UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises
Toxicológicas

Papel dos glicocorticóides endógenos na expressão de moléculas
de adesão envolvidas na interação leucócito-endotélio

Danielle Maia de Holanda Cavalcanti

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Sandra Helena P. Farsky

São Paulo
2005

JP 296

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011266

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

C376p Cavalcanti, Danielle Maia de Holanda
Papel dos glicocorticóides endógenos na expressão de moléculas
de adesão envolvidas na interação leucócito-endotélio / Danielle
Maia de Holanda Calvacanti. -- São Paulo, 2005.
119p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Farsky, Sandra Helena Poliselli

I. Imunologia : Toxicologia I. T. II. Farsky, Sandra Helena
Poliselli, orientador.

615.9 CDD

Danielle Maia de Holanda Cavalcanti

Papel dos glicocorticóides endógenos na expressão de moléculas
de adesão envolvidas na interação leucócito-endotélio

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, 16 de set. de 2005

*Ao meu grande “mestre”, pai, avô e padrinho **Geraldo Maia** (in memoriam) e minha mãe **Maria Lúcia**, por me ensinarem a viver mostrando que a humildade, a determinação e o trabalho são os melhores caminhos para vencer. Assim, sigo em frente lutando pelos meus objetivos ...*

*Aos tios **Sérgio, Ceiça e a Profa. Sandra**, pelo apoio, carinho e por acreditar em mim, proporcionando a realização deste sonho.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares em especial meu irmão *Luiz*, tia *Ana*, tio *Rubinho*, tia *Voninha*, tio *Almir*, tio *Maia*, tia *Vera*, Junior, *Rodrigo*, *Adriana*, *Luciana*, *Carolina*, *Renata*, *Geraldinho* e *Almirzinho* pelo incentivo, carinho, amor e por animarem minha vida.

A *Profa. Sandra Farsky* por me orientar, pelo exemplo profissional a ser seguido, mostrando sempre o conceito e o valor da ciência, sabendo ajudar e dar liberdade para eu aprender com meus erros. A sua confiança e amizade também foram importantes no desenvolvimento desta tese.

A *Profa. Regina Markus* pelas importantes sugestões, pelos conselhos, pela revisão do paper e por disponibilizar o seu laboratório sempre.

A minha grande amiga *Alziana Moreno* pela amizade, pelos conselhos, pelo incentivo, pela companhia, que foram imprescindíveis nesta trajetória.

Aos amigos *Émerson*, *Renata Amaral*, *Sueli* e *Sandro* pela amizade, apoio e incentivo.

Aos colegas de laboratório, *Alexandre*, *Cristina*, *Juan*, *Lack*, *Pricila*, *Renata*, *Sandra* e *Suellen* pela amizade, colaboração e bom humor, que tornam a rotina do laboratório muito mais alegre.

Aos colegas da pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, estagiários e funcionários, em especial *Aline*, *Daniela*, *Fabriciano*, *Igo*, *Paula*, *Maurício*, *Sidney*, *Thiago*, *Vânia*, *Virgínia*, *Mônica*, *Roseli*, *Carla*, *Helena*, *Carmem*, *Luzia* e *Dalva* pela colaboração e amizade.

A *Celina Lotufo* pela amizade e colaboração nos ensaios de aderência in vitro.

As pessoas que colaboraram nos experimentos: Profa. Zuleica Bruno Fortes (Imunohistoquímica), Profa. Primavera Borelli (Hematopoese), Prof. Antunes (Radioimunoensaio), Dr. Jorge Ferreira (citometria de fluxo) e Zulma Ferreira (dosagem de corticosterona) .

Aos colegas do laboratório de Cronofarmacologia (IB/USP), em especial Érica, Pedro, Eduardo e Lidiana, pela colaboração e amizade conquistada.

Aos funcionários do biotério da Química pela dedicação e colaboração na manutenção das condições experimentais dos animais.

A FAPESP (processo n. 03/09410-5) e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Interação leucócito-endotélio.....	1
1.2. Mecanismo molecular da ação dos glicocorticóides.....	7
1.3. Glicocorticóides e interação leucócito endotélio.....	10
2. OBJETIVOS.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Animais.....	17
3.2. Procedimentos cirúrgicos.....	17
3.3. Tratamento farmacológico.....	17
3.3.1. RU 38486.....	17
3.4. Anticorpos.....	18
3.5. Dosagem de corticosterona plasmática por Radioimunoensaio.....	18
3.6. Parâmetros hematológicos.....	18
3.6.1. Determinação do leucograma.....	18
3.6.2. Determinação do mielograma.....	19
3.6.3. Critérios para classificação das células hemopoéticas.....	19
3.7. Microscopia Intravital.....	20
3.7.1. Diâmetro dos vasos.....	21
3.7.2. Velocidade do fluxo sanguíneo <i>in situ</i>	21
3.8. Aderência de leucócitos à célula endotelial <i>in vitro</i>	22
3.8.1. Preparo da cultura de célula endotelial.....	22
3.8.2. Obtenção de leucócitos polimorfonucleares (PMN).....	22
3.8.3. Ensaio de aderência.....	23
3.9. Citometria de fluxo: determinação da expressão de CD62L e CD18 em leucócitos circulantes e células da medula óssea.....	23
3.10. Imunohistoquímica direta: determinação da expressão de ICAM- 1 e PECAM-1 na célula endotelial.....	24
3.11. Análise estatística.....	25

4. RESULTADOS.....	26
4.1. Caracterização dos animais.....	26
4.2. Efeitos dos GCen sobre eventos que modificam o comportamento rolling.....	
4.2.1. Fluxo dos vasos da microcirculação.....	27
4.2.2. Hematopoese.....	27
4.2.3. Expressão de CD62L nas células da medula óssea.....	30
4.2.4. Efeitos sobre a expressão de CD62L em leucócitos circulantes.....	35
4.3. Efeitos dos GCen sobre eventos que modificam a aderência.....	38
4.3.1. Expressão de CD18 nas células da medula óssea.....	40
4.3.2. Expressão de CD18 nos leucócitos circulantes.....	43
4.3.3. Expressão de PECAM-1 e ICAM-1 na célula endotelial.....	45
4.4. Participação do receptor citosólico nos efeitos sobre o rolling e a aderência de leucócitos circulantes.....	47
5. DISCUSSÃO.....	49
6. CONCLUSÕES.....	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
8. ANEXO A (Certificado da Comissão de Ética Experimental)	75
9. ANEXO B (Trabalho submetido à publicação).....	76

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Efeitos da ausência de GCen sobre a maturação de PMN...	28
FIGURA 2- Efeitos da ausência de GCen sobre o leucograma.....	29
FIGURA 3- Efeitos da ausência de GCen sobre a expressão de CD62L em PMN da medula óssea.....	31
FIGURA 4- Efeito da ausência de GCen sobre a população de PMN de ADR na medula óssea.....	32
FIGURA 5- Efeitos da ausência de GCen sobre a expressão de CD62L em granulócitos e monócitos da medula óssea.....	33
FIGURA 6- Efeitos da ausência de GCen sobre a expressão de CD62L em células mononucleares da medula óssea.....	34
FIGURA 7- Efeitos da ausência de GCen sobre a expressão de CD62L nos leucócitos circulantes.....	36
FIGURA 8- Efeito da ausência de GCen sobre a população de PMN circulantes que expressam CD62L.....	37
FIGURA 9- Efeito da ausência de GCen sobre a aderência de PMN à célula endotelial <i>in vitro</i>	39
FIGURA 10- Efeitos da ausência de GCen sobre a expressão de CD18 em PMN da medula óssea.....	40
FIGURA 11- Efeitos da ausência de GCen sobre a expressão de CD18 em granulócitos e monócitos da medula óssea.....	41
FIGURA 12- Efeitos da ausência de GCen sobre a expressão de CD18 em células mononucleares da medula óssea.....	42
FIGURA 13- Efeitos da ausência de GCen sobre a expressão de CD18 nos leucócitos.....	43
FIGURA 14- Efeitos da ausência de GCen sobre a população de PMN circulantes que expressam CD18.....	44
FIGURA 15- Efeitos da ausência dos GCen sobre a expressão de PECAM-1 em células endoteliais.....	45
FIGURA 16- Efeitos da ausência dos GCen sobre a expressão de ICAM-1 em células endoteliais.....	46

FIGURA 17- Efeito do tratamento com RU38 486 sobre a expressão de CD62L em leucócitos circulantes (A) e a população de PMN que expressão a molécula(B)..... 47

FIGURA 18- Efeito do tratamento com RU38 486 sobre a expressam de CD18 em leucócitos circulantes(A) e a população de PMN que expressam em leucócitos circulantes (B)..... 48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Efeito da adrenalectomia bilateral sobre o peso dos animais. Os valores foram obtidos antes e 7 dias após a cirurgia.....	26
TABELA 2- Efeito da adrenalectomia sobre a velocidade de eritrócitos em arteríolas e vênulas pós-capilares do músculo cremaster.....	27

RESUMO

Os glicocorticóides endógenos (GCen) são moduladores importantes das reações inflamatórias, com papel em diferentes aspectos dos processos. Neste contexto, tem sido demonstrado que os GCen controlam a migração de leucócitos para os focos de lesões, e um dos mecanismos propostos tem sido o efeito inibitório sobre os fenômenos de interação leucócito-endotélio. Uma vez que as moléculas de adesão medeiam os processos de interação celular, tem sido evidenciado que os GCen controlam, direta ou indiretamente, a expressão destes receptores nas membranas celulares na vigência de estresse de diferentes origens. No entanto, a literatura ainda é fragmentária e controversa quanto aos mecanismos exatos desta interferência. Desta forma, este trabalho tem por objetivo investigar o papel dos GCen sobre a expressão de moléculas de adesão envolvidas na interação leucócito-endotélio, e os possíveis mecanismos intracelulares responsáveis pelos efeitos.

A deficiência de GCen foi induzida em ratos Wistar machos, adultos por adrenalectomia bilateral. A participação de receptores de glicocorticóides (GC) foi avaliada em ratos normais tratados com o antagonista RU 38486. Animais falso-operados (FO), ou normais (N) foram empregados como controles. A deficiência hormonal foi constatada pela dosagem de corticosterona plasmática por radioimunoensaio e demonstraram valores significativamente baixos em animais adrenalectomizados (ADR).

