ROTSTEIN, O. D. Interactions between leukocytes and anaerobic bacteria in polymicrobial surgical infections. **Clin. Infect. Dis.**, v. 16 Suppl 4, p. S190-4, 1993.

ROTSTEIN, O. D. et al. A soluble Bacteroides by-product impairs phagocytic killing of Escherichia coli by neutrophils. **Infect. Immun.**, v. 57, n. 3, p. 745-53, 1989.

RUPPIN, H. et al. Absorption of short-chain fatty acids by the colon. **Gastroenterology**, v. 78, n. 6, p. 1500-7, 1980.

SAEMANN, M. D. et al. Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10 production. **Faseb J**, v. 14, n. 15, p. 2380-2, 2000.

SAMBROOK, J. R. **Molecular Cloning:** A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SAMPAIO, S. C. et al. Crotalus durissus terrificus snake venom regulates macrophage metabolism and function. **J. Leukoc. Biol.**, v. 70, n. 4, p. 551-8, 2001.

SAMUEL, B. S. et al. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 105, n. 43, p. 16767-72, 2008.

SANDOVAL, A. et al. Propionate induces pH(i) changes through calcium flux, ERK1/2, p38, and PKC in bovine neutrophils. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 115, n. 3-4, p. 286-98, 2007.

SAWZDARGO, M. et al. A cluster of four novel human G protein-coupled receptor genes occurring in close proximity to CD22 gene on chromosome 19q13.1. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 239, n. 2, p. 543-7, 1997.

SCAPINI, P. et al. The neutrophil as a cellular source of chemokines. **Immunol. Rev.**, v. 177, p. 195-203, 2000.

SCHEPPACH, W. et al. The contribution of the large intestine to blood acetate in man. **Clin. Sci. (Lond)**, v. 80, n. 2, p. 177-82, 1991.

SCHMID-SCHONBEIN, G. W. Analysis of inflammation. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 8, p. 93-131, 2006.

SEGAIN, J. P. et al. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. **Gut**, v. 47, n. 3, p. 397-403, 2000.

SEGAL, A. W. The electron transport chain of the microbicidal oxidase of phagocytic cells and its involvement in the molecular pathology of chronic granulomatous disease. **J. Clin. Invest.**, v. 83, n. 6, p. 1785-93, 1989.

SEGAL, A. W. How neutrophils kill microbes. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 23, p. 197-223, 2005.

SHANLEY, T. P. et al. Requirement for C-X-C chemokines (macrophage inflammatory protein-2 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant) in IgG immune complex-induced lung injury. **J. Immunol.**, v. 158, n. 7, p. 3439-48, 1997.

SHEPPARD, F. R. et al. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. **J. Leukoc. Biol.**, v. 78, n. 5, p. 1025-42, 2005.

SHIBATA, F. et al. Recombinant production and biological properties of rat cytokine-induced neutrophil chemoattractants, GRO/CINC-2 alpha, CINC-2 beta and CINC-3. **Eur. J. Biochem.**, v. 231, n. 2, p. 306-11, 1995.

SHIBATA, F. et al. Gene structure, cDNA cloning, and expression of the rat cytokine-induced neutrophil chemoattractant-2 (CINC-2) gene. **Cytokine**, v. 10, n. 3, p. 169-74, 1998.

SILER, S. Q. et al. De novo lipogenesis, lipid kinetics, and whole-body lipid balances in humans after acute alcohol consumption. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 70, n. 5, p. 928-36, 1999.

SILWOOD, C. J. et al. 1H and (13)C NMR spectroscopic analysis of human saliva. **J. Dent. Res.**, v. 81, n. 6, p. 422-7, 2002.

SIMCHOWITZ, L. et al. Induction of a transient elevation in intracellular levels of adenosine-3',5'-cyclic monophosphate by chemotactic factors: an early event in human neutrophil activation. **J. Immunol.**, v. 124, n. 3, p. 1482-91, 1980.

SINA, C. et al. G protein-coupled receptor 43 is essential for neutrophil recruitment during intestinal inflammation. **J. Immunol.**, v. 183, n. 11, p. 7514-22, 2009.
SORKIN, B. C.; NIEDERMAN, R. Short chain carboxylic acids decrease human gingival keratinocyte proliferation and increase apoptosis and necrosis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 25, n. 4, p. 311-5, 1998.

STEMPELJ, M. et al. Essential role of the JAK/STAT1 signaling pathway in the expression of inducible nitric-oxide synthase in intestinal epithelial cells and its regulation by butyrate. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 13, p. 9797-804, 2007.

STRINGER, R. E. et al. Sodium butyrate delays neutrophil apoptosis: role of protein biosynthesis in neutrophil survival. **Br. J. Haematol.**, v. 92, n. 1, p. 169-75, 1996.

SUMIMOTO, H. et al. Role of Src homology 3 domains in assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 91, n. 12, p. 5345-9, 1994.

SUZUKI, T. et al. Involvement of the beta gamma subunits of inhibitory GTPbinding protein in chemoattractant receptor-mediated potentiation of cyclic AMP formation in guinea pig neutrophils. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1313, n. 1, p. 72-8, 1996.

SUZUKI, Y. J. et al. Oxidants as stimulators of signal transduction. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 22, n. 1-2, p. 269-85, 1997.

TANG, W. J.; HURLEY, J. H. Catalytic mechanism and regulation of mammalian adenylyl cyclases. **Mol. Pharmacol.**, v. 54, n. 2, p. 231-40, 1998.

TEDELIND, S. et al. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease. **World J. Gastroenterol.**, v. 13, n. 20, p. 2826-32, 2007.

TONETTI, M. et al. Intracellular pH regulates the production of different oxygen metabolites in neutrophils: effects of organic acids produced by anaerobic bacteria. **J. Leukoc. Biol.**, v. 49, n. 2, p. 180-8, 1991.

TONG, X. et al. Butyrate suppresses Cox-2 activation in colon cancer cells through HDAC inhibition. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 317, n. 2, p. 463-71, 2004.

TOPPING, D. L.; CLIFTON, P. M. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. **Physiol. Rev.**, v. 81, n. 3, p. 1031-64, 2001.

TOWBIN, H. et al. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 76, n. 9, p. 4350-4, 1979.

TSUDA, Y. et al. Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant Staphylococcus aureus. **Immunity**, v. 21, n. 2, p. 215-26, 2004.

ULICH, T. R. et al. Intratracheal administration of endotoxin and cytokines. VI. Antiserum to CINC inhibits acute inflammation. **Am. J. Physiol.**, v. 268, n. 2 Pt 1, p. L245-50, 1995.

USAMI, M. et al. Butyrate and trichostatin A attenuate nuclear factor kappaB activation and tumor necrosis factor alpha secretion and increase prostaglandin E2 secretion in human peripheral blood mononuclear cells. **Nutr. Res.**, v. 28, n. 5, p. 321-8, 2008.

VERDIN, E. et al. Class II histone deacetylases: versatile regulators. **Trends Genet.**, v. 19, n. 5, p. 286-93, 2003.

VOGT, J. A. et al. L-Rhamnose increases serum propionate after long-term supplementation, but lactulose does not raise serum acetate. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 80, n. 5, p. 1254-61, 2004.

VOGT, J. A. et al. L-Rhamnose increases serum propionate in humans. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 80, n. 1, p. 89-94, 2004.

WANG, B. et al. Butyrate inhibits functional differentiation of human monocytederived dendritic cells. **Cell Immunol.**, v. 253, n. 1-2, p. 54-8, 2008.

WEBER, T. E.; KERR, B. J. Butyrate differentially regulates cytokines and proliferation in porcine peripheral blood mononuclear cells. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 113, n. 1-2, p. 139-47, 2006.

WILSON, A. J. et al. Interleukin-8 stimulates the migration of human colonic epithelial cells in vitro. **Clin. Sci. (Lond)**, v. 97, n. 3, p. 385-90, 1999.

WOLEVER, T. M. et al. Time of day and glucose tolerance status affect serum short-chain fatty acid concentrations in humans. **Metabolism**, v. 46, n. 7, p. 805-11, 1997.

WOLEVER, T. M. et al. Do colonic short-chain fatty acids contribute to the long-term adaptation of blood lipids in subjects with type 2 diabetes consuming a high-fiber diet? **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 75, n. 6, p. 1023-30, 2002.

WOLEVER, T. M. et al. Interaction between colonic acetate and propionate in humans. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 53, n. 3, p. 681-7, 1991.

WONG, J. M. et al. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. J. Clin. Gastroenterol., v. 40, n. 3, p. 235-43, 2006.

XU, W. S. et al. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. **Oncogene**, v. 26, n. 37, p. 5541-52, 2007.

YIN, L. et al. Butyrate suppression of colonocyte NF-kappa B activation and cellular proteasome activity. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 48, p. 44641-6, 2001.

YOSHIDA, M. et al. Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function. **Bioessays**, v. 17, n. 5, p. 423-30, 1995.

YU, Z. et al. Histone deacetylases augment cytokine induction of the iNOS gene. J. Am. Soc. Nephrol., v. 13, n. 8, p. 2009-17, 2002.

YUZAWA, S. et al. A molecular mechanism for autoinhibition of the tandem SH3 domains of p47phox, the regulatory subunit of the phagocyte NADPH oxidase. **Genes Cells**, v. 9, n. 5, p. 443-56, 2004.

ZAPOLSKA-DOWNAR, D. et al. Butyrate inhibits cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in cultured endothelial cells: the role of NF-kappaB and PPARalpha. **J. Nutr. Biochem.**, v. 15, n. 4, p. 220-8, 2004.

ZHANG, J. **Gingival inflammation induced by food and short chain carboxylic acids (DMSc thesis)**. Ph. D. Thesis (dentistry) - Harvard University, Cambridge, 1996.

ZHANG, L. T. et al. Sodium butyrate prevents lethality of severe sepsis in rats. **Shock**, v. 27, n. 6, p. 672-7, 2007.

ZHAO, G. et al. Determination of short-chain fatty acids in serum by hollow fiber supported liquid membrane extraction coupled with gas chromatography. **J Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, v. 846, n. 1-2, p. 202-8, 2007.

ZICHA, D. et al. Analyzing chemotaxis using the Dunn direct-viewing chamber. **Methods Mol. Biol.**, v. 75, p. 449-57, 1997.

ANEXOS

ANEXO A

Artigo 1 - VINOLO, M. A.; HATANAKA, E.; LAMBERTUCCI, R. H.; NEWSHOLME, P.; CURI, R. Effects of short chain fatty acids on effector mechanisms of neutrophils. **Cell. Biochem. Funct.**, v. 27, n. 1, p. 48-55, 2009.