Ensaios de microscopia intravital mostraram que aumento exacerbado de leucócitos em comportamento "rolling" em vênulas pós-capilares de animais adrenalectomizados (ADR) não reflete alterações hemodinâmicas, uma vez que a deficiência hormonal não provocou modificações no diâmetro ou fluxo sanguíneo de vasos da microcirculação do músculo cremaster. No entanto, a determinação da expressão de moléculas de adesão em leucócitos circulantes por citometria de fluxo mostrou que neutrófilos de animais ADR apresentaram maior expressão de L-selectina que células de animais controles. Por outro lado, a expressão de L-selectina em granulócitos maduros presentes na medula óssea de animais ADR estava diminuída em comparação com células de animais controles. Este efeito pode estar envolvido com a maturação acelerada destas células na medula e com a neutrofilia detectada em animais ADR. É importante salientar que a estimulação de polimorfonucleares (PMN), coletados tanto do sangue como da medula, com fMLP mostrou que estas células estavam aptas a aumentar a expressão da molécula, indicando que as alterações nas suas expressões em animais ADR não são dependentes de modificações na capacidade de síntese. Adicionalmente, a ação dos GCen sobre a expressão de L-selectina parece não depender do GC, já que animais normais tratados com RU 38486 não apresentaram o mesmo padrão de alteração observada em animais ADR.

Com o intuito de identificar os efeitos dos GCen sobre a capacidade individual de aderência do endotélio e do neutrófilo, ensaio de aderência *in vitro* foram realizados com cultura primária de célula endotelial (CE) obtida

do músculo cremaster e com neutrófilos coletados da aorta abdominal. Os dados obtidos mostraram que menor número de PMN provenientes de animais ADR aderiram à CE de animal normal, mas por outro lado, a maior número de PMN de animais controles aderiram à CE de animais ADR. Em conjunto, estes dados indicam um controle diferente dos GCen sobre as células envolvidas no processo: facilitam a aderência de PMN e diminuem a aderência da CE. A investigação do papel dos GCen sobre a expressão de moléculas de adesão envolvidas no processo mostrou que os hormônios não interferem com a expressão basal de $\beta 2$ integrina nos leucócitos, tanto nos circulantes quanto nos da medula. Adicionalmente, os dados de imunohistoquímica indicaram que os GCen modulam a expressão de moléculas responsáveis pela aderência. A expressão de ICAM-1 e PECAM-1 é significativamente maior no endotélio de vênulas de animais ADR que de animais controles.

Associados, os dados aqui obtidos em animais ADR indicam um papel diferente dos CCen sobre a interação leucócito-endotélio. A modulação sobre a expressão de L-selectina pode estar envolvida na mobilização de neutrófilos para circulação e no comportamento rolling destas células. A subsequente aderência dos leucócitos ao endotélio parece ser dependente de ações sobre a célula endotelial, através da modulação da expressão de moléculas da superfamília das imunoglobulinas.

SUMMARY

The endogenous glucocorticoids (GCen) are important modulators of inflammatory reactions, acting in different aspects of the processes. In this context, it has been shown that GCen control leukocyte migration into focus of injuries, and one proposed mechanism of action is the modulation on leukocyte-endothelium interactions. Since adhesion molecules mediate cellular interactions, it has been evidenced that GCen control, direct or indirectly, the expression of these receptors on the cellular membranes during different stress conditions. However, data described in the literature are fragmentary and controversial. Then, the aim of this work was to investigate the role of the GCen on expressions of adhesion molecules involved in leukocyte-endothelium interactions and the possible intracellular mechanisms responsible for the effects.

Adult male Wistar rats were submitted to bilateral adrenalectomy to induce adrenal hormone deficiency. The participation of glucocorticoid cytosolic receptor (GC) on the effects was evaluated in rats pre-treated with the glucocorticoid receptor antagonist RU 38 486. Sham-operated or normal rats were used as control.

The hormone deficiency was assessed by quantification the plasmatic corticosterone by radioimmunoassay. Data showed marked lower values in adrenalectomized (ADR) than control rats. Intravital microscopy assays showed that the higher number of roller leukocytes in the postcapillary venules from cremaster muscle from ADR animals does not reflect hemodynamic alterations, given that hormonal deficiency did not modify the diameter or blood flow of microcirculation vessels. However, the determination of adhesion molecule expressions on circulating leukocytes by flow cytometry assay showed that neutrophils from ADR animals presented higher expression of L-selectin than cells from control animals. On the other hand, the expression of L-selectin on membranes of mature granulocytes in the bone marrow was decreased on cells from ADR rats. Together, these data suggest that modulation on L-selectin expression may be important target point of GE control and it may participate of the accelerated maturation of segmented cells in bone marrow, neutrophilia and in the elevated number of rolling leukocytes detected in ADR animals. It is important to emphasize that alterations on L-selectin expression on cells from ADR rats seem do not reflect an inability of its synthesis, since its expression after *in vitro* fMLP (formyl-Met-Leu-Phe) stimulation was not modified by hormonal deficiency. Additionally, the effect on L-selectin expression on circulating neutrophils may not be depend on the GC, since normal animal treated with RU 38486 presented expressions of L-selectin equivalent to those found in cells from control rats. To identify the effects of hormonal deficiency on individual ability of endothelium or neutrophils adherence, *in vitro* adherence assay was performed using both primary cultured endothelium from cremaster muscle and neutrophils collected from abdominal aorta. The results demonstrated that lesser number of PMN collected from ADR animals adhered to normal endothelium, while higher number of normal neutrophils adhered to endothelium from ADR rats. These latter results were corroborated by

quantification of adhesion molecules expressions involved on adherence process by blood flow cytometer or by immunohistochemistry. The hormonal deficiency did not modify the $\beta 2$ integrin expression on leukocytes, but enhanced the ICAM-1 and PECAM-1 expression on endothelium membrane of cremaster muscle venules from ADR animals.

Together data obtained in ADR animals may indicate a different role of the GE on cells during the leukocyte-endothelium interaction. The modulation on L-selectin may be involved on neutrophil delivery into circulation and on the rolling of circulating neutrophils. The subsequent adherence of leukocytes to endothelium seems to be dependent on actions on endothelial cells, through modulation of expressions of immunoglobulins superfamily molecules.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Interação leucócito-endotélio

Em condições normais, a interação dos leucócitos circulantes com o endotélio é muito pequena, uma vez que as células brancas circulam no centro da corrente sangüínea, envoltas pelos eritrócitos. Fazem parte das poucas exceções, o “pool” periférico de leucócitos aderidos à parede dos vasos da microcirculação, principalmente pulmonar, e linfócitos recirculantes, que interagem com células endoteliais especializadas de tecidos linfóides secundários. No entanto, em situações patológicas, como em processos inflamatórios agudos ou crônicos, alterações reológicas e hemodinâmicas, caracterizadas por vasodilatação, exsudação plasmática com conseqüente redução do fluxo sangüíneo, induzidas pela ação de mediadores químicos liberados na fase inicial do processo, provocam a marginação das células brancas ao endotélio de microvasos, predominantemente de vênulas pós-capilares próximas à área lesada. Em contato direto com o endotélio, os leucócitos inicialmente deslizam sobre a parede vascular (comportamento “rolling”). Com o progredir da reação, as células brancas aderem firmemente ao endotélio (aderência), para a subseqüente migração por entre as junções interendoteliais (diapedese) e migração no tecido extravascular (HARLAN, 1985; RAMPART, 1994; WIEDLE *et al.*, 2001). Estes fenômenos, denominados, em conjunto, de interação leucócito-endotélio, são as etapas iniciais e fundamentais para o recrutamento das células brancas para o tecido lesado. Algumas doenças, caracterizadas por imunodeficiências e denominadas de “leukocyte adherence deficiencies” (LADs) são decorrentes da incapacidade de leucócitos interagirem adequadamente com o endotélio e, conseqüentemente, não alcançarem o sítio de injúria, prejudicando a resolução do processo (RAMPART, 1994; GRANGER & KUBES, 1994; ETZIONI *et al.*, 1999).

O fenômeno de interação leucócito-endotélio na vigência de trauma foi descrito a mais de 150 anos por Conheim. No entanto, os mecanismos responsáveis por esta interação celular só passaram a ser compreendidos

na década de 80 com a descrição das moléculas de adesão. A real importância destas moléculas, na maioria receptores glicoprotéicos, expressos nas membranas celulares tem sido amplamente descrita para diferentes processos fisiopatológicos, que vão desde a embriogênese e manutenção da integridade estrutural dos tecidos até os processos de defesa, cicatrização e desenvolvimento de metástases neoplásicas. No que confere à interação leucócito-endotélio, tem sido proposto que ativação e/ou expressão de moléculas de adesão em cascata mediam o "rolling", a aderência e, subsequente, a diapedese e migração de leucócitos no tecido extravascular.

O comportamento "rolling" é mediado pela expressão de moléculas pertencentes à família das selectinas, expressas nos leucócitos (L-selectina ou CD62L) e nas células endoteliais (P-selectina ou CD62P e E-selectina ou CD62E). Estas moléculas foram assim denominadas porque seu domínio de ligação na região amino terminal é semelhante ao carboidrato lectina, e hoje sabe-se que os ligantes para estas moléculas são açúcares expressos constitutivamente nas membranas celulares (ROSEN & BERTOZZI, 1994). Apesar da ligação a estes carboidratos ser predominante, parece não ser exclusiva, uma vez que há descrições de interações com glicolípides, proteoglicanos e integrinas (DERRY *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999). A ligação selectinas-carboidratos é temporária e dependente da participação de múltiplos carboidratos glico e fucosilados (KANSAS, 1996; RAINER, 2002). Indivíduos geneticamente deficientes de carboidratos ligantes para as selectinas (patologia denominada de LAD II; KARSAN *et al.*, 1998) ou deficientes de E-selectina (DELISSER *et al.*, 1999) apresentam complicações graves, entre as quais processos inflamatórios recorrentes, em função da incapacidade de leucócitos rolarem sobre o endotélio, prejudicando a aderência subsequente. O mesmo perfil de alterações em processos infecciosos é demonstrado em animais geneticamente deficientes para as selectinas (BULLARD & BEAUDET, 1997; ETZIONI *et al.*, 1999). A L-selectina é componente da membrana da maioria dos leucócitos, com exceção de uma porção de células T de memória e "natural killers", e é a

principal molécula responsável pela interação inicial destas células com o endotélio (RAINER, 2002). Sua expressão é baixa no “pool” mitótico de células na medula, mas aumenta gradativamente no decorrer do processo de maturação (TEDDER *et al.*, 1990; LUND-JOHANSEN *et al.*, 1993; VAN EEDEN *et al.*, 1997). Em granulócitos, a expressão de L-selectina no processo de maturação pode promover interações celulares que compartimentalizam estas células no tecido hematopoiético (DIMITROFF *et al.*, 2001). Na circulação de humanos saudáveis, cerca de 50% dos linfócitos, 40 a 80% dos monócitos, 95% dos polimorfonucleares e a maioria das células B expressam a L-selectina na sua membrana. A porcentagem de expressão varia entre os diferentes tipos celulares, mas a localização preferencial é nos pontos de projeção citoplasmática (microvilosidades) (BRUEHL *et al.*, 1996; RAINER, 2002). Durante a ativação de leucócitos circulantes por diferentes citocinas e ésteres de forbol, a L-selectina sofre clivagem protéica pela ação de uma enzima da família da metaloproteinase-desintegrina endógenas, dependentes de zinco (FREEHAN *et al.*, 1996; PREECE *et al.*, 1996; MIDDLEHOVEN *et al.*, 1997; WERB & YAN, 1998; BORLAND *et al.*, 1999). A importância desta clivagem ainda não está totalmente estabelecida, mas alguns estudos suportam a idéia que o comportamento rolling induz a clivagem da molécula, e desta forma o leucócito pode retornar à circulação. No entanto, se um estímulo químico adequado está presente para a ativação das β integrinas, responsáveis pela aderência, a clivagem de L-selectina passa a ser fundamental para a diapedese (RAINER, 2002). Vale ressaltar que leucócitos circulantes com baixa expressão de L-selectina, decorrente de clivagem, apresentam baixa afinidade pelo endotélio (JUTILA *et al.*, 1989). As P e E-selectinas são expressas no endotélio ativado por diferentes estímulos e mediadores inflamatórios. A P-selectina é estocada nos corpúsculos de Weibel-Palade e é rapidamente transportada para superfície celular (BURNS *et al.*, 1999). No entanto, sua expressão é passageira com rápida reinternalização. Adicionalmente, em condições de estimulação há ativação da transcrição gênica para sua síntese (HARTWELL *et al.*, 1998;

BLAGOVESHCHENSKAYA *et al.*, 1998; para revisão ver VAN MOURIK *et al.*, 2002). Por outro lado, a E-selectina só é expressa no endotélio ativado após indução de sua síntese, o que acarreta em expressão temporariamente mais tardia que a forma P (SCWEITZER *et al.*, 1996; MIKI *et al.*, 1996; VESTWEBER & BLANKS, 1999). O aumento da síntese de P e E selectinas é dependente da ativação de fatores de transcrição ("nuclear factor- κ B" NF- κ B e ATF) após ação de segundos mensageiros ("mitogen-activated protein" MAP e "protein kinase" PKC) (GONZÁLEZ-AMARO & SÁNCHEZ-MADRID, 1999).

Várias linhas de evidência suportam a idéia que a interação entre o leucócito e a células endotelial via selectinas ativa várias vias de sinalização intracelular de neutrófilos, associadas principalmente à fosforilação de p-MAP quinases ou ERK (LEY, 2002).

É importante salientar que a deficiência na interação das selectinas com seus ligantes compromete dramaticamente a resposta imune ou inflamatória. Neste contexto, a deficiência genética que acarreta inibição na síntese de carboidratos ligantes para selectina foi denominada de LAD II, pela acentuada deficiência dos leucócitos não interagirem com o endotélio. Os portadores de LAD II apresentam, entre outros efeitos graves, respostas imunes altamente inefetivas (ETIZIONE *et al.*, 1992; VON ANDRIAN *et al.*, 1993).

As integrinas medeiam a interação célula/célula e matriz/célula, e são assim denominadas pela habilidade de integrar o meio extra e intracelular. Por este motivo, funcionam como transdutores de sinais em diferentes processos fisiopatológicos, influenciando o fenótipo e a função celular (ROSSETTI *et al.*, 2002; HOGG *et al.*, 2002). Todas as integrinas são heterodímeros compostos de uma subunidade α e uma subunidade β . A perfeita associação destas subunidades α interagirem a uma subunidade β comum determinou a classificação destas moléculas em sub-famílias. Desta forma, as integrinas são agrupadas em pelo menos 4 sub-famílias (GONZÁLEZ-AMARO & SÁNCHEZ-MADRID, 1999). As moléculas da subfamília $\beta 2$ ou complexo CD18, composta de 4 moléculas- CD11a/CD18

ou LFA-1 “lymphocyte function associated 1”, CD11b/CD18 ou Mac-1 “macrophage antigen-1”, CD11c/CD18 ou gp150,95 e CD11d/CD18- são expressas exclusivamente em leucócitos e medeiam a aderência ao endotélio e sua subsequente diapedese. Neste processo, os ligantes para as $\beta 2$ integrinas são as moléculas que compõem a família das imunoglobulinas-ICAMs “intercellular cell adhesion molecule” 1,2,3,4, VCAMs “vascular cell adhesion molecule” e PECAM-1 “platelet endothelial cell adhesion molecule-1”, além da fração C3b do complemento e de proteoglicanos (GONZÁLEZ-AMARO & SÁNCHEZ-MADRID, 1999). A adesão celular mediada pelas $\beta 2$ integrinas é decorrente de expressão qualitativa, uma vez que podem estar presentes nas células quiescentes em estado inativo, ou quantitativa, proveniente de mobilização de “pools” intracelulares localizados em grânulos específicos (CHATILA *et al.*, 1989; GAHMBERG *et al.*, 1997). Vários agentes, entre os quais estímulos inflamatórios e mediadores químicos, estimulam especificamente cada tipo de expressão (JUTILA *et al.*, 1989; CARLOS & HARLAN, 1990). É bem estabelecido que a fosforilação da cadeia β necessária para ativação destas moléculas (GAHMBERG *et al.*, 1997).

As $\beta 2$ integrinas, como outras moléculas que compõem as demais subfamílias das integrinas, são receptores importantes para a hematopoese. Neste contexto, tem sido demonstrado que além do papel de aderência ao microambiente hematopoiético (WAELE *et al.*, 1997; LICHTERFELD *et al.*, 2000; LUNDAHL *et al.*, 2002; CARION *et al.*, 2002), as integrinas funcionam como sinalizadoras intracelulares para a maturação leucocitária (TAKEDA *et al.*, 2003; SHI *et al.*, 2004).

A deficiência autossômica recessiva para a síntese da cadeia $\beta 2$ foi denominada LAD I e caracterizada pela inabilidade dos leucócitos aderirem ao endotélio e migrarem, subsequente, para o foco de lesão. Indivíduos com este tipo de patologia, classificada em leve, moderada e grave de acordo com a porcentagem de expressão celular, apresentam neutrofilia e processos infecciosos freqüentes e graves (CROWLEY *et al.*,

1980; ARNAOUT *et al.*, 1982; SPRINGER, 1985; DANA & ARNAOUT, 1988; ETZIONI *et al.*, 1999).

As imunoglobulinas são membros de uma superfamília de moléculas de adesão caracterizadas por um domínio extracelular constituído por várias unidades repetidas homólogas a domínios de imunoglobulina G, uma região transmembrana e uma pequena cauda citoplasmática. São expressas em diferentes tipos celulares, mas como citado acima são as ligantes no endotélio para as integrinas nos processos de aderência e diapedese. As expressões de ICAM-1 e VCAM-1 no endotélio quiescente são baixas, mas na presença de estímulos inflamatórios suas concentrações na membrana endotelial são extremamente aumentadas. Diferentemente, as expressões constitutivas de ICAM-2 e PECAM-1 são significativas (HUO & LEY, 2001). Vale ressaltar que a localização constitutiva e predominante de PECAM-1 nas junções interendoteliais é fundamental para a diapedese (MULLER & RANDOLPH, 1999).

A síntese de imunoglobulinas na vigência de estímulo inflamatório depende, predominantemente, das concentrações dos mediadores inflamatórios e da disponibilidade de vias de transdução de sinal ativadas pelos receptores específicos. As principais vias de transdução intracelular incluem a proteína quinase C (PKC), quinases ativadas por mitógenos (ERK, JNK e p38) e o NF- κ B. Os fatores de transcrição nucleares importantes para ativação de suas sínteses incluem AP-1, NF- κ B, C/EBP, STAT e Sp1 (ROEBUCK & FINNEGAN, 1999). Vale ressaltar que a ativação das imunoglobulinas, a exemplo das demais moléculas de adesão responsáveis pela interação leucócito-endotélio citadas acima, está associada a transdução de sinal através da membrana para uma série de proteínas importantes na gênese de doenças inflamatórias, entre as quais a síntese de citocinas, a expressão de proteínas na membrana celular, a produção de espécies reativas de oxigênio e proliferação celular (HUBBARD & ROTHLEIN, 2000; WANG & DOERSCHUK, 2002).

Do exposto fica claro que moléculas de adesão participam efetivamente da gênese da resposta inflamatória, mediando a interação

celular e como transdutor de sinal para ativação de segundos mensageiros e transcrição gênica. A possível interferência terapêutica seletiva sobre a expressão/ativação destas estruturas nas membranas celulares tem sido alvo de grandes estudos com o intuito de fornecer estratégias mais seguras para o tratamento de processos inflamatórios de diferentes origens (KONING *et al.*, 2002; RUEGG *et al.*, 2002; MARSHALL & HASKARD, 2002).

1.2. Mecanismo molecular da ação dos glicocorticóides

Os GC são agentes antiinflamatórios e imunossupressores potentes utilizados amplamente na clínica médica. No entanto, seus efeitos adversos intensos e graves restringem seu emprego, apesar do grande benefício terapêutico. Neste contexto, excesso de GC resulta em uma grande quantidade de efeitos colaterais, incluindo a susceptibilidade exacerbada a infecções.

O uso terapêutico dos GC provém de estudos que mostraram a importância dos GC secretados pelas glândulas adrenais na homeostasia. Destes trabalhos surgiu o conceito de ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal na vigência de estresse de diferentes origens. No que confere à resposta inflamatória, é conhecido que mediadores inflamatórios secretados localmente no processo, entre os quais interleucinas (IL-1, IL-2, IL-6), interferon- γ (INF- γ) e fator de necrose tumoral (TNF α), alcançam a circulação sanguínea e estimulam centros específicos no hipotálamo e na hipófise que induzem, respectivamente, a secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). As células do córtex adrenal estimuladas pelo ACTH secretam GC, que entre outros efeitos, atuarão como moduladores endógenos do processo (GARCIA-LEME & SCHAPOVAL, 1975; TILDERS *et al.*, 1994; HADDAD *et al.*, 2002). Ainda, alguns mediadores podem estimular diretamente as células adrenais provocando a secreção hormonal (HADDAD *et al.*, 2002).