CELL BIOCHEMISTRY AND FUNCTION Cell Biochem Funct 2009; 27: 48–55. Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com) DOI: 10.1002/cbf.1533

Effects of short chain fatty acids on effector mechanisms of neutrophils

Marco A. R. Vinolo^{1*}, Elaine Hatanaka², Rafael H. Lambertucci¹, Philip Newsholme³ and Rui Curi¹

¹Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, São Paulo University, SP, Brazil ²Biological Sciences and Health Center, Cruzeiro do Sul University, SP, Brazil ³School of Biomolecular and Biomedical Science, Conway Institute, UCD Dublin, Belfield, Dublin, Ireland

Short chain fatty acids (SCFAs) are metabolic by products of anerobic bacteria fermentation. These fatty acids, despite being an important fuel for colonocytes, are also modulators of leukocyte function. The aim of this study was to evaluate the effects of SCFAs (acetate, propionate, and butyrate) on function of neutrophils, and the possible mechanisms involved. Neutrophils obtained from rats by intraperitoneal lavage 4 h after injection of oyster glycogen solution (1%) were treated with non toxic concentrations of the fatty acids. After that, the following measurements were performed: phagocytosis and destruction of *Candida albicans*, production of ROS ($O_2^{\bullet-}$, H₂O₂, and HOCI) and degranulation. Gene expression (p47^{phox}) and protein phosphorylation (p47^{phox}) were analyzed by real time reverse transcriptase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting, respectively. Butyrate inhibited phagocytosis and killing of *C. albicans*. This SCFA also had an inhibitory effect on production of NADPH oxidase subunits (p47^{phox} and p22^{ghox}) but it was in part due to reduced levels of p47^{phox} phosphorylation and an increase in the concentration of cyclic AMP. Acetate increased the production of $O_2^{\bullet-}$ and H₂O₂ in the absence of stimuli but had no effect on phagocytosis and killing of *C. albicans*. Propionate had no effect on the parameters studied. These results suggest that butyrate can modulate neutrophil function and thus could be important in inflammatory neutrophil-associated diseases. Copyright © 2008 John Wiley & Sons, Ltd.

KEY WORDS - short chain fatty acids; reactive oxygen species; neutrophils; NADPH oxidase; inflammation

INTRODUCTION

Short chain fatty acids (SCFAs) are fermentation products of anerobic bacteria. The main SCFAs are acetate, propionate and butyrate. They are normally found in human intestine at high concentrations $(70-140 \text{ mM})^{1-3}$ and also in other sites that are associated with infections, such as periodontal disease⁴ and intra-abdominal infection.⁵ These SCFAs can regulate cell growth, differentiation, proliferation, and apoptosis.^{6–8} In particular, butyrate has been shown to have important anti-inflammatory effects on leukocytes and other cell types and can be therapeutically used for treatment of inflammatory diseases such as colitis and Crohn disease.^{9,10}

Neutrophils are the first effector cells recruited to the site of infection where they internalize, kill and digest bacteria and fungi. Binding of ligands to receptors such as complement receptor 3 (CR3) and $Fc\gamma$ on neutrophils leads to phagocytosis by a process that involves actin polymerization and insertion of new membrane. After phagosome formation, effector mechanisms are activated to kill and digest particles such as production of reactive oxygen species (ROS), oxidized halides and release of granule enzymes.¹¹

The NADPH oxidase complex plays an essential role in microbial killing. Once neutrophils are activated, the NADPH oxidase cytosolic $(p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, and RAC)$ and membrane (Rap1A and cytochrome b₅₅₈, a p22^{phox}, gp91^{phox} complex) components are reorganized. Phosphorylation of $p47^{phox}$ results in its translocation to the membrane, where cytosolic subunits bind to cytochrome b₅₅₈ to assemble the active oxidase and catalyze the electron reduction of molecular oxygen to superoxide anion.^{12,13} Superoxide (O2⁻) is quickly converted either spontaneously or via superoxide dismutase (SOD) and myeloperoxidase (MPO) action to other toxic ROS such as hydrogen peroxide (H₂O₂), hypochlorous acid (HOCI) and reactive hydroxyl radical (OH⁻). ROS together with antimicrobial proteins released by the fusion of granules act to kill and digest cells.¹¹

SCFAs are important fuels for intestinal epithelial cells but they are also modulators of leukocyte functions such as chemotaxis, oxidative burst degranulation, phagocytosis and

Copyright © 2008 John Wiley & Sons, Ltd.

^{*} Correspondence to: Marco A. R. Vinolo, Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, São Paulo University, Avenida Prof. Lineu Prestes, 1524, 05508-900 Butantã, São Paulo, SP, Brazil. Tel: 55-11-3091-7245. Fax: 55-11-3091-7285. E-mail: mramirez@icb.usp.br

killing of ingested bacteria. Production of ROS by neutrophils in the presence of SCFAs has been evaluated.^{1,4–18} Both stimulatory^{19,20} and inhibitory^{14,15,21,22} effects of these fatty acids have been reported. This discrepancy is probably due to the cell type used, different concentrations of SCFAs and the methodologies employed. However, few studies have assessed the mechanisms of action of SCFAs.

We have now evaluated the effects of the SCFAs (acetate, propionate, and butyrate) on phagocytic capacity and effector mechanisms in neutrophils such as production of ROS (O_2^{--} , H₂O₂, and HOCl) and degranulation. The possible mechanisms involved such as modulation of gene expression and changes in cyclic AMP levels were also investigated.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Bovine fetal serum, Hepes, penicillin, RPMI-1640 medium supplemented with L-glutamine, sodium bicarbonate, fatty acids, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), formylmethionyl-leucyl-phenyl-alanine (fMLP), lucigenin, forskolin, pertussis toxin and oyster glycogen were supplied by Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Stock solutions of fatty acids were prepared in phosphate buffer solution (PBS) and pH was adjusted to 7.4 with NaOH solution (1 N).

Animals

Male Wistar rats weighing 180 ± 20 g were obtained from the Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Brazil. The rats were maintained at 23°C under a light: dark cycle of 12:12 h. Food and water were given *ad libitum*. Animals were anaesthetized with ketamine (0.5 ml/kg, Vetbrands, Brazil) and xylasine (0.5 ml/kg, Vetbrands, Brazil), i.p., for all experimental procedures. The Animal Care Committee of the Institute of Biomedical Sciences approved the experimental procedure of this study.

Cells

Rat neutrophils were obtained by intraperitoneal lavage with 30 ml PBS, 4 h after the intraperitoneal injection of 10 ml freshly prepared 1% (w/v) glycogen solution (Sigma type II, from oyster) in sterile PBS. The cell suspension was centrifuged at 4°C (500 g for 10 min). The number of viable cells (>95% neutrophils) was determined in a Neubauer chamber under an optical microscope by Trypan blue exclusion. Similar procedures have been used in our previous studies.²³ Some experiments were performed using human neutrophils isolated from blood of healthy volunteers as previously described in other studies of the group.²⁴ The present study was approved by the Ethical Committee of the Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (Number 708/CEP).

Copyright @ 2008 John Wiley & Sons, Ltd.

HL-60 promyelocytic leukemia cells were also used in some experiments determination of ROS and cyclic AMP production). These cells were kindly provided by Dr Clare O'Connor (University College of Dublin). Neutrophilic differentiation was induced by exposing HL-60 cells to 1.3% dimethylsulfoxide for 5 days.²⁵

Production of reactive oxygen species

ROS production by neutrophils was evaluated by using two methods: lucigenin-enhanced chemiluminescence assay that detects superoxide,²⁴ and the assay for hipochlorous acid determination.²⁶ In the first method, two conditions were examined: production of ROS by neutrophils incubated for 1 h in the presence of SCFAs and by cells pre-treated with SCFAs for 4 h. Both PMA and fMLP were used in the assay as positive controls. Superoxide production was also evaluated after treatment of neutrophils with diphenyleneiodonium (DPI), an inhibitor of flavin containing oxidative enzymes of the NADPH oxidase complex. The cells were also treated with pertussis toxin (PTX) that is an inhibitor of Gi protein signaling pathway. Briefly, the cells were incubated for 1 h with 10 μ M DPI or 100 ng/ml PTX as described by Badolato *et al.*²⁷ and then assayed for ROS production. For evaluation of hipochlorous acid production, neutrophils were incubated in the presence of SCFAs and PMA for 30 min.

Lucigenin-enhanced chemiluminescence assay

Lucigenin-amplified chemiluminescence is a specific method to measure the kinetics of superoxide production by neutrophils.^{24,28} Briefly, lucigenin (1 mM) was added to medium containing neutrophils $(2.5 \times 10^{6} \text{ cells/ml})$. The assays were run in PBS buffer supplemented with CaCl₂ (1 mM), MgCl₂ (1.5 mM), and glucose (10 mM), at 37°C, in a final volume of 0.3 ml. Immediately afterwards, the cells were treated with the SCFAs and phorbol myristate acetate (PMA) (54 ng/ml) or fMLP (10⁻⁸ M). The same protocol was used to evaluate ROS production by neutrophils pre-incubated with SCFAs, but in this case the fatty acids were not added to the final reaction medium. The chemiluminescence response was monitored for 60 min, at 37°C, in a microplate luminometer (EG&G Berthold LB96V). In all experiments, the results were normalized by the value obtained in untreated cells (PBS).

Measurement of hypochlorous acid (HOCl) production

Production of HOCl by neutrophils was evaluated according to the method described by Dypbukt *et al.*²⁶ Briefly, neutrophils (2×10^6 /ml) were stimulated with PMA (54 ng/ml) in the presence of SCFAs at 37°C in 10 mM PBS, pH 7.4, containing NaCl (140 mM), KCl (10 mM), MgCl₂ (0.5 mM), CaCl₂ (1 mM), glucose (1 mg/ml) and taurine (5 mM). Reactions were stopped by the addition of 26.8 units/ml of catalase. The cells were then pelleted by centrifugation (5 min at 12000g). The supernatant (200 µl) was rapidly

mixed with 50 μ l of 2 mM 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), 100 μ M sodium iodide, and 10% dimethylformamide in 400 mM acetate buffer. After 5 min, absorbance was recorded at 650 nm in a plate reader and a standard curve (1–40 mM of HOCl) was used to determine the concentration of hypochlorous acid.

Cyclic AMP determination

Cyclic AMP levels were determined using a direct enzyme immunoassay kit supplied by Sigma Chemical Co. Briefly, neutrophils (3×10^6 cells) were incubated in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum for 20 min, at 37°C, in the presence of IBMX (isobutyl methyl xantine) at final concentration of 1 mM, and the SCFAs. After incubation, the cells were centrifuged at 1200 rpm for 10 min and the supernatant was discarded. Cells were then lysed with 100 μ I 0.1 M HCl. Samples were centrifuged at 600g and room temperature. The supernatant was collected and used for the assay. Cyclic AMP levels were determined according to the manufacturer's instructions. Forskolin (10 μ M), that is an activator of adenylate cyclase, was used as positive control.

Expression of NADPH oxidase components $(p22^{phox} and p47^{phox})$

The effect of SCFAs on expression of NADPH oxidase components (p22^{phox} and p47^{phox}) was evaluated in neutrophils incubated for 1 or 4 h with acetate (25 mM), propionate (12 mM), or butyrate (12 mM). Total RNA was obtained from 10⁷ neutrophils using Trizol reagentTM (Invitrogen Life Technologies, Rockville, MD, USA) as previously described by Chomczynski and Sacchi.²⁹ GPR43 mRNA expression was evaluated in rat neutrophil, undifferentiated and neutrophil differentiated HL-60 cells.