Como antiinflamatórios, os GC exógenos (GCex) ou endógenos (GCen) exercem seus efeitos sobre os aspectos vasculares e celulares do processo, modulando tanto o aumento de permeabilidade quanto a

mobilização e função celular (GARCIA-LEME & WILHELM, 1975; MORAES & GARCIA-LEME, 1982; TSURUFUJI *et al.*, 1984; FLOWER *et al.*, 1986; MORAES *et al.*, 1987; PERRETTI *et al.*, 1989; STENBERG *et al.*, 1990; ODA & KATORI, 1992; TJANDRA *et al.*, 1996; TAILOR *et al.*, 1997; LEECH *et al.*, 1998; MORAND & LEECH, 2001). Ainda, seus efeitos são amplificados pelo papel sobre a secreção de mediadores inflamatórios provenientes de leucócitos e de outros tipos celulares (TSURUFUJI *et al.*, 1984; STARUCH & WOOD, 1985; ROSENBAUM *et al.*, 1986; PERRETTI *et al.*, 1989; SCHLEIMER *et al.*, 1989; BARNES & ADCOCK, 1993; DAVENPECK *et al.*, 1998; PIPITONE *et al.*, 2001). Desta forma, os efeitos antiinflamatórios podem ser decorrentes da ação direta dos GC sobre as células ou, indireta, pela interferência com a mediação química envolvida nos processo.

A maioria dos efeitos antiinflamatórios dos GC é desencadeada pela ação genômica, que leva a uma regulação positiva ou negativa da síntese de proteínas participativas do processo. O mecanismo molecular de ação inicia-se com a interação dos esteróides com o receptor intracelular localizado no citoplasma de inúmeras células. O receptor de GC é membro de uma grande família de receptores esteróides nucleares, que incluem receptores para mineralocorticóides, andrógenos, estrógenos, progesterona, vitamina D, hormônios tireoidianos e ácido retinóico (LEUNG & BLOOM, 2003). Em 1985, dois cDNAs originários do mesmo gene foram clonados para o receptor de GC, e dão origem aos receptores α e β . Ambos são um complexo protéico, que compreendem três domínios estruturais: um domínio amino terminal, um domínio de ligação ao DNA, e um domínio carboxi terminal responsável pela ligação ao hormônio. Adicionalmente, os receptores estão ligados pelo sítio de ligação hormonal a duas moléculas denominadas "heat shock protein" (HSP90), a um membro da família das "heat shock family of stress induced protein" (HSP70) e a uma imunofilina, integrante da família de proteínas que se liga a agentes imunossupressores. Esta conformação protéica parece ser necessária para a manutenção do estado inativo do receptor na ausência do agonista. Após interação com o

agonista, o receptor dissocia-se das proteínas adjacentes e migra para o núcleo (NICK & CIDLOWSKI, 2004).

O receptor α difere do β somente na porção carboxi terminal. Devido a esta diferença, o receptor β é incapaz de ligar-se aos hormônios. Desta forma, têm se atribuído que o receptor α , isoforma predominante do receptor, é o responsável pelas ações genômicas dos GCs, e que a expressão exacerbada do receptor β está associada à resistência hormonal detectada em pacientes e em algumas espécies animais (PUJOLS *et al.*, 2004; LEUNG & BLOOM, 2003; NICK & CIDLOWSKI, 2004).

No núcleo, o complexo hormônio-receptor liga-se a seqüências específicas do DNA, denominadas de “glucocorticoid responsive element” (GREs) localizados em regiões regulatórias nos genes que são transcripcionalmente ativados pelos GC. Tem sido demonstrado que a maquinaria básica de transcrição incluem o complexo TATA Box, associado aos fatores de transcrição TAFs e TFIIIs e à RNA polimerase II (LEUNG & BLOOM, 2003).

Os mecanismos moleculares da ação antiinflamatória podem ser desencadeados das seguintes maneiras: 1) pelo mecanismo clássico transcripcional citado acima, que pela interação aos sítios específicos no DNA desencadeia a indução ou inibição da síntese de proteínas; 2) através da estabilização da estrutura do DNA, evitando a ligação de fatores de transcrição (BARNES, 1998); 3) pela indução de RNAases específicas, que diminuem a estabilidade das RNAs respectivas (FESSLER *et al.*, 1996); 4) ou através de ligação com fatores de transcrição como o AP-1 e NF- κ B, inativando-os (MC EWAN *et al.*, 1997; WISSINK *et al.*, 1998; REICHARDT & SCHUTZ, 1998).

Adicionalmente, um outro mecanismo, conhecido como não genômico, tem sido proposto, e parece estar relacionado a doses elevadas do hormônio. Os efeitos mediados por este mecanismo são rápidos (segundos e minutos) e não são abolidos pela ação de inibidores da transcrição gênica e síntese protéica. O mecanismo molecular ainda não é conhecido, mas há evidências da participação de um receptor de superfície,

embora este ainda não tenha sido identificado em humanos, ou da simples interação físico-química dos GC com componentes da membrana celular. Estas interações, quer seja com o possível receptor ou físico-química, seria suficiente para alterar a fisiologia intracelular por diferentes mecanismos de sinalização (BUTTGEREIT *et al.*, 1998). A importância deste mecanismo não está bem estabelecida para os diversos efeitos dos GC, mas parece ter papel significativo em condições fisiopatológicas e terapêuticas, principalmente na artrite reumatóide em condições de pulso-terapia, quando doses elevadas dos hormônios são administradas para rápido benefício ao paciente (PITZALIS *et al.*, 2002).

Em conjunto, a breve descrição acima enfatiza que apesar dos GC serem amplamente estudados, os seus mecanismos de ação na diversidade de efeitos por eles exercidos ainda são fragmentários e controversos.

1.3. Glicocorticóides e interação leucócito-endotélio

Tem sido bem demonstrado em diferentes modelos experimentais que os GCen ou GCex inibem o recrutamento leucocitário (FLOWER *et al.*, 1986; LAUE *et al.*, 1988; PEERS *et al.*, 1988; MORAES *et al.*, 1987; CASTAGLIUOLO *et al.*, 2001; ABE *et al.*, 1995). A investigação do papel dos GC nas diferentes etapas da mobilização local de leucócitos vem de longa data e tem determinado resultados conflitantes, principalmente quanto à origem endógena ou exógena e a dose de hormônio empregada. O mecanismo molecular dos efeitos parece envolver o receptor citosólico, uma vez que foi demonstrada em alguns modelos animais que a administração de RU 38 486, antagonista do receptor de GC, ou de inibidores de síntese protéica abolem completamente a redução de influxo de leucócitos provocada pelos hormônios (PEERS *et al.*, 1988, LEECH *et al.*, 1998). No entanto, a participação do mecanismo não genômico não pode ser descartada, principalmente nos casos de inibição da migração de polimorfonucleares na vigência de processos agudos (SMITH *et al.*, 1988).

O papel dos GCen como moduladores fisiológicos da interação leucócito-endotélio, etapa inicial e fundamental para o recrutamento celular,

foi demonstrado *in vivo* em animais adrenalectomizados ou tratados com metopirona, inibidor da síntese de GC que não interfere com a produção de mineralocorticóides. Nestes animais, o número de leucócitos “rollers”, em condições normais, foi muito maior que o detectado em animais controles falso-operados ou normais. A indução de resposta inflamatória exacerbou a interação celular, com conseqüente aumento no número de células brancas aderidas à parede de vênulas pós-capilares e no interstício adjacente (FARSKY *et al.*, 1995). Trabalhos subseqüentes têm demonstrado que na vigência de estresse, o aumento na concentração de GCen circulantes modula a expressão de moléculas de adesão envolvidas no processo. LEECH *et al.* (1998) mostraram que administração do antagonista de receptor RU 38 486 em ratos portadores de artrite aumentou significativamente a expressão de P-selectina na articulação inflamada. Adicionalmente, tem sido bastante evidenciado o papel dos GCex ou GCen, neste último caso em concentrações elevadas, sobre a expressão de L-selectina em neutrófilos circulantes de diferentes espécies animais. Neste contexto, uma relação inversa entre secreção de cortisol e expressão de L-selectina foi demonstrada em pacientes submetidos a estresse cirúrgico. A elevada concentração hormonal dias após a cirurgia coincide com diminuição na expressão de L-selectina (FASSBENDER *et al.*, 1999; SEEKAMP *et al.*, 2001). Nesta mesma linha de evidências, observou-se que a estimulação elétrica de áreas específicas do hipotálamo em gatos, que induz aumento de corticóides e noradrenalina circulantes, causou granulocitose e linfocitopenia. A análise da expressão de moléculas de adesão nestes leucócitos circulantes mostrou incremento na expressão de L-selectina em granulócitos e diminuição em linfócitos CD4 e CD8, efeito que parece não ser dependente de clivagem protéica (KANAME *et al.*, 2002). No entanto, trabalho prévio utilizando o mesmo modelo animal, onde a lesão hipotalâmica acarretou somente aumento na concentração de GC circulantes, observou-se granulocitose com diminuição da expressão de L-selectina (MORI *et al.*, 2000). Uma série de estudos em bovinos recém-nascidos ou em fêmeas após o parto corroborou os dados citados acima

(LEE *et al.*, 1998; PREISLER *et al.*, 2000; WEBER *et al.*, 2001). Ainda tem sido evidenciado que em situações patológicas, como artrite reumatóide, onde existem concentrações elevadas de GCen, ocorre uma diminuição na expressão imunoglobulinas e P e E-selectinas na célula endotelial (LEECH *et al.*, 1998).

Quanto à expressão integrinas, os dados apresentados na literatura indicam que os GCen não interferem com a expressão destas moléculas em leucócitos circulantes. Após estresse cirúrgico, a expressão de integrinas foi discretamente aumentada na vigência de altas concentrações de GC (FASSBENDER *et al.*, 1999). Corroborando este efeito, TORSTEINSDOTTIR *et al.* (1999) demonstraram que o incremento na secreção de GCen não altera a expressão de integrinas em leucócitos circulantes de humanos).

É importante salientar que o aumento da secreção de GC pelas condições de estresse mencionadas acima contou com a participação de outras substâncias endógenas liberadas e/ou ativadas nestas situações, que podem ter contribuído para o efeito modulatório dos GC sobre a expressão da selectina.

Os estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que os GCex modulam a expressão de moléculas de adesão em diferentes condições experimentais (POLAT *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2002; KIRVESKARI *et al.*, 2002; DECKING *et al.*, 2001; WILSON *et al.*, 2001; STRAUSBAUGH & ROSEN, 2001; ROMERO *et al.*, 2000). A grande maioria dos estudos evidencia que os GCex diminuem a expressão das moléculas da família das selectinas e imunoglobulinas, e parecem diminuir ou não interferir com a expressão de $\beta 2$ integrinas (HILL *et al.*, 1994; O'LEARY *et al.*, 1996; SHIMOYAMA *et al.*, 1997; LUJAN *et al.*, 1998; DAVENPECK *et al.*, 1998; TORSTEINSDOTTIR *et al.*, 1999; GOULDING *et al.*, 1999; RYU *et al.*, 1999; YOSHIKAWA *et al.*, 1999; BRANDT *et al.*, 2000; LIM *et al.*, 2000).