Total RNA (3 µg) was reverse transcribed to cDNA using reverse transcriptase *Revertaid*TM M-MuLV. Expression of the NADPH oxidase components was evaluated by real-time PCR using a Rotor Gene 3000 equipment (Corbett Research, Mortlake, Australia) and SYBR Green as the fluorescent dye. The sequence of the primers is shown in Table 1. Quantification of gene expression was carried out using the method described by Liu and Saint³⁰ with $\beta 2$ microglobulin (rat neutrophils) or GAPDH (HL-60 cells) genes as inner control.

p47phox phosphorylation

After 1 h of incubation at 37°C in absence or presence of SCFAs, the cells were homogenized in extration buffer (100 mM Trizma, pH 7.5; 10 mM EDTA; 100 mM NaF; 10 mM sodium pyrophosphate; 10 mM sodium orthovanadate; 2 mM phenylmethanesulfonyl fluoride; 0.01 mg/ml aprotinin) at 4°C for 30 s. After homogenization, Triton X-100 was added at 1% and samples incubated for 30 min at 4°C. Samples were centrifuged at 13 000g for 20 min at 4°C. Aliquots of supernatants (5 μ l) were used for the measurement of total protein content as described by Bradford.³¹

Equal amounts of proteins of each sample $(30 \ \mu g)$ were immunoprecipitated with the anti-p47^{phox} antibody (1:300 dilution). Immunoprecipitated samples were mixed with protein A-Sepharose for 4 h at 4°C and then submitted to electrophoresis. Immunoblotting was performed with antiphosphoserine antibody as described by Towbin *et al.*³² In all experiments, the results were normalized by the value obtained in absence of treatment (PBS).

Evaluation of phagocytosis and fungicidal activities

Phagocytosis and candidacidal activities were evaluated using the method described by Sampaio et al.33 Candida albicans (ATCC Y-537) were cultured in 7% Sabouraud dextrose broth (Mycology Laboratory, Department of Clinical Analyses, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo) at 30°C for 1 day. The fungi were centrifuged, washed twice with PBS and suspended to a concentration of $2-4 \times 10^7$ cells/ml. Viability was determined by exclusion of methylene blue 0.05% (>98%) and the number of C. albicans cells was determined in a Neubauer chamber. C. albicans cells were opsonized by incubation in the presence of rat serum for 30 min at 37°C. Neutrophils (1×10^6) were incubated for 60 min at 37°C in 1 ml RPMI-1640 medium with 10% fetal bovine serum with opsonized C. albicans $(1 \times 10^7 \text{ cells/ml})$ in the presence of SCFAs (25 mM acetate, 12 mM propionate and 12 mM butyrate). An aliquot of 200 µl of this suspension was adhered to glass cover slips with the aid of a cytocentrifuge. Cover slips were stained with the standard May-Grunwald and Giemsa solutions (Sigma Chemical Co.). For each rat, two cover slips were prepared and 100 cells per cover slip were counted. For candidacidal activity determination, viability of phagocytosed particles was assessed. Different scores were given to the number of neutrophils that had

Gene	Primer sense	Primer antisense	Annealing temperature (°C)
β2 microglobulin	CTTCAGTTCCACCCACCTCAG	GCAAGCATATACATCGGTCTCG	56
p22 ^{phox}	CAGAAGTACCTGACCGCTGTGG	GGTAGATCACACTGGCAATGGC	57
p47 ^{phox}	CACCTTCATTCGCCACATCGC	ACGCTGCCCATCATACCACCTG	58
GPR43 (rat)	CGGACTTGCTGTTGTTGCTGC	AAGCCACTCCCAGGTAGCGTTC	58
GAPDH	TGCCATCACTGCCACTC	CTGCTTCACCACCTTCTTG	56
GPR43 (human)	CGGACTTGCTGTTGTTGCTGC	AAGCCACTCCCAGGTAGCGTTC	57

Table 1. The annealing temperature and sequences of the primers used are shown

Copyright © 2008 John Wiley & Sons, Ltd.

killed none *Candida* cells (\times 0); 1 or 2 cells (\times 1); 3 or 4 cells (\times 2); or >4 cells (\times 3). The index of candidacidal activity was calculated by the sum of the scores obtained per sample.

Statistical analysis

Comparisons were performed using one-way ANOVA and Tukey test. The significance was set at p < 0.05. Results were obtained from three to four separate experiments and expressed as means \pm SEM.

RESULTS

The effect of different concentrations of the SCFAs on cell membrane integrity and DNA fragmentation in neutrophils was tested before the functional experiments in order to use non-toxic concentrations (data not shown).

Firstly, to test if the fatty acids had any interference on the lucigenin assay used to measure ROS production, the SCFAs were added to the assay mixture and chemiluminescence was then assessed. The fatty acids had no direct effect on the lucigenin assay. The involvement of NADPH oxidase in the production of ROS by neutrophils in the conditions used was then examined. There was a significant increase (100.1 \pm 2.4 to 284.5 \pm 19.7) of ROS production by neutrophils in the presence of PMA, that activates the respiratory burst by acting directly on PKC,¹³ or fMLP (100.1 \pm 2.4 to 173.6 \pm 13.4), which by binding to a specific GPCR

activates different downstream signaling and also leads to activation of NADPH oxidase.³⁴ The stimulatory effect of both PMA and fMLP was abolished by addition of the NADPH oxidase inhibitor, diphenyleneiodonium (DPI) (100.5 ± 3.7 to 132.4 ± 10.1 ; 100.5 ± 3.7 to 106.6 ± 5.8 , respectively). The results are expressed as mean \pm SEM of two experiments in duplicate.

In order to determine the effect of SCFAs on ROS production by neutrophils, we evaluated ROS production in the presence of SCFAs and after pre-treatment of the cells for 4h with these fatty acids. Butyrate (12 and 24 mM) significantly reduced superoxide production by rat neutrophils stimulated with PMA (29% and 36%, respectively) (Figure 1A) and of hydrogen peroxide (45% and 50%, respectively), as measured by horseradish peroxidase (HRP)-mediated oxidation of phenol red (data not shown). The inhibitory effect of butyrate on PMA-stimulated superoxide production was also observed in human neutrophils (reduction of 17%) and neutrophil differentiated HL-60 cells (reduction of 34%) (data not shown). There was a negative dose-response correlation between butyrate concentration and superoxide production by neutrophils stimulated with fMLP (Figure 1B); the Pearson correlation found was r = -0.98 (p = 0.01).

Acetate increased superoxide (15%) and hydrogen peroxide (65%) production by unstimulated neutrophils but had no effect in the presence of PMA or fMLP (Figure 1A and B). The stimulatory effect of acetate on



Figure 1. Effect of various concentrations SCFAs on superoxide production by rat neutrophils. Superoxide anion production was measured in the presence of SCFAs and phorbol myristate acetate (FMA) (A), formyl methionine leucine phenylalanine (fMLP) (B) or after neutrophil incubation for 4 h in the presence of SCFAs and posterior stimulation with FMA (C) and fMLP (D). Results are presented as means \pm SEM of four experiments carried out in quadruplicate. *p < 0.05 compared with PBS condition stimulated with FMA or fMLP. *p < 0.05 compared with FBS condition not stimulated. RLU: relative unit

Copyright © 2008 John Wiley & Sons, Ltd.

superoxide production was not observed in unstimulated human neutrophils and neutrophil differentiated HL-60 cells (data not shown).

Superoxide production by neutrophils pre-incubated with SCFAs for 4 h in the absence of stimuli (PMA or fMLP) did not differ from cells incubated without fatty acids. However, a significant reduction of superoxide production by neutrophils pre-incubated with butyrate (12 mM) and stimulated with PMA (Figure 1C) was observed. In cells pre-incubated with acetate (25 mM), propionate (8 and 12 mM) or butyrate (8 and 12 mM) and stimulated with fMLP, a significant reduction was also observed (Figure 1D). Hydrogen peroxide production was increased by 90% in the presence of fMLP. However, when the cells were pre-incubated with propionate (8 and 12 mM) or butyrate (8 and 12 mM) the stimulatory effect of fMLP was abolished (data not shown).

In the presence of pertussis toxin (PTX), which is an inhibitor of Goi protein activation, the inhibitory effect on superoxide production observed for butyrate treatment in the presence of PMA was abolished. PTX treatment did not interfere with the stimulatory effect of acetate on superoxide production (Figure 2).

Acetate, propionate or butyrate had no effect on HOCI production by neutrophils in the absence of PMA. Butyrate, however, as observed for superoxide and hydrogen peroxide production, attenuated the stimulatory effect of PMA (Figure 3). Acetate (10 mM), propionate (12 mM) and butyrate (12 mM) had no effect on neutrophil degranulation as evaluated by measurement of myeloperoxidase release³⁵ (data not shown).

Expression and activation of NADPH oxidase components

SCFAs, mainly propionate and butyrate, by inhibiting histone deacetylase and regulating the activation of



Figure 2. Superoxide production by rat neutrophils after treatment with pertussis toxin (PTX) and SCFAs. Superoxide anion production by neutrophils pre treated with PTX for 60 min was measured in the presence of SCFAs and phorbol myristate acetate (PMA). Results are presented as means \pm SEM of three experiments carried out in duplicate. *p < 0.05 compared with PBS condition stimulated with PMA. *p < 0.05 compared with PSS condition not stimulated RLU: Relative unit

Copyright © 2008 John Wiley & Sons, Ltd.



Figure 3. HOCl production by rat neutrophils treated with SCFAs. Cells were stimulated with PMA in the presence of acetate (25 mM), propionate (12 mM) or butyrate (12 mM) at 37°C in solution containing taurine (5 mM) for 30 min and, then taurine chloramine was determined in the supernatant using TMB. Results are presented as means \pm SEM of four experiments carried out in quadruplicate. *p < 0.05 compared with PBS condition stimulated with PMA.

transcription factors (e.g., NF_KB, NF-AT, PPAR, etc.) modulate expression of different genes such as TNF- α , IL-6 and iNOS.³⁶ In order to investigate if the effects of SCFAs on ROS production could be associated to change in expression of NADPH oxidase components, we evaluated the expression of p22^{phox} and p47^{phox} after neutrophil incubation for 1 and 4 h in the presence of the fatty acids, but no marked effect was observed (data not shown). A key step for activation of NADPH oxidase complex leading to ROS production is the p47^{phox} phosphorylation and its consequent translocation to plasma membrane.³⁷ Butyrate decreased the PMA-stimulated phosphorylation of p47^{phox} but the remaining SCFAs had no effect (Figure 4).



Figure 4. Effect of SCFAs on phosphorylation state of $p47^{\rm phos}$. Rat neutrophils were incubated with SCFAs in the presence of FMA for 30 min at $37^{\circ}{\rm C}$, and then phophorylation of $p47^{\rm phos}$ was evaluated by Western blot Results are presented as means \pm SEM of four experiments. ${}^{*}p < 0.05$ compared with PBS condition



Figure 5. Cyclic AMP levels on neutrophils in the presence of SCFAs or forskolin. Cyclic AMP was measured in the presence of the butyrate or forskolin on rat neutrophils (A) and neutrophil differentiated HL 60 cells (B). Results are presented as mean \pm SEM of three experiments carried out in duplicate. p < 0.05 compared with PBS condition

Effect of SCFAs on cyclic AMP levels

Cyclic AMP levels were measured in rat neutrophils and neutrophil differentiated HL-60 cells incubated in the presence of buyrate (12 mM). Forskolin (10 μ M) and butyrate induced a significant increase of cyclic AMP levels in both cells (Figure 5). In the presence of PTX, the increase in cyclic AMP contend induced by butyrate treatment was abolished (Figure 5A). Cyclic AMP levels were also measured in the presence of both butyrate and forskolin but no effect on cAMP levels was observed (data not shown).

G protein coupled receptor 43 (GPR 43) expression

Expression of GPR43 mRNA was detected in both rat neutrophils and HL-60 cells. Expression of GPR43 mRNA increased in neutrophil differentiated as compared with undifferentiated HL-60 cells $(4.0\pm0.3 \text{ and } 1.0\pm0.8, \text{ respectively}, n = 4)$.

Phagocytosis and killing of C. albicans

In order to determine if the SCFAs affect the neutrophil capacity to engulf and destroy microorganisms, phagocytose and killing of *C. albicans* by neutrophils treated with SCFAs (acetate 25 mM, propionate 12 mM, and butyrate 12 mM) was assessed. Butyrate decreased candidacidal and phagocytic activities of neutrophils but acetate and propionate had no effect (Table 2).

DISCUSSION

Butyrate modulated several neutrophil functions such as internalization and effector mechanisms involved in the killing of microorganisms. This fatty acid reduced phagocytosis and killing of *C. albicans* and had an inhibitory effect on production of superoxide, hydrogen peroxide and hypochlorous acid. Acetate increased the production of superoxide and hydrogen peroxide by rat unstimulated neutrophils, whereas propionate had no marked effect. No effect of the SCFAs on neutrophil degranulation was observed.

SCFAs are cytotoxic depending on the concentration, period of exposure and cell type studied.^{7,38} Sakurazawa and Ohkusa (2005)³⁹ have shown that propionate and butyrate induced cell death via apoptosis, whereas acetate caused necrosis on epithelial cells. In our study, the functional studies were performed with non-toxic concentrations of the fatty acids.

Production of ROS by neutrophils plays an important role for the defense against microorganisms.^{11,12} However, ROS can also modulate the activity of intracellular signaling pathways and control the inflammatory process.^{1,40,41} The effect of butyrate on PMA- and fMLP-induced ROS production by neutrophils was previously reported by others.^{14,17,19,21} The inhibition of ROS production by butyrate reported herein was not due to modulation of expression of NADPH oxidase components, but it was associated to reduced phosphorylation of the regulatory subunit p47phox. The inhibitory effect of butyrate on

Table 2.	Effect of t	the SCFAs on	candidacidal	and	phagocytic	activities of	f neutrophils
----------	-------------	--------------	--------------	-----	------------	---------------	---------------

Treatments	Phagocytosis capacity index (%)	Candidacidal activity (score)	
PBS	45.3 ± 3.1	79.9 ± 2.2	
Acetate (25 mM)	35.4 ± 2.7	68.3 ± 3.5	
Propionate (12mM)	38.5 ± 4.6	71.0 ± 4.3	
Butyrate (12 mM)	$28.6 \pm 3.6^{*}$	$62.8 \pm 2.8^{*}$	

Results are presented as means \pm SEM of four experiments carried out in duplicate. *p < 0.05 due to the effects of the fatty acids compared with control.

Copyright © 2008 John Wiley & Sons, Ltd.

NADPH oxidase involved Gi/o signaling pathway, since it was abolished by pertussis toxin. This result was confirmed in neutrophil differentiated HL-60 cells (data not shown).

A new subset of G protein-coupled receptors (GPR40-43) was described by Sawzdargo *et al.*⁴² GPR43 can be activated by SCFAs and is highly expressed in neutrophils and monocytes being coupled to Gi/o and Gq proteins.^{43–45} Both rat and human neutrophils (HL-60 cells) expressed GPR43 mRNA. The expression of GPR43 was increased after differentiation of HL-60 cells to neutrophils. So, the effect of butyrate on ROS production by neutrophils may occur through activation of this receptor and Gi/o protein (PTX sensitive).

The activation of Gi/o protein can, under appropriate conditions, increase the cyclic AMP (cAMP) levels in neutrophils.^{46–49} This effect is explained by the fact that neutrophils do not express adenylate cyclase isoforms sensitive to the α i subunit of G protein,⁵⁰ whereas the $\beta\gamma$ subunits can stimulate neutrophil adenylate cyclase activity.⁴⁸ This fact explains the increase of cyclic AMP levels induced by butyrate treatment in neutrophils. Activation of protein kinase A by cAMP has been shown to inhibit p47^{phox} phosphorylation.^{51,52} So, the increase of cAMP levels may be partially responsible for the inhibition of ROS production induced by butyrate. Other mechanisms by which butyrate can alter ROS production by neutrophils include modification of the cytoskeleton and intracellular pH and activation of other intracellular mediators such as Cdc42 and Rac, which involves G protein sensitive to pertussis toxin, regulating the NADPH oxidase activity.^{53,54} The precise underlying mechanisms responsible for the effect of butyrate on stimulated neutrophils remain to be fully elucidated.

Nakao *et al.*¹⁸ showed that acetate and propionate caused a dose-dependent increase of cytoplasmic calcium mobilization in human neutrophils and these fatty acids also stimulated PKC activity. The effect of acetate on ROS production reported herein may be mediated by this mechanism. However, propionate had no stimulatory effect on ROS production. In fact, it has been postulated that the intracellular calcium increase induced by propionate treatment is not enough to affect ROS production.²²

The MPO system plays an important role in the microbicidal activity of neutrophils.⁵⁵ The decreased production of HOCl could be associated to an inhibitory effect of butyrate on neutrophil degranulation as reported by Effiniadi *et al.*¹⁴ However, we were unable to show a significant effect of the SCFAs on MPO release (degranulation) by neutrophils. As the decrease in HOCl production was similar to that observed in the superoxide production, 30% and 36%, respectively. It is possible that the inhibitory effect of butyrate on superoxide production probably accounted for the reduction in HOCl generation.

The concentrations of the SCFAs can reach more than 100 mM in the gastrointestinal tract and up to 30 mM in areas of anerobic bacterial infection.^{1–5} We reported herein that butyrate modulated the production of ROS by neutrophils and its capacity to phagocytose and destroy

C. albicans. Thus, there may be a connection between disease risk and reduced ingestion of fibers that may result in low SCFA generation in the gut lumen. In fact, immunosupression has been reported in conditions and anatomical sites with high concentration of SCFAs such as oral disorders.⁴ So, it is possible that butyrate may contribute to the progression of certain inflammatory bowel diseases.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Part of the work described in this paper was performed in the University College Dublin (UCD) Ireland, as part of an EU training-site short-term fellowship supported by MNIEST (Training site in Neuroimmunology) which was awarded to MV in 2007.

REFERENCES

- Cook SI, Sellin JH. Review article: short chain fatty acids in health and disease. Aliment Pharmacol Ther 1998; 12: 499–507.
- Topping DL, Clifton PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev* 2001; **81**: 1031–1064.
- McOrist AL, Abell GC, Cooke C, Nyland K. Bacterial population dynamics and faecal short-chain fatty acid (SCFA) concentrations in healthy humans. Br J Nutr 2008: 1–9.
- Niederman R, Buyle-Bodin Y, Lu BY, Robinson P, Naleway C. Shortchain carboxylic acid concentration in human gingival crevicular fluid. *J Dent Res* 1997; 76: 575–579.
- Ladas S, Arapakis G, Malamou-Ladas H, Palikaris G, Arseni A. Rapid diagnosis of anaerobic infections by gas-liquid chromatography. J Clin Pathol 1979; 32: 1163–1167.
- Millard AL, Mertes PM, Ittelet D, Villard F, Jeannesson P, Bernard J. Butyrate affects differentiation, maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells and macrophages. *Clin Exp Immunol* 2002; 130: 245–255.
- Rabelo FL, Ramos MG, Brumatti G, et al. Apoptosis induced by butyrate is independent of Jak/STAT signaling in a fibrosarcoma cell line. Biochem Biophys Res Commun 2003; 301: 968–973.
- Hossain Z, Konishi M, Hosokawa M, Takahashi K. Effect of polyunsaturated fatty acid-enriched phosphatidylcholine and phosphatidylserine on butyrate-induced growth inhibition, differentiation and apoptosis in Caco-2 cells. *Cell Biochem Funct* 2006; 24: 159–165.
 Butzner JD, Parmar R, Bell CJ, Dalal V. Butyrate enema therapy
- Butzner JD, Parmar R, Bell CJ, Dalal V. Butyrate enema therapy stimulates mucosal repair in experimental colitis in the rat. *Gut* 1996; 38: 568–573.
- Segain JP, Raingeard de la Bletiere D, Bourreille A, et al. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. Gut 2000; 47: 397–403.
- Segal AW. How neutrophils kill microbes. Annu Rev Immunol 2005; 23: 197–223.
- 12. Babior BM. NADPH oxidase: an update. Blood 1999; 93: 1464-1476.
- Sheppard FR, Kelher MR, Moore EE, McLaughlin NJ, Banerjee A, Silliman CC. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. J Leukoc Biol 2005; 78: 1025–1042.
- Eftimiadi C, Buzzi E, Tonetti M, et al. Short-chain fatty acids produced by anaerobic bacteria alter the physiological responses of human neutrophils to chemotactic peptide. J Infect 1987; 14: 43–53.
- Tonetti M, Cavallero A, Botta GA, Niederman R, Effimiadi C. Intracellular pH regulates the production of different oxygen metabolites in

neutrophils: effects of organic acids produced by anaerobic bacteria. J Leukoc Biol 1991; 49: 180–188.