Tanto para os GCen como para os GCex, os resultados são conflitantes quanto à ação direta sobre a síntese e/ou expressão de molécula de adesão ou indireta, através da inibição da secreção de

mediadores que reconhecidamente ativam a expressão/ativação destas estruturas nas membranas celulares (BARNES & ADDOCK, 1993; DAVENPECK *et al.*, 1998; PIPITONE *et al.*, 2001). A controvérsia sobre o assunto pode ser decorrente da diversidade de condições experimentais, incluindo a dose dos hormônios e os agentes inflamatórios empregados, além das espécies animais testadas. No entanto, não se pode descartar que os efeitos sejam distintos, uma vez que estes hormônios atuam nas diferentes células alvo, por diferentes vias, usando os mecanismos genômicos e não-genômicos (PITZALIS *et al.*, 2002).

Várias linhas de investigações comprovam a complexidade dos mecanismos moleculares envolvidos no efeito dos GC sobre a expressão de moléculas de adesão: 1) a regulação da expressão de moléculas de adesão por GCex é dependente do tipo celular e do estímulo inflamatório. Esta afirmação é baseada em observações que mostram que TNF e IL-1 estimulam a expressão de moléculas de adesão na célula endotelial e fibroblastos, mas não em linfócitos (KRZESICKI *et al.*, 1991; BRAUN *et al.*, 1995); 2) os GCex podem regular a expressão de moléculas de adesão em resposta a diferentes citocinas com sinalizações intracelulares distintas. Neste contexto, foi demonstrado que os GCex inibem a expressão de E-selectina e ICAM-1 no endotélio após estimulação com lipopolissacarídeo de bactérias (LPS) e IL-1, mas não ao TNF α (CRONSTEIN *et al.*, 1992); 3) a expressão de diferentes moléculas em resposta a um mesmo estímulo pode ser mais ou menos sensível aos efeitos de GC. O controle da expressão gênica para LFA-1 em linfócitos é mais sensível a GC que o gene de CD2 (PITZALIS *et al.*, 1997).

O mecanismo molecular dos efeitos sobre a expressão de moléculas de adesão, ainda que não totalmente conhecido, parece contar com ações genômicas e não genômicas. No primeiro caso, uma série de experimentos com GCen e GCex mostram a participação do receptor intracelular de GC (FARSKY *et al.*, 1995; FILEP *et al.*, 1997; 1998). A ação direta sobre DNA, através da ligação aos GREs, tem sido descrita como um mecanismo envolvido na síntese de lipocortina-1, um membro da família das anexinas,

responsável por alguns dos efeitos dos GC, entre os quais a modulação da expressão de L-selectina em células mielóides (PITZALIS *et al.*, 1997; STRAUSBAUGH & ROSEN, 2001). O mecanismo mais aceito é a ação sobre fatores de transcrição, principalmente pela inibição de NF-kappaB e AP-1, fatores estritamente relacionados à transcrição gênica para síntese de citocinas e moléculas de adesão (ALMAWI & MELEMEDJIAN, 2002; WILSON *et al.*, 2001; XU *et al.*, 2001; KUROKOUCHI *et al.*, 2000; LIDEN *et al.*, 2000, SIMONCINI *et al.*, 2000). Recentemente, WEBER *et al.* (2001, 2004) sugeriram que o controle dos GCen sobre a L-selectina é mediado pela ativação direta do receptor nos reservatórios e síntese de L-selectina em neutrófilos circulantes. Adicionalmente, mecanismos não genômicos podem estar envolvidos na ativação e redistribuição de moléculas de adesão em células estimuladas. Esta afirmação provém de ensaios que mostraram que em linfócitos estimulados por acetato de forbol miristato (PMA), os GC são capazes de inibir, em segundos, a expressão de LFA-1 e a conseqüente agregação intercelular. Dada a rapidez do efeito, sugere-se que este seja desencadeado por uma mudança na afinidade e/ou redistribuição desta molécula na superfície celular (PITZALIS *et al.*, 2002). Esta hipótese foi ratificada pelas observações que neutrófilos de sangue circulante de humanos tratados com dexametasona *in vitro* por 30 a 210 minutos não apresentaram inibição na expressão de L-selectina (FILEP *et al.*, 1998; STRAUSBAUGH & ROSEN, 2001), como foi amplamente demonstrada em diferentes condições experimentais descritas previamente.

Em conjunto, tem sido determinado que os GC interferem com a expressão/ativação de moléculas de adesão envolvidas na interação leucócito-endotélio, sendo este um dos mecanismos responsáveis pela diminuição na migração local de leucócitos durante o processo inflamatório. O efeito sobre moléculas de ação têm sido amplamente descrito para os GCex, empregados exaustivamente na clínica médica, no entanto os mecanismos moleculares da ação são controversos e ainda não são totalmente conhecidos. Para os GCen, reconhecidamente moduladores da reação inflamatória, os dados são bem mais escassos, apesar de sugerirem

um papel importante na regulação da expressão/ativação de moléculas de adesão. Desta forma, estudos que mostrem o controle endógeno da expressão e/ou ativação das moléculas de adesão pelos GC poderão contribuir para a elucidação dos efeitos antiinflamatórios e imunossupressores desta classe hormonal.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Em conjunto, a literatura citada anteriormente mostra claramente a importância dos GC na regulação da migração leucocitária na vigência da resposta inflamatória e, que a complexidade dos mecanismos envolvidos nesta modulação é decorrente da vasta ação hormonal por mecanismos moleculares de ação distintos. Também fica claro, que dados obtidos em diferentes condições experimentais contribuem para a controvérsia e o conhecimento insuficiente dos mecanismos de ação dos GC.

Desta forma, este trabalho visou avaliar o controle endógeno exercido por estes sobre a expressão/ativação basal de moléculas de adesão em ratos Wistar, machos, deficientes de GC e investigar os possíveis mecanismos moleculares envolvidos no efeito.

Para tanto, ratos adrenalectomizados, falso-operados ou normais foram empregados: 1) para realização de ensaios de microscopia intravital, para avaliação da do papel dos GCen sobre o fluxo sanguíneo de vênulas pós-capilares; 2) como doadores de leucócitos ou músculo cremaster para ensaios de citometria de fluxo e de imunohistoquímica, respectivamente, com o intuito de investigar a expressão das moléculas de adesão; 3) como doadores de célula endotelial e neutrófilos para serem empregados em ensaios de aderência *in vitro*, para avaliação do comportamento de leucócitos e endotélio distintamente neste processo. Animais normais tratados com RU 38 486 foram utilizados para investigar a participação do receptor α citosólico nos efeitos hormonais.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

O protocolo experimental utilizado foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA)- FCF/USP, estando de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando entre 200-250g, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/ Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em condições normais de biotério, com temperatura controlada (24°C) e livre acesso à ração e água até o início dos ensaios. Além disso, foram pesados antes dos procedimentos cirúrgicos e após 7 dias, antes dos ensaios.

3.2. Procedimentos cirúrgicos

Adrenalectomia bilateral foi realizada sob anestesia pelo pentobarbital sódico (Cristália, 65mg/Kg via i.p.), através de incisão cutânea e muscular bilateral, junto ao rebordo costal. Os órgãos abdominais foram visualizados. O rim e a glândula adrenal no seu pólo superior foram localizados. Com o auxílio de uma pinça, a gordura peri-renal foi exteriorizada e seccionada juntamente com a adrenal. A lesão foi suturada com fio de algodão. No período pós-operatório foi oferecida *ad libitum* solução salina fisiológica aos animais. Animais falso-operados foram submetidos a incisões cirúrgicas e suturas equivalentes às praticadas nos animais adrenalectomizados. Os animais de ambos os grupos foram utilizados no 7º dia após as cirurgias.

3.3. Tratamento farmacológico

3.3.1. RU 38 486

O RU 38 486 (Sigma, St.Louis, MO, USA) foi diluído em solução de etanol absoluto e salina fisiológica (1:1). Foram administradas a ratos normais doses de 30 mg/kg, por via subcutânea (s.c.), 12 horas e 2 horas

antes do início dos ensaios. Animais controles receberam igual volume do veículo pela mesma via.

3.4. Anticorpos

Anticorpos monoclonais anti-CD62L e anti-CD18 de ratos (obtidos de camundongos), conjugados a isotiocianato de fluoresceína e anticorpos monoclonais anti-ICAM-1 e anti-PECAM-1 de ratos (obtidos de camundongos), conjugados a biotina, foram obtidos da BD Pharmingen (Franklin Lakes, NJ).

3.5. Dosagem de corticosterona plasmática por Radioimunoensaio

A deficiência hormonal foi constatada pela dosagem de corticosterona plasmática, pelo método de VECSEI *et al.*, 1972 e modificado através de extração do esteróide por etanol. Utilizou-se um anticorpo anti-corticosterona (AB-cort-17984) preparado em coelhos, com o hormônio conjugado com albumina bovina, cedido pelo Dr. José Antunes Rodrigues. A especificidade do anticorpo foi testada pela reatividade cruzada com o cortisol (1%), 17OH-progesterona (1%) e sulfato de dehidroepiandrosterona (12%). A corticosterona [1,2-3(H)] (New England Nuclear) foi utilizada como marcador. Na separação da fração livre da ligada utilizou-se uma solução de carvão dextran 0,5/0,05%. A leitura foi feita em contador beta de radioatividade.

3.6. Parâmetros hematológicos

3.6.1. Determinação do leucograma

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (Cristália, 65 mg/Kg, via i.p.) e o sangue coletado, em ambiente estéril, por meio de punção da aorta abdominal, utilizando-se EDTA 10%, como anticoagulante.

O número de leucócitos foi determinado em câmara de Neubauer, utilizando-se a diluição de 1:20 em líquido de Turk (DACIE & LEWIS, 1995).

Os valores relativos e absolutos do número de leucócitos foram determinados em extensões sangüíneas realizadas após a coleta do sangue e coradas pela coloração de May Grunwald-Giensa, modificada (ROSENFELD, 1947).

3.6.2. Determinação do mielograma

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (65 mg/Kg, via i.p.), e após a coleta do sangue da aorta abdominal, iniciou-se o procedimento para coleta das células da medula óssea. As células foram obtidas por meio de lavagem da cavidade femoral com meio McCoy's 5A[®] modificado (Sigma[®], Chemical Company, USA), utilizando-se seringa de 1mL e agulha de calibre 26 mm. A suspensão celular foi colocada em tubos plásticos, cuidadosamente homogeneizada com pipeta tipo Pasteur e mantida em banho de gelo.