- Brunkhorst BA, Kraus E, Coppi M, Budnick M, Niederman R. Propionate induces polymorphonuclear leukocyte activation and inhibits formylmethionyl-leucyl-phenylalanine-stimulated activation. *Infect Immun* 1992; 60: 2957–2968.
- Dianzani C, Cavalli R, Zara GP, et al. Cholesteryl butyrate solid lipid nanoparticles inhibit adhesion of human neutrophils to endothelial cells. Br J Pharmacol 2006; 148: 648–656.
- Nakao S, Fujii A, Niederman R. Alteration of cytoplasmic Ca2+ in resting and stimulated human neutrophils by short-chain carboxylic acids at neutral pH. *Infect Immun* 1992; 60: 5307–5311.
- Stringer RE, Hart CA, Edwards SW. Sodium butyrate delays neutrophil apoptosis: role of protein biosynthesis in neutrophil survival. Br J Haematol 1996; 92: 169-175.
- Nakao S, Moriya Y, Furuyama S, Niederman R, Sugiya H. Propionic acid stimulates superoxide generation in human neutrophils. *Cell Biol Int* 1998; 22: 331–337.
- Liu Q, Shimoyama T, Suzuki K, Umeda T, Nakaji S, Sugawara K. Effect of sodium butyrate on reactive oxygen species generation by human neutrophils. Scand J Gastroenterol 2001; 36: 744–750.
- Sandoval A, Trivinos F, Sanhueza A, et al. Propionate induces pH(i) changes through calcium flux, ERK1/2, p38, and PKC in bovine neutrophils. Vet Immunol Immunopathol 2007; 115: 286–298.
- Lagranha CJ, Hirabara SM, Curi R, Pithon-Curi TC. Glutamine supplementation prevents exercise-induced neutrophil apoptosis and reduces p38 MAPK and JNK phosphorylation and p53 and caspase 3 expression. *Cell Biochem Funct* 2007; 25: 563–569.
- Hatanaka E, Levada-Pires AC, Pithon-Curi TC, Curi R. Systematic study on ROS production induced by oleic, linoleic, and gammalinolenic acids in human and rat neutrophils. *Free Rad Biol Med* 2006; 41: 1124–1132.
- Harris P, Ralph P. Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines. *J Leukoc Biol* 1985; 37: 407–422.
- Dypbukt JM, Bishop C, Brooks WM, Thong B, Eriksson H, Kettle AJ. A sensitive and selective assay for chloramine production by myeloperoxidase. *Free Rad Biol Med* 2005; 39: 1468–1477.
- Badolato R, Wang JM, Stornello SL, Ponzi AN, Duse M, Musso T. Serum amyloid A is an activator of PMN antimicrobial functions: induction of degranulation, phagocytosis, and enhancement of anti-Candida activity. *J Leukoc Biol* 2000; 67: 381–386.
- Gyllenhammar H. Lucigenin chemiluminescence in the assessment of neutrophil superoxide production. J Immunol Methods 1987; 97: 209– 213.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156–159.
- Liu W, Saint DA. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Anal Biochem* 2002; 302: 52-59.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248–254.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 4350–4354.
- Sampaio SC, Sousa-e-Silva MC, Borelli P, Curi R, Cury Y. Crotalus durissus terrificus snake venom regulates macrophage metabolism and function. J Leukoc Biol 2001; 70: 551–558.
- Pedruzzi E, Hakim J, Giroud JP, Perianin A. Analysis of choline and phosphorylcholine content in human neutrophils stimulated by f-Met-Leu-Phe and phorbol myristate acetate: contribution of phospholipase D and C. Cell Signal 1998; 10: 481–489.
- Rebecchi IM, Ferreira Novo N, Julian Y, Campa A. Oxidative metabolism and release of myeloperoxidase from polymorphonuclear leukocytes obtained from blood sedimentation in a Ficoll-Hypaque gradient. *Cell Biochem Funct* 2000; 18: 127-132.

- 36. Park JS, Lee EJ, Lee JC, Kim WK, Kim HS. Anti-inflammatory effects of short chain fatty acids in IFN-gamma-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cells: involvement of NF-kappaB and ERK signaling pathways. Int Immunopharmacol 2007; 7: 70–77.
- Chanock SJ, el Benna J, Smith RM, Babior BM. The respiratory burst oxidase. J Biol Chem 1994; 269: 24519–24522.
- Kalousek I, Brodska B, Otevrelova P, Roselova P. BimEL-dependent apoptosis induced in peripheral blood lymphocytes with n-butyric acid is moderated by variation in expression of c-myc and p21(WAF1). *Cell Biochem Funct* 2008; 26: 509–521.
- Sakurazawa T, Ohkusa T. Cytotoxicity of organic acids produced by anaerobic intestinal bacteria on cultured epithelial cells. *Journal of Gastroenterology* 2005; 40: 600–609.
- Fialkow L, Wang Y, Downey GP. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Rad Biol Med* 2007; 42: 153–164.
- Irani K, Goldschmidt-Clermont PJ. Ras, superoxide and signal transduction. Biochem Pharmacol 1998; 55: 1339–1346.
- Sawzdargo M, George SR, Nguyen T, Xu S, Kolakowski LF, O'Dowd BF. A cluster of four novel human G protein-coupled receptor genes occurring in close proximity to CD22 gene on chromosome 19q13.1. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 239: 543-547.
- Senga T, Iwamoto S, Yoshida T, et al. LSSIG is a novel murine leukocyte-specific GPCR that is induced by the activation of STAT3. Blood 2003; 101: 1185-1187.
- Le Poul E, Loison C, Struyf S, et al. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. J Biol Chem 2003; 278: 25481–25489.
- Brown AJ, Goldsworthy SM, Barnes AA, et al. The Orphan G proteincoupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. J Biol Chem 2003; 278: 11312– 11319.
- 46. Ali H, Sozzani S, Fisher I, et al. Differential regulation of formyl peptide and platelet-activating factor receptors. Role of phospholipase Cbeta3 phosphorylation by protein kinase A. J Biol Chem 1998; 273: 11012-11016.
- 47. Simchowitz L, Fischbein LC, Spilberg I, Atkinson JP. Induction of a transient elevation in intracellular levels of adenosine-3',5'-cyclic monophosphate by chemotactic factors: an early event in human neutrophil activation. J Immunol 1980; 124: 1482–1491.
- Mahadeo DC, Janka-Junttila M, Smoot RL, Roselova P, Parent CA. A chemoattractant-mediated Gi-coupled pathway activates adenylyl cyclase in human neutrophils. *Mol Biol Cell* 2007; 18: 512–522.
- Suzuki T, Hazeki O, Hazeki K, Ui M, Katada T. Involvement of the beta gamma subunits of inhibitory GTP-binding protein in chemoattractant receptor-mediated potentiation of cyclic AMP formation in guinea pig neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1313: 72–78.
- Hacker BM, Tomlinson JE, Wayman GA, et al. Cloning, chromosomal mapping, and regulatory properties of the human type 9 adenylyl cyclase (ADCY9). Genomics 1998; 50: 97–104.
- 51. O'Dowd YM, El-Benna J, Perianin A, Newsholme P. Inhibition of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-stimulated respiratory burst in human neutrophils by adrenaline: inhibition of Phospholipase A2 activity but not p47phox phosphorylation and translocation. *Biochem Pharmacol* 2004; 67: 183–190.
- Bengis-Garber C, Gruener N. Protein kinase A downregulates the phosphorylation of p47 phox in human neutrophils: a possible pathway for inhibition of the respiratory burst. *Cell Signal* 1996; 8: 291– 296.
- Benard V, Bohl BP, Bokoch GM. Characterization of rac and cdc42 activation in chemoattractant-stimulated human neutrophils using a novel assay for active GTPases. J Biol Chem 1999; 274: 13198– 13204.
- Diebold BA, Fowler B, Lu J, Dinauer MC, Bokoch GM. Antagonistic cross-talk between Rac and Cdc42 GTPases regulates generation of reactive oxygen species. J Biol Chem 2004; 279: 28136–28142.
- Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. J Leukoc Biol 2005; 77: 598–625.

Copyright © 2008 John Wiley & Sons, Ltd.

ANEXO B

Artigo 2 - VINOLO, M.A.R.; RODRIGUES, H.G.; HATANAKA, E.; HEBEDA, C.B.; FARSKY, S.H.; CURI, R. Short-chain fatty acids stimulate the migration of neutrophils to inflammatory sites. **Clin Sci (Lond)**., v1;117(9):331-8, 2009.



www.clinsci.org

331

Clinical Science (2009) 117, 331–338 (Printed in Great Britain) doi:10.1042/CS20080642

Short-chain fatty acids stimulate the migration of neutrophils to inflammatory sites

Marco A. R. VINOLO', Hosana G. RODRIGUES', Elaine HATANAKA',

Cristina B. HEBEDA⁺, Sandra H. P. FARSKY⁺ and Rui CURI^{*}

*Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, 05508-900, Butantä, Sao Paulo, Brazil, and †Department of Clinical and Tocicological Analyses, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, 05508-900, Butantä, Sao Paulo, Brazil

ABSTRACT

SCFAs (short-chain fatty acids) are produced by anaerobic bacterial fermentation. Increased concentrations of these fatty acids are observed in inflammatory conditions, such as periodontal disease, and at sites of anaerobic infection. In the present study, the effect of the SCFAs acetate, propionate and butyrate on neutrophil chemotaxis and migration was investigated. Experiments were carried out in rats and *in vitro*. The following parameters were measured: rolling, adherence, expression of adhesion molecules in neutrophils (L-selectin and β 2 integrin), transmigration, air pouch influx of neutrophils and production of cytokines [CINC-2 $\alpha\beta$ (cytokine-induced neutrophil chemotatractant-2 $\alpha\beta$), IL-1 β (interleukin-1 β), MIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α) and TNF- α (tumour necrosis factor- α)]. SCFAs induced *in vivo* neutrophil migration and increased the release of CINC-2 $\alpha\beta$ into the air pouch. These fatty acids increased the number of rolling and adhered cells as evaluated by intravital microscopy. SCFA treatment increased L-selectin expression on the neutrophil surface and L-selectin mRNA levels, but had no effect on the expression of β 2 integrin. Propionate and butyrate also increased in vitro transmigration of neutrophils. These results indicate that SCFAs produced by anaerobic bacteria raise neutrophil migration through increased L-selectin expression on neutrophils without the scelection expression of the scelection expression on neutrophils.

INTRODUCTION

The SCFAs (short-chain fatty acids) acetate, propionate and butyrate are norm ally found at high concentrations (70–140 mmol/l) in the human intestine [1,2]. These fatty acids are produced by anaerobic bacterial ferm entation. Increased concentrations of SCFAs are observed in inflamm atory conditions, such as periodontal disease [3,4], and at sites of anaerobic infection [5,6]. These compounds have been implicated in the initiation and prolongation of these inflammatory processes [7]. In opposition to the view that SCFAs act as potentiating agents of inflammation, these fatty acids have been shown to inhibit the production of pro-inflammatory cytokines by isolated macrophages [8]. Results from our group reinforce the anti-inflammatory effect of these compounds. Propionate and butyrate inhibited LPS (lipopoly saccharide)-stimulated production of cytokines by isolated neutrophils (M.A.R. Vinolo, H.G. Rodrigues, E. Hatanaka and R. Curi, unpublished work). We have also observed a reduction in phagocytosis and production of ROS (reactive oxygen species) by neutrophils after

Correspondence: Mr Marco A.R. Vinolo (email mramirez@icb.usp.br).

Key words anaerobic bacterium, chemotaxis, inflammation, neutrophil, short-chain fatty acid.

Abbreviations A P-1, activator protein -1; CINC, cytokine-induced neutrophil chemoattractant; fMLP, N-formylmethionyl-leucylphenylalanine; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; IL, interleukin; LFA-1, lymphocyte function-associated antigen-1; LPS, lipopolysaccharide; MIP-1α, macrophage inflammatory protein -1α; NF-κ B, nuclear factor κ B; ROS, reactive oxygen species; SCFA, short-chain fatty acid; TNF-α, tumour necrosis factor α; VCAM-1, vascular cell-adhesion molecule-1.

Г

treatment with butyrate [9]. Therefore pro- and antiinflammatory properties of SCFAs have been reported.