As células obtidas da medula óssea foram quantificadas em hemocítmetro de Neubauer, após diluição de 1:100 Líquido de Türk, diluente composto por uma solução de 1% de ácido acético glacial.

Para avaliação morfológica foram feitas lâminas obtidas por citocentrifugação de amostras da suspensão celular e posteriormente submetidas à coloração de May Grunwald-Giensa, modificado (ROSENFELD, 1947) e peroxidase (método de GRAHAM-KNOLL modificado), para identificação e quantificação dos diferentes tipos celulares.

3.6.3. Critérios para classificação das células hemopoéticas

A classificação das células da linhagem granulocítica nos órgãos hemopoéticos dos animais foram baseadas na relação núcleo-citoplasma, afinidade tintorial do citoplasma, e das organelas celulares, na presença ou não de granulações primária e secundária no citoplasma, no padrão de cromatina nuclear, na presença ou não de nucléolos, no diâmetro e segmentação, ou não do núcleo. Na série granulocítica consideraremos quatro etapas maturativas: BLASTOS envolvendo o hemocitoblasto e mieloblasto; FORMAS JOVENS englobando as etapas de promielócito e

mielócito; FORMAS EM ANEL correspondentes ao metamielócito e ao bastonete; SEGMENTADOS envolvendo as formas segmentadas a partir de 2 lóbulos nucleares (GARCIA & BARBIERI, 1986).

Os precursores eritróides foram classificados em: ERITROBLASTOS JOVENS envolvendo proeritroblastos e eritroblastos basófilos; ERITROBLASTOS POLICROMÁTICOS englobando todas as etapas em que as células apresentavam cromatina condensada e citoplasma basófilo ou policromatófilo e ERITROBLASTOS ORTOCROMÁTICOS incluindo células com núcleo apresentando cromatina picnótica e citoplasma eosinofílico. Quando as células apresentarem assincronismo maturativo, prevalecerá o aspecto da cromatina nuclear para identificação da etapa maturativa.

A identificação dos monoblastos e plasmoblastos seguiram os critérios morfológicos do padrão de cromatina nuclear e basofilia do citoplasma. Promonócitos, monócitos e macrófagos serão reunidos em um grupo de células denominadas de MONO-MACROFÁGICAS.

As células da linhagem linfóide envolvendo prolinfócitos, linfócitos típicos ou atípicos foram agrupadas como linfócitos.

Nas preparações obtidas da medula óssea foi realizada a contagem diferencial contando-se, no mínimo, 200 células por lâmina.

3.7. Microscopia Intravital

Os animais foram anestesiados pelo pentobarbital sódico (Cristália, 65mg/Kg via i.p.) e manipulações cirúrgicas na bolsa escrotal foram realizadas para a exposição do músculo cremáster segundo o procedimento descrito por Baez (1973). Os animais foram posicionados sobre uma placa termostaticamente controlada (37°C) e dotada de uma área transparente sobre a qual o tecido em estudo pode ser transiluminado. A placa foi colocada sobre o "charriot" do microscópio óptico do sistema de microscopia intravital (Axioskop, Carl-Zeiss). A microcirculação é observada através do microscópio, onde a imagem é aumentada de 1000 a 2000x, acoplado a uma câmera de projeção de imagem que a transmite para monitores de televisão e de computador. No computador está instalado um software de

análise de imagem (KS 300 Kontron) que permite a realização de medidas na imagem estática (digitalizada) em intervalos de tempo pré-determinados. A imagem contínua na tela do monitor de televisão pode ser gravada em vídeo cassete para análise posterior. A imagem é aumentada de aproximadamente 1500x nas telas dos monitores de televisão e computador. A preparação foi mantida úmida e quente através da irrigação com solução fisiológica aquecida (37°C).

3.7.1. Diâmetro dos vasos

Foram determinados os diâmetros de arteríolas e vênulas pós-capilares através da imagem capturada por software (KS 300 Kontron) dos animais normais, adrenalectomizados e falso-operados.

3.7.2. Velocidade do fluxo sanguíneo *in situ*

A determinação da velocidade de eritrócitos dos vasos da microcirculação foi realizada pelo método fotométrico descrito por BORDERS & GRANGER (1984) e complementado por DAVIS (1987). Através de um “optical doppler velocimeter” (Microcirculation Research Institute Texas A&M College of Medicine), instalado entre a ocular do microscópio óptico e câmera de projeção de imagem do equipamento de microscopia intravital, o fluxo sanguíneo de vênulas e arteríolas pós-capilares do cremáster dos animais foi determinado na tela do monitor de computador. O equipamento é composto por dois sensores (fotodiodos planares e de baixa capacitância), os quais são posicionados no centro da imagem do vaso em observação na tela do monitor do computador. Os sensores, com distância estabelecida e conhecida entre eles, são capazes de captar as alterações na intensidade de luz produzida pela passagem das células vermelhas, e transformam-nas em sinal de voltagem, proporcional à velocidade destas células. A velocidade de eritrócitos é estabelecida pela velocidade destas células no centro da corrente sangüínea, captadas pelos sensores e o diâmetro do vaso.

3.8. Aderência de leucócitos à célula endotelial *in vitro*.

3.8.1. Preparo da cultura de célula endotelial

O isolamento de células endoteliais da microcirculação foi realizado segundo protocolo descrito por Chen et al. (1995). Os animais foram anestesiados pelo pentobarbital sódico (Cristália, 65mg/Kg via i.p.), heparinizados (1000 unidades por animal, i.p.) e exsanguinados cortando-se as artérias carótidas. Em seguida, o animal foi banhado em etanol 70% e o músculo cremaster foi retirado em ambiente estéril (fluxo laminar). Após lavagem com solução tampão de salina-fosfatos estéril (PBS; NaCl 125 mM, KCl 5 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, NaH₂PO₄ 2mM), o tecido foi fragmentado (aproximadamente 2 x 2 x 2 mm) e foram colocados 2 pedaços por poço em placa de 24 poços. Após um período de alguns minutos (2 – 5 minutos), foi adicionado 500µl de meio de cultura estéril (DMEM + 20% de soro bovino fetal e 40mg/L de sulfato de gentamicina) a cada poço e as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Segundo os autores, apenas células sanguíneas e endoteliais deixam o tecido neste período, sendo as células sanguíneas excluídas após uma ou duas passagens. Após este período, os fragmentos foram retirados e desprezados e os poços completados com 200µl de meio de cultura. Novamente, as placas foram incubadas a 37°C por 1 semana. Neste período, o crescimento das células foi monitorado em microscópio óptico e no momento oportuno foram subcultivadas, utilizando a enzima pancreatina (GIBCO), em placas de 96 poços para realização dos ensaios de adesão *in vitro*.

3.8.2. Obtenção de leucócitos polimorfos nucleares (PMN)

O sangue dos animais anestesiados pelo pentobarbital sódico (Cristália, 65mg/Kg via i.p.) foi coletado pela aorta abdominal em seringas heparinizadas (Liquemine®, Roche, 50UI). Uma solução rica em polimorfonucleares (superior a 80%) foi obtida adicionando-se 5 ml de sangue sobre 3 ml de Percoll (56% em PBS estéril, Sigma) com subsequente centrifugação por 40 min a 3000 rpm. A interface contendo os polimorfonucleares foi retirada e os eritrócitos lisados por solução de lise

(NH_4Cl 8,02 g/l, NaHCO_3 0,84 g/l). As células foram ressuspensas em Hanks (NaCl 139 mM, KCl 5 mM, Na_2HPO_4 5 M, KH_2PO_4 4M e NaHCO_3 3mM) contendo 0,5% de albumina sérica bovina (BSA, Sigma) na concentração de 10^6 células/ml.

3.8.3. Ensaio de aderência

As células endoteliais confluentes em placas de 96 pocinhos foram lavadas duas vezes com 200 μl de solução de Hanks e os PMN adicionados (50 μl contendo 5×10^5 PMN) e incubados por 30min a 37°C em 5% CO_2 . Após este período os PMN não aderidos foram retirados em duas lavagens com Hanks. Foram então adicionados 50 μl de tampão fosfato contendo 0,5% do agente solubilizante hexadeciltrimetilamonio. A quantidade de polimorfonucleares aderidos foi avaliada usando ensaio para dosagem da enzima mieloperoxidase realizado da seguinte maneira: incubação por 5 minutos com tetrametilbenzidina (TMB, 25 μl , concentração final na placa de 1,6 mM) seguido de incubação por 2 minutos com peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , 100 μl , concentração final 0,5 mM, Sigma). A velocidade da reação foi reduzida por adição de ácido sulfúrico (H_2SO_4 1 M, 50 μl). A Absorbância foi determinada em leitor para ELISA (SpectraMAX 250, Molecular Devices) em 450 nm. A quantidade de células aderidas foi determinada utilizando-se uma curva padrão com quantidades conhecidas de PMN (10^4 a $1,56 \times 10^2$ PMN) em volume final de 100 μl de tampão fosfato de sódio 0,05M. Como branco será adicionado apenas o tampão fosfato de sódio 0,05M.

3.9. Citometria de fluxo: determinação da expressão de CD62L e CD18 em leucócitos circulantes e células da medula óssea

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (Cristália, 65 mg/Kg, via i.p.) e o sangue coletado, por meio de punção da aorta abdominal, utilizando-se EDTA 10%, como anticoagulante. As células da medula óssea foram obtidas por meio de lavagem da cavidade femoral com solução de Hanks. Em seguida, sob agitação com pipeta de Pasteur, os eritrócitos foram lisados com solução de cloreto de amônio 0,13 M e centrifugados por 10 min

a 1500 rpm. As células foram contadas em câmara de Neubauer e colocadas 1×10^6 células em 90 μ l de solução de Hanks contendo 0,1% de BSA. O estímulo (peptídeo formilado -fMLP, Sigma) foi adicionado às células em volume de 10 μ l e incubados a 37° por 15 min para a expressão de L-selectina e 30 min para a expressão de CD18. Após esse período, o volume foi completado para 1 ml com solução de Hanks, com subsequente centrifugação por 10 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado para adição de 90 μ l de solução de Hanks e 10 μ l do anticorpo (0,5 μ g/10 μ l) e incubado na geladeira por 20min para posterior leitura no citômetro de fluxo (Becton Dickinson, FACS Calibur), que detecta a quantidade de substância fluorescente por célula.