Migration of neutrophils from the blood stream to inflamed tissue is one of the main steps that takes place in the inflammatory process. Neutrophil rolling along the endothelial cell surface and activation of chemoattractant receptors on the neutrophil membrane, followed by firm adhesion to vessel walls and transmigration through the endothelium, are involved in the neutrophil migration process. Cell-adhesion molecules such as selectins (E-, P- and L-selectins), integrins [LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1), Mac-1 and CD11c] and their counter-ligand molecules [specific carbohydrates, VCAM-1 (vascular cell-adhesion molecule-1), ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) and others] play a central role in rolling and adhesion of neutrophils to the endothelium. Owing to the key participation of these molecules in the neutrophil migration process, they have been studied as possible targets for the development of a new class of anti-inflammatory drugs [10].

The effect of SCFAs has been addressed in different steps of the inflammation process, such as the production of cytokines and ROS; however, there is not enough information about the effect of these fatty acids on the migration of neutrophils to inflammatory sites. In the present study, the effect of acetate, propionate and butyrate on neutrophil chemotaxis and migration has been investigated. Experiments were carried out in rats and *in vitro*, and the following parameters were measured: rolling, adherence, transmigration, air pouch influx of neutrophils, production of cytokines [CINC-2 $\alpha\beta$] (cytokine-induced neutrophil chemoattractant- $2\alpha\beta$), IL-1 β (interleukin-1 β), MIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α) and TNF- α (tumour necrosis factor- α)] and the expression of adhesion molecules in neutrophils (L-selectin and $\beta 2$ integrin).

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Bovine fetal serum, Hepes, penicillin, RPMI 1640 medium supplemented with L-glutamine, sodium bicarbonate, fatty acids, oyster glycogen and fMLP (*N*formylmethionyl-leucyl-phenylalanine) were supplied by Sigma. Stock solutions of fatty acids were prepared in PBS and the pH was adjusted to 7.4 with 1 mol/l NaOH.

Animals

Male Wistar rats weighing 180 ± 20 g were obtained from the Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil. The rats were maintained at 23 °C under a 12/12 h light/dark cycle. Food and water were given *ad libitum*. Animals were anaesthetized with intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (65 mg/kg of body weight) for all experimental procedures. The Animal Care Committee of the Institute of Biomedical Sciences approved the experimental procedure of this study.

Air pouch assay and exudate preparation

In order to evaluate the effect of SCFAs on *in vivo* cell migration, the air pouch assay was used. Induction of rat skin air pouches was performed according to the method described by Edwards et al. [11]. Briefly, 20 ml of sterile air (using $0.22 \,\mu$ m fluoropore filters) was insufflated into the subcutaneous tissue of the back trunk of rats under anaesthesia. At 7 days later, an additional 10 ml of sterile air was insufflated and, then, 1 ml of a solution of acetate (25 mmol/l), propionate (12 mmol/l) or butyrate (12 mmol/l) in sterile PBS was injected into the pouch under anaesthesia and aseptic conditions. Negative controls received 1 ml of sterile PBS plus fMLP (10 nmol/l) through the same route.

At 4 h after the injection of the fatty acids, the animals were killed by decapitation and the inflammatory exudate was collected after washing the cavity with 2 ml of sterile PBS. The suspension was centrifuged at 500 g for 10 min at 4 °C. Cells were counted in a Neubauer chamber, and the cytocentrifuged smears were stained with standard May-Grunwald and Giemsa solutions (Sigma). Differential cell counts were performed on 100 cells/slide. Results are expressed as the fractional change in the number of cells that were collected under control conditions (PBS without fMLP). The supernatant was assayed for CINC- $2\alpha\beta$, TNF- α , MIP-1 α and IL-1 β by ELISA (DuoSet; R&D System), according to the supplier's instructions.

Intravital microscopic assay

Rats were anaesthetized and the mesentery was externalized. After surgery, the animals were kept on a board thermostatically controlled at 37 °C that included a transparent platform on which the tissue to be transilluminated was placed. The preparation was kept moist and warmed by irrigating the tissue with warmed Ringer-Locke solution [154 mmol/l NaCl, 5.6 mmol/l KCl, 2 mmol/l CaCl₂·2H₂O, 6 mmol/l NaHCO3 and 5 mmol/l glucose (pH 7.2-7.4)] containing 1 % (w/v) gelatin. The rate of the solution outflow on to the exposed tissue was controlled to keep the preparation in continuous contact with a film of liquid. Transilluminated images were obtained by optical microscopy (Axioplan II equipped with $5.0/0.30 \times$ plan-neofluar or 10.0/0.25× Achroplan longitudinal distance objectives/numeric aperture and 1.0, 1.25 or $1.60 \times$ optovar; Carl Zeiss). The images were captured on a video camera (ZVS, 3C75DE; Carl Zeiss) and were transmitted simultaneously on to a TV monitor and computer. Images obtained on the TV monitor were recorded on video tape. Digitized images were subsequently analysed by using image-analysis software (KS 300; Kontron).

Table I	Annealing	temperature	and	sequences	of the	primers	used
---------	-----------	-------------	-----	-----------	--------	---------	------

	Primer		
Gene	Sense	Antisense	Annealing temperature
β_2 -Microglobulin	5'-CTCAGTTCCACCCACCTCAG-3'	5'-GCAAGCATATACATCGGTCTCG-3'	56 °C
L-Selectin	5'-AAATGTGGACATGGGTGGGAAC-3'	5'-CCTTGGACTTCTTGTTGTTGGG-3'	54 °C
eta2 Integrin	5'-TGGCACACAAACTTTCCGAGAG-3'	5'-TAGGTGACTTTCAGGGTGTCCG-3'	57 °C

Leucocyte-endothelial interaction

The interaction between leucocytes and vessel walls was evaluated by determining the number of rolling and adhered leucocytes to the post-capillary venule wall (20–30 μ m in diameter and 200 μ m in length) of the mesentery at 10-min intervals. Three fields were evaluated in each animal after application of 10 μ l of fatty acids. Leucocytes moving in the peripheral of the axial stream, in contact with the endothelium, were considered to be rollers [12]. These leucocytes moved sufficiently slowly to be individually visible and were counted as they rolled past a selected point on one side of the vessel during 10 min after the fatty acid addition. The number of leucocytes adhered to the endothelium (stopped at the vessel wall) was determined in the same vascular segment after 10 min of the fatty acid addition.

Expression of adhesion molecules (L-selectin and β 2 integrin) evaluated by flow cytometry

In order to estimate L-selectin or $\beta 2$ integrin expression, leucocytes were collected with EDTA (100 mg/ml) from blood obtained from the abdominal aorta. Neutrophils were isolated using a Histopaque gradient. A 3 ml sample of Histopaque-1077 was placed in a tube and the same volume of whole blood was carefully layered on to the separation medium. The tube was then centrifuged at 400 g at 4 °C for 30 min. At the end of the centrifugation, three distinct phases were formed. The upper two phases (plasma, mononuclear cell and Histopaque-1077) were discarded and the lower one, which was rich in neutrophils and erythrocytes, was resuspended in PBS. Erythrocyte lysis was performed using an ammonium chloride solution (0.13 mol/l), and leucocytes were recovered after washing with PBS. Using this methodology for separation, rich neutrophil preparations (>90% of leucocytes) were obtained as evaluated by microscopy.

Cells (1.0×10^6) were pre-incubated for 4 h with acetate (25 mmol/l), propionate (12 mmol/l) or butyrate (12 mmol/l) and were then stimulated with fMLP (10 nmol/l during 10 min for L-selectin and 30 min for $\beta 2$ integrin evaluation). After washing, leucocytes were incubated further for 30 min at 4°C in the dark with 10 μ l of a monoclonal antibody against L-selectin or $\beta 2$ integrin. Immediately after incubation, cells were analysed in a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson). Data from 10000 cells were obtained and only morphologically viable neutrophils were considered for analysis.

Expression of L-selectin and β 2 integrin mRNA

The effect of SCFAs on mRNA levels of adhesion molecules (L-selectin and $\beta 2$ integrin) was evaluated in elicited neutrophils. Rat neutrophils were obtained by intraperitoneal layage with 40 ml of PBS 4 h after the intraperitoneal injection of 10 ml of freshly prepared 1% (w/v) oyster glycogen (Type II) solution in sterile PBS. The cell suspension was centrifuged at 4°C (500 g for 10 min). The number of viable cells (>95% neutrophils) was determined in a Neubauer chamber under an optical microscope by Trypan Blue exclusion. Neutrophils were incubated for 1 or 4 h with acetate (25 mmol/l), propionate (12 mmol/l) or butyrate (12 mmol/l). Total RNA was obtained from 1.5×10^7 neutrophils using TRIzol[®] reagent (Invitrogen) as described previously [13].

Total RNA (3 μ g) was reverse-transcribed to cDNA using the reverse transcriptase *Revertaid*TM M-MuLV. Expression of L-selectin and $\beta 2$ integrin was evaluated by real-time PCR [14] using Rotor Gene 3000 equipment (Corbett Research) and SYBR Green as the fluorescent dye. The sequence of the primers is shown in Table 1. Evaluation of gene expression was carried out using the method described by Liu and Saint [15], with the β_2 -microglobulin gene as an internal control.

Transmigration assay

Adult male rats were killed by decapitation without anaesthesia. Neutrophils were obtained by intraperitoneal lavage, 4 h after the intraperitoneal injection of 10 ml of sterile 1% (w/v) oyster glycogen (Type II) solution in PBS. This treatment induces a substantial migration of neutrophils (>95%) to the intraperitoneal cavity with little contamination by monocytes. Neutrophil chemotactic responses were tested using 96-well disposable chemotactic plates (Neuroprobe), according to the manufacturer's instructions. Briefly, flat-bottomed chambers were filled with the chemotactic agent fMLP (10 nmol/l) in PBS containing 0.01% albumin or with PBS containing 0.01% albumin only. Chemotactic membranes with a pore size of 5 μ m were fixed to the



Figure 1 Neutrophil influx into air pouches after injection of PBS, SCFAs or fMLP

Values are means \pm S.E.M. of six animals per group and are presented as the fractional change (treatment value/control value). *P < 0.05 compared with control (PBS).

filter seat and a suspension of neutrophils $(2.5 \times 10^6 \text{ cells/} \text{ml})$, pre-treated for 4 h with SCFAs, was added to the top of each well. The chamber assembly was incubated in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C for 60 min. After incubation, neutrophils were counted in a Neubauer chamber. The chemotactic factor fMLP (10 nmol/l) was used as a positive control for migration. Results were normalized by the number of cells that transmigrated under control conditions (PBS without fMLP).

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out by comparing the control group with the SCFA-treated groups. ANOVA with a Dunnett's test (Graph Pad Prism 4.0 Software) was used for comparison between the treated groups and the controls. The significance level was set at P < 0.05.

RESULTS

The number of cells that migrated to the air pouches was determined 4 h after the injection of the SCFAs, the positive control (fMLP) or PBS. Cells collected from the pouches consisted mainly of neutrophils (>90%). fMLP treatment increased leucocyte migration to the air pouches in comparison with PBS (1.98×10^6 cells compared with 0.15×10^6 respectively). Significant cell influx into the pouches was induced by the SCFAs. Cell migration was increased 6-, 10- and 13- fold for acetate, propionate and butyrate respectively (Figure 1). The amount of cytokines (CINC-2 $\alpha\beta$, IL-1 β , TNF- α and MIP-1 α) released into air pouches was also determined. No effect of the SCFAs on IL-1 β , TNF- α and MIP-1 α release was observed (control values, 514 \pm 11 pg/ml for IL-1 β , 956 \pm 51 pg/ml for TNF- α and 77 \pm 30 pg/ml for MIP-1 α). However, CINC-2 $\alpha\beta$ release into the pouches was increased



Figure 2 CINC- $2\alpha\beta$ release into air pouches after injection of PBS, SCFAs or fMLP

Values are means \pm S.E.M. of six animals per group. *P < 0.05 compared with control (PBS).

Table 2 Effect of SCFAs on neutrophil rolling and adherence Rolling and adherence of neutrophils in mesenteric venules were analysed after topical application of PBS, SCFAs or fMLP. Values are means \pm S.E.M. of five animals per group. **P* < 0.05 compared with control (PBS).

Treatment	Rolling (% change)	Adherence (% change)
Control	98±10	91±5
Acetate		
25 mmol/l	170±21*	144±21*
Propionate		
12 mmol/1	90±9	99±8
24 mmol/1	$170 \pm 14^{*}$	135±6*
Butyrate		
12 mmol/1	92 ± 19	114 ± 10
24 mmol/l	146 ± 23*	129 ± 24*
fMLP		
10 mmol/1	$155 \pm 24^{*}$	$207 \pm 14^{*}$

1.7-, 3.8- and 2.7-fold by acetate, propionate and butyrate respectively (Figure 2). No difference was found between the effect of fMLP, a classical neutrophil chemoattractant agent [16], and that of propionate or butyrate on cell migration (Figure 1) or CINC- $2\alpha\beta$ release (Figure 2). No difference in cell migration was observed between fMLP alone or fMLP plus SCFAs (results not shown).

In order to evaluate the effect of SCFAs on leucocyteendothelial cell interactions, these fatty acids were topically applied on to mesentery venules. Rolling and adherence of leucocytes to endothelium was evaluated using transilluminated images obtained by optical microscopy. The analyses were made 10 min after SCFA, PBS or fMLP application. The number of rolling cells was counted during 10 min. Acetate (25 mmol/l), propionate (24 mmol/l) and butyrate (24 mmol/l) significantly increased the number of rolling and adhered cells compared with the control group (Table 2).

The stimulatory effect of the fatty acids on neutrophil migration led us to examine L-selectin and $\beta 2$ integrin expression on the neutrophil surface. These adhesion

L-selectin and $\beta 2$ integrin expression was evaluated by flow cytometry after pre-treatment (4 h) with PBS or SCFAs. fMLP was used as a positive control. Values are means \pm S.E.M. of the fractional changes (treatment value/control value) of three experiments. *P < 0.05 compared with control (PBS).

Treatment	β 2 Integrin	L-Selectin	
Control	1.0	1.0	
Acetate (25 mmol/l)	1.14 ± 0.07	$1.51 \pm 0.23^{*}$	
Propionate (12 mmol/l)	1.21 ± 0.10	$1.41 \pm 0.23^{*}$	
Butyrate (12 mmol/l)	1.08 ± 0.09	1.41 ± 0.17*	
fMLP (10 nmol/l)	1.90 ± 0.18*	1.89 <u>±</u> 0.19*	

molecules are expressed on leucocytes and play a key role in leucocyte rolling and adhesion to the endothelium. Neutrophils were pre-incubated for 4 h in the presence of the SCFAs. Cells were then stimulated with fMLP and the abundance of L-selectin and $\beta 2$ integrin on the neutrophil surface was evaluated by flow cytometry. L-Selectin expression on the surface of neutrophils pretreated with SCFAs for 4 h was higher than in control cells (PBS) not treated with fMLP (Table 3). Stimulation of neutrophils with fMLP also increased the expression of L-selectin (Table 3). The stimulatory effect of SCFAs on L-selectin was not observed when neutrophils were incubated for 1 h (results not shown). $\beta 2$ integrin expression was increased with fMLP treatment, but no effect of the SCFAs was observed (Figure 3).

The results obtained by flow cytometry led us to evaluate L-selectin and $\beta 2$ integrin mRNA expression after 1 and 4 h of pre-incubation with the fatty acids. No effect of the SCFAs on L-selectin and $\beta 2$ integrin mRNA expression was observed after 1 h incubation (results not shown); however, there was a significant increase in L-selectin mRNA levels by 2.0-, 2.2- and 3.2-fold in comparison with controls after incubation of neutrophils with acetate, propionate or butyrate respectively, for 4 h. $\beta 2$ integrin mRNA expression was not affected by the treatments with the fatty acids.

Previous studies have shown that the SCFAs induce chemotaxis of neutrophils [17]. Therefore we examined neutrophil chemotactic responses after pre-treatment (4 h at 37° C) with acetate (10 and 25 mmol/l), propionate (4, 8 and 12 mmol/l) and butyrate (4, 8 and 12 mmol/l). Our results indicated that 25 mmol/l acetate (Figure 4A), 12 mmol/l propionate (Figure 4B) and 4, 8 and 12 mmol/l butyrate (Figure 4C) enhanced neutrophil chemotaxis. The values obtained were higher than those observed in response to vehicle and were equivalent to neutrophil migration induced by fMLP, which was used as the positive control. However, pre-treatment of neutrophils with SCFAs did not interfere with the fMLP effect (Figure 4).



Figure 3 Representative traces from flow cytometric analyses of β 2 integrin and L-selectin expression on the membrane surface

Open trace, cells stimulated with fMLP; dosed trace, cells not stimulated with fMLP. Ac, acetate; Pr, propionate; Bt, butyrate.

DISCUSSION

Our findings support the hypothesis that SCFAs interfere with a key step in the inflammatory process, namely neutrophil migration. SCFAs induced neutrophil migration *in vivo*, and this effect was associated with an increased production of the chemoattractant cytokine CINC- $2\alpha\beta$ and the increased expression of L-selectin on the neutrophil surface. These fatty acids also increased *in vitro* transmigration of neutrophils. These results indicate that SCFAs produced by anaerobic bacterial fermentation increase neutrophil migration, exacerbating the inflammatory process.

SCFAs induce morphological changes and cell polarization, Ca^{2+} release and actin cytoskeleton remodelling in incubated neutrophils [18,19]. These effects involve activation of GPR43 (G-protein-coupled receptor 43), an SCFA membrane receptor [17,20]. Activation of this receptor, which is coupled to $G_{i/o}$ and G_q proteins, has been shown to increase intracellular Ca^{2+} concentrations and to induce neutrophil chemotaxis [17]. In agreement with T



Figure 4 Effect of acetate (A), propionate (B) and butyrate (C) on neutrophil transmigration Values are means \pm S.E.M. of four experiments performed in duplicate *P < 0.05 compared with control (PBS). Ac, acetate; Pr, propionate; Bt, butyrate.

these observations, pre-treatment with acetate, propionate or butyrate increased neutrophil migration *in vitro*.

Confirming the effect observed in vitro, SCFAs increased the migration of neutrophils to the air pouch, and the number of rolling and adhered cells, as observed by intravital microscopy. The interaction between endothelial cells and neutrophils plays a key role in the recruitment of these latter cells to the inflamed tissue. Previous studies have shown the effect of SCFAs on this interaction, but the focus of these studies was the endothelial cells [21,22] and conflicting results have been reported. Zapolska-Downar et al. [21] have shown that pre-treatment of HUVECs (human umbilical vein endothelial cells) with butyrate inhibits the expression of VCAM-1 and ICAM-1 induced by TNF- α and IL-1 β , suggesting an antiinflammatory effect of this fatty acid. However, Miller et al. [22], using the same cells, showed that butyrate increased the expression of ICAM-1 and E-selectin, but had no effect on VCAM-1 expression. In the present study, we have shown that SCFAs increase neutrophil surface expression of L-selectin, but not of $\beta 2$ integrin.

L-Selectin, an adhesion molecule constitutively expressed on leucocytes, together with E- and P-selectins expressed on endothelial cells, is responsible for the initial step of tethering and rolling of leucocytes on the endothelium. The expression of this adhesion molecule on the membrane surface is controlled by transcriptional regulation and shedding. SCFAs augmented L-selectin surface expression, an effect at least in part related to an increase in mRNA expression. This effect, together with increased E-selectin expression, as shown by Miller et al. [22], may be responsible for the enhanced leucocyte rolling activity observed *in vivo* in the presence of the SCFAs.

Expression of $\beta 2$ integrins, of which the most important for neutrophil adhesion during acute inflammatory responses are Mac-1 (macrophage-1) and LFA-1 [23], were not modified by the SCFAs. However, an increased number of adhered leucocytes on the endothelium was observed in the intravital microscopic assay. This effect may result from the increased number of rolling neutrophils and/or the increased expression of the endothelial ligand ICAM-1, as shown previously by Miller et al. [22].

In rats, an important family of chemokines is termed CINC [24]. CINC-2 is one of the chemokines within this family. There is one CINC-2 gene, with CINC-2 α and CINC-2 β arising by alternative RNA splicing [25]. Neutrophils are both a source and a target of CINC-2. In vitro, rat CINC has been shown to be a potent neutrophil chemoattractant agent [24], and in vivo it mediates neutrophil accumulation in different models of inflammation by increasing the emigration and activation of neutrophils [26,27]. Nakagawa et al. [28] have shown that LPS-stimulated rat macrophages produce CINC-2a as a major chemoattractant agent for neutrophils. In the present study, SCFAs enhanced the release of CINC- $2\alpha\beta$ into the air pouch. This effect can account, at least in part, for the increased migration of neutrophils to the air pouch. Other studies have shown that these fatty acids increase the production of chemokines by different cell types, such as colonic epithelial cell lines [29,30], cervical cells (HeLa) [31] and a microglial cell line (N9) [32]. CINC- $2\alpha\beta$ expression is regulated by transcription factors such NF- κ B (nuclear factor κ B) and AP-1 (activator protein-1) [25]. Activation of both NF-KB [31,33] and AP-1 [34] is modulated by SCFAs. Thus the increased release of CINC-2 $\alpha\beta$ possibly occurs due to an enhancement of the activation of these transcription factors by SCFAs.

Concentrations of SCFAs used in the present study (acetate up to 25 mmol/l, propionate up to 24 mmol/l and butyrate up to 24 mmol/l) are higher than those described by Niederman et al. [3] for gingival crevices in period ontal subjects. However, other studies in which SCFAs were measured in culture filtrates of anaerobic bacteria or at the sites of anaerobic bacterial infection have shown higher concentrations of these fatty acids than the ones used in the present study. Filtrates from *Porphyromonas* gingivalis, *Prevotella loescheii* and *Fusobacterium nucleatum* cells contain from 0.6–19.1 mmol/l propionate and 13.3–26.8 mmol/l butyrate [4]. Rotstein et al. [35] also measured concentrations of SCFAs in filtrates of Bacteroides fragilis and found concentrations higher than 40 mmol/l. Concentrations of SCFAs in excess of 30 mmol/l have also been measured in clinical abscesses [36]. Mills et al. [6], with the aim of determining whether foot-rot-causing bacteria produced SCFAs in clinically relevant quantities, measured acetate, propionate and butyrate in cultured anaerobic bacteria. Concentrations as high as 25.3, 25.4 and 10.4 mmol/l for acetate, butyrate and propionate respectively, after incubation for 72 h were found [6].