3.10. Imunohistoquímica direta: determinação da expressão de ICAM-1 e PECAM-1 na célula endotelial

Os animais foram anestesiados pelo pentobarbital sódico (65mg/Kg i.p.) e seus testículos foram retirados e imediatamente inseridos em banho de hexana imersa em nitrogênio líquido para congelamento gradativo. Após o congelamento, os testículos foram cortados em criostato a -25°C (Leica Microsystem). Os cortes foram feitos na espessura de 8 μ m e depositados em lâminas silanizadas. Após 10 minutos, as lâminas foram colocadas em acetona gelada para fixação durante 10 minutos a -25°C. Em seguida, as lâminas foram lavadas 3 vezes, por 5 minutos, em PBS. A partir daí todo o procedimento foi realizado em câmara úmida. As lâminas foram imersas em solução de peróxido de hidrogênio (3% em PBS) por 30 minutos, para bloquear a peroxidase endógena, lavadas em PBS, e incubadas em solução de bloqueio da biotina endógena (Super Block® Blocking Buffer- Pierce) por 2hs. Os anticorpos biotinilados (BD PharMingen) foram diluídos em PBS com Tween 20 a 0,3% (na proporção 1:25 ICAM e 1:100 PECAM) e sobrepostos aos cortes para incubação por um período de aproximadamente 16hs a 4°C. Paralelamente, foram realizadas reações controle substituindo-se o anticorpo por PBS com Tween 20 a 0,3%. Em seguida, as lâminas

foram incubadas com o complexo avidina-biotina peroxidase (Vector Laboratories, CA, USA) na diluição de 1:100, por 60 minutos. A revelação foi feita com solução de diaminobenzidina (DAB) durante 1 minuto. O material foi contra-corado com hematoxilina, submetido à desidratação (etanol 70%, 90%, 95%, 100%), à diafanização (xilol) e recoberto por lamínula.

A análise comparativa e a quantificação das moléculas de adesão foram avaliadas em microscópio associado a computador com programa de análise de imagem (KS300 Kontron). Os resultados serão expressos em unidade arbitrária de densidade de coloração de DAB.

3.11. Análise estatística

Os dados foram analisados por teste T, quando duas médias foram comparadas e análise de variância (ANOVA), quando mais de duas médias foram comparadas. A diferença entre médias foi testada pelo teste de Tukey. As curvas concentração-resposta foram obtidas através de regressão não linear. Toda a análise foi feita utilizando o software GraphPad Prism.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização dos animais

A deficiência hormonal foi constatada pela dosagem de corticosterona plasmática, GCen predominante em ratos. Os valores encontrados em animais ADR foram extremamente baixos, sempre inferior a $0,58\mu\text{g/dL}$ ($n=18$) e significativamente menor que os valores obtidos em animais controles, que variou de 2 a $12\mu\text{g/dL}$ ($n=18$).

O efeito da adrenalectomia sobre o ganho de peso corporal dos animais foi determinado pela diferença de peso antes e 7 dias após as cirurgias. Os valores apresentados na Tabela 1 mostram que animais ADR perderam peso enquanto que o ganho de peso nos grupos de animais controles foi similar.

TABELA 1 – Efeito da adrenalectomia bilateral sobre o peso dos animais. Os valores foram obtidos antes e 7 dias após a cirurgia. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ e.p.m. n = número de animais.

Animais	Peso inicial(g)	Peso final(g)	Diferença(g)
Normal (n=30)	208,31 $\pm$ 4,32	253,85 $\pm$ 4,31	45,54 $\pm$ 1,61
Falso-operado (n=30)	219,97 $\pm$ 5,48	258,77 $\pm$ 5,22	38,80 $\pm$ 1,64
Adrenalectomizado (n=28)	219,81 $\pm$ 6,26	215,23 $\pm$ 5,72	- 4,57 $\pm$ 3,32*

* significativamente diferente do grupo normal e FO ($p<0,05$)

4.2. Efeitos dos GEn sobre eventos que modificam o comportamento rolling

4.2.1. Fluxo dos vasos da microcirculação

O possíveis efeitos da ausência de GCen sobre o fluxo sanguíneo foi determinado pela velocidade dos eritrócitos em vênulas pós-capilares e arteríolas do músculo cremaster. As mensurações foram realizadas *in situ* utilizando a microscopia intravital associada a velocímetro tipo “Doppler”.

Os dados obtidos mostraram que a velocidade de eritrócitos em vênulas e arteríolas foi equivalente nos três grupos de animais estudados (Tabela 2).

TABELA 2- Efeito da adrenalectomia sobre a velocidade de eritrócitos em arteríolas e vênulas pós-capilares do músculo cremaster. Os valores estão expressos como média $\pm$ e.p.m. de 10 campos em cada grupo de animais.

	Normal	Falso-operado	Adrenalectomizado
Diâmetro Arteriolar (μm)	19,02 $\pm$ 1,13 n = 10	20,18 $\pm$ 1,97 n = 10	20,38 $\pm$ 1,60 n = 10
Diâmetro Venular (μm)	18,07 $\pm$ 0,78 n = 10	22,97 $\pm$ 1,34 n = 10	20,11 $\pm$ 1,08 n = 10
Velocidade de eritrócitos arteriolar (mm/seg)	3,46 $\pm$ 0,12 n = 10	3,45 $\pm$ 0,09 n = 10	3,13 $\pm$ 0,06 n = 10
Velocidade de eritrócitos venular (mm/seg)	2,38 $\pm$ 0,08 n = 10	2,48 $\pm$ 0,07 n = 10	2,61 $\pm$ 0,04 n = 10

4.2.2. Hematopoese

A quantificação do mielograma mostrou que a ausência de GCen não altera a produção e/ou maturação de leucócitos mononucleares (dados não mostrados). No entanto, os resultados apresentados na FIGURA 1 mostram que a deficiência hormonal acarretou modificações significativas nas etapas

de maturação de leucócitos PMN, demonstrados pela diminuição dos números de leucócitos imaturos e aumento na fase blástica em animais ADR quando comparados com os valores em animais controles.

O leucograma demonstrou que os números de linfócitos e monócitos foram equivalentes nos três grupos de animais estudados. Por outro lado, o número de PMN circulantes foi significativamente maior em animais ADR que em animais controles, falso-operados ou normais (FIGURA 2).

FIGURA 1- Efeitos da ausência de GCen sobre o maturação de PMN. Os animais foram anestesiados pelo pentobarbital sódico (65 mg/Kg, i.p.) e a medula óssea femural foi superfundida com meio McCoy's 5A[®] modificado. As contagens de leucócitos totais foram realizadas em hemocítômetro de Neubauer, após diluição de 1:100 Líquido de Türk, e as diferenciais em lâminas coradas por May Grunwald-Giensa modificado e peroxidase. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m. de 6 animais em cada grupo. *P<0,05 em comparação aos respectivos valores obtidos em animais dos grupos controles.

FIGURA 2- Efeitos da ausência de GCen sobre o leucograma. Os animais foram anestesiados pelo pentobarbital sódico (65 mg/Kg, i.p.) e o sangue foi coletado por punção da aorta abdominal. As contagens de leucócitos totais foram realizadas em hemocitômetro de Neubauer, após diluição de 1:20 Líquido de Türk, e as diferenciais em lâminas coradas por May Grunwald-Giensa modificado. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m. de 6 animais em cada grupo. *P<0,05 em comparação aos respectivos valores obtidos em animais dos grupos controles

4.2.3. Expressão de CD62L nas células da medula óssea

A determinação da expressão de CD62L nas membranas de células precursoras de leucócitos presentes na medula óssea demonstrou que a deficiência de GCen acarretou diminuição na expressão desta molécula em PMN segmentados, uma vez que os valores obtidos foram significativamente menores em PMN de animais ADR em relação à expressão em PMN de animais dos grupos controles falso-operados ou normais (FIGURA 3). A estimulação com fMLP promoveu aumento na expressão desta molécula nas células provenientes dos três grupos de animais, no entanto o incremento observado em PMN de animais ADR foi maior que o obtido em PMN de animais falso-operados ou normais (FIGURA 3). A análise da expressão diferenciada mostrou que a maior habilidade na expressão da molécula de adesão após estímulo com fMLP não é decorrente de modificação na população de PMN (FIGURA 4).

Diferentemente, a ausência de GCen não alterou a expressão de CD62L nos demais tipos celulares, caracterizadas como granulocítica/monocítica (FIGURA 5) ou mononucleares (FIGURA 6).

FIGURA 3- Efeitos da ausência de GCen sobre a expressão de CD62L em PMN da medula óssea. Os animais foram anestesiados pelo pentobarbital sódico (65 mg/Kg, i.p.) e a medula óssea femural foi superfundida com solução tamponada de Hanks contendo 1% de EDTA. Após lise de eritrócitos com solução 0,13 M de cloreto de amônio, as células brancas foram lavadas com solução tamponada de Hanks. A expressão basal ou estimulada (fMLP, 10^{-8} M, 15 min, 37°C) de CD62L foi mensurada em 1×10^6 células incubadas (37 °C, 20 min) com anticorpo monoclonal de camundongos contra rato marcado com isotiocianato de fluoresceína. A quantificação da expressão foi realizada em FACs calibur. Os dados expressam a média $\pm$ e.p.m. de células obtidas de 6 animais em cada grupo. *P<0,05 em relação aos valores obtidos em células de animais controles e **P<0,05 em relação aos respectivos valores basais.

FIGURA 4- Efeito da ausência de GCen sobre a população de PMN de ADR na medula óssea. Os animais foram anestesiados pelo pentobarbital sódico (65 mg/Kg, i.p.) e a medula óssea femoral foi superfundida com solução tamponada de Hanks contendo 1% de EDTA. Após lise de eritrócitos com solução 0,13 M de cloreto de amônio, as células brancas foram lavadas com solução tamponada de Hanks. A população de PMN foi separada das demais populações pelo FACS calibur. As áreas circundadas representam os percentuais de PMN que expressam CD62L em um animal ADR antes e após o estímulo com fMLP.

FIGURA 5 - Efeitos da ausência de GCen sobre a expressão de CD62L em granulócitos e monócitos da medula óssea. Os animais foram anestesiados pelo pentobarbital sódico (65 mg/Kg, i.p.) e a medula óssea femural foi superfundida com solução tamponada de Hanks contendo 1% de EDTA. Após lise de eritrócitos com solução 0,13 M de cloreto de amônio, as células brancas foram lavadas com solução tamponada de Hanks. A expressão basal ou estimulada (fMLP, 10^{-8} M, 15 min, 37°C) de CD62L foi mensurada em 1×10^6 células incubadas (37 °C, 20 min) com anticorpo monoclonal de camundongos contra rato marcado com isotiocianato de fluoresceína. A quantificação da expressão foi realizada em FACs calibur. Os dados expressam a média $\pm$ e.p.m. de células obtidas de 6 animais em cada grupo.