In spite of the fact that SCFAs had a pro-inflammatory effect in our present experimental conditions, antiinflammatory actions of these fatty acids have also been observed in other conditions. The inconsistencies of the results can be associated with the use of different concentrations of SCFAs, pH and cell types. Stempelj et al. [37] have shown that butyrate increases the expression of iNOS (inducible NO synthase) and NO production in intestinal epithelial cells. However, this fatty acid inhibited NO production by macrophages and intestinal myofibroblasts [37]. Huuskonen et al. [32] reported opposite effects depending on the cell type. Butyrate and propionate potentiated LPS-induced production of NO and IL-6 in N9 microglial cells, but inhibited LPSinduced responses in rat primary microglia, as in cultured hippocampal slices and neural co-cultures of microglial cells, astrocytes and cerebellar granule neurons [32].

In the present study, we have shown that SCFAs increase neutrophil migration to the inflammatory site, contributing to the initiation of the inflammation process. Taking into account the results of the studies mentioned above and the fact that, at the infection site in vivo, different SCFAs are produced achieving together much higher concentrations than the ones used in our present study, the results shown are clinically relevant.

FUNDING

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [grant numbers 2004/12137-1, 2006/00372-1]; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) [grant number 23038.039417/2008-4]; and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [grant number 471574/2007-4].

REFERENCES

- 1 McOrist, A. L., Abell, G. C., Cooke, C. and Nyland, K. (2008) Bacterial population dynamics and faecal short-chain fatty acid (SCFA) concentrations in healthy humans. Br. J. Nutr. 100, 138-146
- Topping, D. L. and Clifton, P. M. (2001) Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. Physiol. Rev. 81, 1031–1064

- Niederman, R., Buyle-Bodin, Y., Lu, B. Y., Robinson, P. 3 and Naleway, C. (1997) Short-chain carboxylic acid concentration in human gingival crevicular fluid. J. Dent. Res. 76, 575–579 Kurita-Ochiai, T., Fukushima, K. and Ochiai, K. (1995)
- Volatile fatty acids, metabolic by-products of periodontopathic bacteria, inhibit lymphocyte proliferation and cytokine production. J. Dent. Res. 74,
- 5 Ladas, S., Arapakis, G., Malamou-Ladas, H., Palikaris, G. and Arseni, A. (1979) Rapid diagnosis of anaerobic infections by gas-liquid chromatography. J. Clin. Pathol. 32, 1163–1167
 6 Mills, S. W., Montgomery, S. H. and Morck, D. W. (2006) Evaluation of the effects of short-chain fatty acids and an environmethology.
- extracellular pH on bovine neutrophil function in vitro.
- Am. J. Vet. Res. 67, 1901–1907 Niederman, R., Zhang, J. and Kashket, S. (1997) Short-chain carboxylic-acid-stimulated, PMN-mediated gingival inflammation. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 8, 69-290
- 8 Park, J. S., Lee, E. J., Lee, J. C., Kim, W. K. and Kim, H. S. (2007) Anti-inflammatory effects of short chain fatty acids in IFN-γ-stimulated RAW 264. 7 murine macrophage cells: involvement of NF- κ B and ERK signaling pathways.
- Int. Immunopharmacol. 7, 70–77 Vinolo, M. A., Hatanaka, E., Lambertucci, R. H., Newsholme, P. and Curi, R. (2009) Effects of short chain fatty acids on effector mechanisms of neutrophils. Cell. Biochem. Funct. 27, 48–55 Mackay, C. R. (2008) Moving targets: cell migration
- 10 inhibitors as new anti-inflammatory therapies. Nat. Immunol. 9, 988–998
- 11 Edwards, J. C., Sedgwick, A. D. and Willoughby, D. A. (1981) The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo
- Ussue culture system. J. Pathol. 134, 147–156 Dahlen, S. E., Bjork, J., Hedqvist, P., Arfors, K. E., Hammarstrom, S., Lindgren, J. A. and Samuelsson, B. 12 (1981) Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: *in vivo* effects with relevance to the acute inflammatory response. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 3887-3891
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. **162**, 13 156-159
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. and Griffith, R. (1992) Simultaneous amplification and detection of specific 14
- DNA sequences. Biotechnology 10, 413–417 Liu, W. and Saint, D. A. (2002) A new quantitative method 15 Fig. W. and Sam, D. X. (2002) A new quantitative interior of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. Anal. Biochem. 302, 52–59 Selvatici, R., Falzarano, S., Mollica, A. and Spisani, S. (2006) Signal transduction pathways triggered by selective
- formylpeptide analogues in human neutrophils. Eur. J.
- Pharmacol. 534, 1–11 Le Poul, E., Loison, C., Struyf, S., Springael, J. Y., Lannoy, V., Decobecq, M. E., Brezillon, S., Dupriez, V., Vassart, G., 17 Van Damme, J. et al. (2003) Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. J. Biol. Chem. 278, 25481-25489
- Brunkhorst, B. A., Kraus, E., Coppi, M., Budnick, M. and Niederman, R. (1992) Propionate induces 18 polymorphonuclear leukocyte activation and inhibits formylmethionyl-leucyl-phenylalanine-stimulated
- activation. Infect. Immun. 60, 2957–2968
 Nakao, S., Fuji, A. and Niederman, R. (1992) Alteration of cytoplasmic Ca²⁺ in resting and stimulated human neutrophils by short-chain carboxylic acids at neutral pH. Infect. Immun. 60, 5307-5311
- Brown, A. J., Goldsworthy, S. M., Barnes, A. A., Eilert, M. M., Tcheang, L., Daniels, D., Muir, A. I., Wigglesworth, M. J., Kinghorn, I., Fraser, N. J. et al. (2003) The orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are 20 activated by propionate and other short chain carboxylic acids. J. Biol. Chem. 278, 11312–11319

© The Authors Journal compilation © 2009 Biochemical Society

1

- 21 Zapolska-Downar, D., Siennicka, A., Kaczmarczyk, M., Kolodziej, B. and Naruszewicz, M. (2004) Butyrate inhibits cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in cultured endothelial cells: the role of NF-κB
- and PPARa. J. Nutr. Biochem. 15, 220–228
 Miller, S. J., Zaloga, G. P., Hoggatt, A. M., Labarrere, C. and Faulk, W. P. (2005) Short-chain fatty acids modulate
- and Faths, W. 1 (2005) Stoffer and the value activation in the store of the stor 23 LFA-1 and Mac-1 to neutrophil adhesion and migration. J. Immunol. 163, 5029-5038
- Immunol. 165, 5029–5038 Shibata, F., Konishi, K., Kato, H., Komorita, N., al-Mokdad, M., Fujioka, M. and Nakagawa, H. (1995) Recombinant production and biological properties of rat cytokine-induced neutrophil chemoattractants, GRO/CINC-2 α , CINC-2 β and CINC-3. Eur. J. 24 Biochem. 231, 306-311
- Shibata, F., Konishi, K. and Nakagawa, H. (1998) Gene 25 Smbata, F., Komshi, K. and Nakagawa, H. (1998) Gene structure, cDNA cloning, and expression of the rat cytokine-induced neutrophil chemoattractant-2 (CINC-2) gene. Cytokine 10, 169–174
 Ulich, T. R., Howard, S. C., Remick, D. G., Wittwer, A., Yi, E. S., Yin, S., Guo, K., Welply, J. K. and Williams, J. H. (1995) Intratracheal administration of endotoxin and
- (1755) Intratuctural administration of endotosian and cytokines. VI. Antiserum to CINC inhibits acute inflammation. Am. J. Physiol. 268, L245–L250 Shanley, T. P., Schmal, H., Warner, R. L., Schmid, E., Friedl, H. P. and Ward, P. A. (1997) Requirement for C-X-C chemokines (macrophage inflammatory protein-2 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant) in IgG immune complex-induced lung injury. I Immunol. 158 immune complex-induced lung injury. J. Immunol. 158, 3439-3448
- 5439–5448 Nakagawa, H., Shiota, S., Takano, K., Shibata, F. and Kato, H. (1996) Cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC)-2 α , a novel member of rat GRO/CINCs, is a predominant chemokine produced by lipopolysaccharide-timulated ast astronometary in pulsa. Biother Biotecher 28 stimulated rat macrophages in culture. Biochem. Biophys. Res. Commun. 220, 945–948

- Bocker, U., Nebe, T., Herweck, F., Holt, L., Panja, A., Jobin, C., Rossol, S., Sartor, R. B. and Singer, M. V. (2003) Butyrate modulates intestinal epithelial cell-mediated neutrophil migration. Clin. Exp. Immunol. **131**, 29 53-60
- Wilson, A. J., Byron, K. and Gibson, P. R. (1999) 30
- Wilson, A. J., Byron, K. and Gibson, F. K. (1999) Interleukin-8 stimulates the migration of human colonic epithelial cells *in vitro*. Clin. Sci. **97**, 385–390 Adam, E., Quivy, V., Bex, E., Chariot, A., Collette, Y., Vanhulle, C., Schoonbroodt, S., Goffin, V., Nguyen, T. L., Gloire, G. et al. (2003) Potentiation of tumor necrosis 31 factor-induced NF-ĸB activation by deacetylase inhibitors is associated with a delayed cytoplasmic reappearance of $I\kappa B\alpha$. Mol. Cell. Biol. 23, 6200–6209
- 32
- 33
- IκBα. Mol. Cell. Biol. 23, 6200–6209
 Huuskonen, J., Suuronen, T., Nuutinen, T., Kyrylenko, S. and Salminen, A. (2004) Regulation of microglial inflammatory response by sodium butyrate and short-chain fatty acids. Br. J. Pharmacol. 141, 874–880
 Suuronen, T., Hauskonen, J., Nuutinen, T. and Salminen, A. (2006) Characterization of the pro-inflammatory signaling induced by protein acetylation in microglia. Neurochem. Int. 49, 610–618
 Kida, Y., Shimizu, T. and Kuwano, K. (2006) Sodium butyrate up-regulates cathelicidin gene expression via activator protein-1 and histone acetylation at the promoter region in a human lung epithelial cell line, EBC-1. Mol. Immunol. 43, 1972–1981 34
- Rotstein, O. D., Vittorini, T., Kao, J., McBurney, M. I., Nasmith, P. E. and Grinstein, S. (1989) A soluble 35 Bacteroides by-product impairs phagocytic killing of *Escherichia coli* by neutrophils. Infect. Immun. 57, 745-753
- 743-753 Rotstein, O. D., Pruett, T. L. and Simmons, R. L. (1985) Lethal microbial synergism in intra-abdominal infections. *Escherichia coli* and *Bacteroides fragilis*. Arch. Surg. 120, 36 146-151
- Stempelj, M., Kedinger, M., Augenlicht, L. and Klampfer, L. (2007) Essential role of the JAK/STAT1 signaling pathway in the expression of inducible nitric-oxide synthase in intestinal epithelial cells and its regulation by 37 butyrate. J. Biol. Chem. 282, 9797-9804

Received 9 December 2008/16 March 2009; accepted 1 April 2009 Published as Immediate Publication | April 2009, doi:10.1042/CS20080642