FIGURA 6- Efeitos da ausência de GEn sobre a expressão de CD62L em células mononucleares da medula óssea. Os animais foram anestesiados pelo pentobarbital sódico (65 mg/Kg, i.p.) e a medula óssea femural foi superfundida com solução tamponada de Hanks contendo 1% de EDTA. Após lise de eritrócitos com solução 0,13 M de cloreto de amônio, as células brancas foram lavadas com solução tamponada de Hanks. A expressão basal ou estimulada (fMLP, 10^{-8} M, 15 min, 37°C) de CD62L foi mensurada em 1×10^6 células incubadas (37 °C, 20 min) com anticorpo monoclonal de camundongos contra rato marcado com isotiocianato de fluoresceína. A quantificação da expressão foi realizada em FACs calibur. Os dados expressam a média $\pm$ e.p.m. de células obtidas de 6 animais em cada grupo.

4.2.4. Efeitos sobre a expressão de CD62L em leucócitos circulantes

Os dados obtidos demonstraram que a expressão de CD62L em leucócitos totais de animais ADR é maior que em leucócitos de animais falso-operados ou normais. A análise diferencial em PMN e mononucleares (MN) demonstrou que a maior expressão em ADR reflete a expressão exacerbada em PMN deficientes de GCen. A expressão em células mononucleares foi equivalente nos três grupos de animais (FIGURA 7). Adicionalmente, os resultados mostraram que a maior expressão em PMN é resultante do maior número de células na circulação e da maior capacidade individual destas células expressarem CD62L (FIGURA 8).

O aumento na expressão após estimulação com fMLP, tanto em leucócitos totais como em PMN, também foi maior em animais ADR que nos demais grupos de animais (FIGURA 7).

FIGURA 7- Efeitos da ausência de GCen sobre a expressão de CD62L nos leucócitos circulantes. Os animais foram anestesiados pelo pentobarbital sódico (65 mg/Kg, i.p.) e o sangue coletado, por meio de punção da aorta abdominal, utilizando-se EDTA 1% como anticoagulante. Após lise de eritrócitos com solução 0,13 M de cloreto de amônio, os leucócitos foram lavados com solução tamponada de Hanks. A expressão basal ou estimulada (fMLP, 10^{-8} M, 15 min, 37°C) de CD62L foi mensurada em 1×10^6 células incubadas (37 °C, 20 min) com anticorpo monoclonal de camundongos contra rato marcado com isotiocianato de fluoresceína. A quantificação da expressão foi realizada em FACs calibur. Os dados expressam a média $\pm$ e.p.m. de leucócitos obtidos de 9 animais em cada grupo. *P<0,05 em relação aos valores obtidos em leucócitos de animais controles e **P<0,05 em relação aos respectivos valores basais.

Basal

fMLP

FIGURA 8- Efeito da ausência de GCen sobre a população de PMN circulantes que expressam CD62L. Os animais foram anestesiados pelo pentobarbital sódico (65 mg/Kg, i.p.) e o sangue coletado, por meio de punção da aorta abdominal, utilizando-se EDTA 1% como anticoagulante. Após lise de eritrócitos com solução 0,13 M de cloreto de amônio, os leucócitos foram lavados com solução tamponada de Hanks. A população de PMN foi separada das demais populações pelo FACS Calibur. As áreas circundadas representam os percentuais de PMN circulantes que expressam CD62L em um animal ADR antes e após o estímulo com fMLP.

4.3. Efeitos dos GCen sobre eventos que modificam a aderência

Com o intuito de investigar os efeitos específicos dos GCen sobre a capacidade de aderência de PMN ou da célula endotelial, foram realizados experimentos in vitro de aderência de neutrófilos a culturas primárias de células endoteliais da microcirculação de ratos. Os dados obtidos mostraram que a cultura de célula endotelial de animais ADR induz maior aderência de PMN obtidos de animais normais em comparação com a aderência em culturas de célula endotelial de animais controles (FIGURA 9A). Por outro lado, PMN provenientes de animais ADR aderiram menos à cultura primária de endotélio obtida de animal normal que PMN de animais falso-operado ou normal (FIGURA 9B).

FIGURA 9 – Efeito da ausência de GCen sobre a aderência de PMN à célula endotelial *in vitro*. Os animais foram anestesiados pelo pentobarbital sódico (65 mg/Kg, i.p.) e o sangue coletado, por meio de punção da aorta abdominal, utilizando-se EDTA 1% como anticoagulante. Os PMN foram obtidos a partir de centrifugação em gradiente de concentração com Percoll 56% e as células endoteliais foram obtidas de culturas primárias do músculo cremaster dos animais. A quantificação das células aderidas foi determinada pela dosagem da enzima mieloperoxidase por absorbância em leitora de Elisa 450nm, utilizando-se uma curva padrão com quantidades conhecidas de PMN (10^4 a $1,56 \times 10^2$ PMN). Os dados expressam a média $\pm$ e.p.m. de três experimentos realizados em quadruplicata. * $P < 0,05$ em relação aos valores obtidos de animais controles.

4.3.1. Expressão de CD18 nas células da medula óssea

Os dados apresentados nas figuras 10,11 e 12 mostram que a ausência de GCen não afetou a expressão de CD18 na membrana de células precursoras de leucócitos presentes na medula óssea. Adicionalmente, a deficiência hormonal também não comprometeu a habilidade dos PMN expressarem a molécula em condições de estimulação, uma vez que os aumentos na expressão foram equivalentes nas células obtidas de animais ADR, FO ou normais (FIGURA 10).

FIGURA 10- Efeitos da ausência de GCen sobre a expressão de CD18 em PMN da medula óssea. Os animais foram anestesiados pelo pentobarbital sódico (65 mg/Kg, i.p.) e a medula óssea femural foi superfundida com solução tamponada de Hanks contendo 1% de EDTA. Após lise de eritrócitos com solução 0,13 M de cloreto de amônio, as células brancas foram lavadas com solução tamponada de Hanks. A expressão basal ou estimulada (fMLP, 10^{-8} M, 15 min, 37°C) de CD18 foi mensurada em 1×10^6 células incubadas (37 °C, 20 min) com anticorpo monoclonal de camundongos contra rato marcado com isotiocianato de fluoresceína. A quantificação da expressão foi realizada em FACs calibur. Os dados expressam a média $\pm$ e.p.m. de células obtidas de 6 animais em cada grupo. * $P < 0,05$ em relação aos respectivos valores basais.

FIGURA 11- Efeitos da ausência de GCen sobre a expressão de CD18 em granulócitos e monócitos da medula óssea. Os animais foram anestesiados pelo pentobarbital sódico (65 mg/Kg, i.p.) e a medula óssea femural foi superfundida com solução tamponada de Hanks contendo 1% de EDTA. Após lise de eritrócitos com solução 0,13 M de cloreto de amônio, as células brancas foram lavadas com solução tamponada de Hanks. A expressão basal ou estimulada (fMLP, 10^{-8} M, 15 min, 37°C) de CD18 foi mensurada em 1×10^6 células incubadas (37 °C, 20 min) com anticorpo monoclonal de camundongos contra rato marcado com isotiocianato de fluoresceína. A quantificação da expressão foi realizada em FACs calibur. Os dados expressam a média $\pm$ e.p.m. de células obtidas de 6 animais em cada grupo.

FIGURA 12- Efeitos da ausência de GCen sobre a expressão de CD18 em células mononucleares da medula óssea. Os animais foram anestesiados pelo pentobarbital sódico (65 mg/Kg, i.p.) e a medula óssea femural foi superfundida com solução tamponada de Hanks contendo 1% de EDTA. Após lise de eritrócitos com solução 0,13 M de cloreto de amônio, as células brancas foram lavadas com solução tamponada de Hanks. A expressão basal ou estimulada (fMLP, 10^{-8} M, 15 min, 37°C) de CD18 foi mensurada em 1×10^6 células incubadas (37 °C, 20 min) com anticorpo monoclonal de camundongos contra rato marcado com isotiocianato de fluoresceína. A quantificação da expressão foi realizada em FACs calibur. Os dados expressam a média $\pm$ e.p.m. de células obtidas de 6 animais em cada grupo.

4.3.2. Expressão de CD18 nos leucócitos circulantes

Os resultados obtidos mostraram que a expressão basal e estimulada com fMLP de CD18 em leucócitos circulantes foi equivalente em leucócitos de animais ADR, FO ou normais (Figura 13). Ainda é interessante salientar que não houve uma modificação na população de PMN após o estímulo com fMLP (Figura 14).

FIGURA 13 - Efeitos da ausência de GCen sobre a expressão de CD18 nos leucócitos circulantes. Os animais foram anestesiados pelo pentobarbital sódico (65 mg/Kg, i.p.) e o sangue coletado, por meio de punção da aorta abdominal, utilizando-se EDTA 1% como anticoagulante. Após lise de eritrócitos com solução 0,13 M de cloreto de amônio, os leucócitos foram lavados com solução tamponada de Hanks. A expressão basal ou estimulada (fMLP, 10^{-8} M, 15 min, 37°C) de CD18 foi mensurada em 1×10^6 células incubadas (37 °C, 20 min) com anticorpo monoclonal de camundongos contra rato marcado com isotiocianato de fluoresceína. A quantificação da expressão foi realizada em FACs calibur. Os dados expressam a média $\pm$ e.p.m. de leucócitos obtidos de 9 animais em cada grupo. *P<0,05 em relação aos valores basais.

Basal

fMLP

FIGURA 14- Efeitos da ausência de GCen sobre a população de PMN de ADR circulantes que expressam CD18. Os animais foram anestesiados pelo pentobarbital sódico (65 mg/Kg, i.p.) e o sangue coletado, por meio de punção da aorta abdominal, utilizando-se EDTA 1% como anticoagulante. Após lise de eritrócitos com solução 0,13 M de cloreto de amônio, os leucócitos foram lavados com solução tamponada de Hanks. A população de PMN que expressam CD18 foi quantificada pelo FACS Calibur. As áreas circundadas representam os percentuais de PMN circulantes que expressam CD18 em um animal ADR antes e após o estímulo com fMLP.

4.3.3. Expressão de PECAM-1 e ICAM-1 na célula endotelial

Com o intuito de avaliar o papel dos GCen sobre a expressão de moléculas de adesão no endotélio que participam da aderência, foram realizados experimentos de imunohistoquímica em vasos da microcirculação obtidos de testículos de rato. Os dados obtidos mostraram que animais ADR apresentaram uma expressão basal maior de PECAM-1 (Figura 15) e ICAM-1 (Figura 16) em comparação aos animais FO e normais.

FIGURA 15- Efeitos da ausência dos GCen sobre a expressão de PECAM-1 em células endoteliais. Os animais foram anestesiados pelo pentobarbital sódico (65 mg/Kg, i.p.) e seus testículos foram retirados e inseridos em banho de hexana imersa em nitrogênio líquido para congelamento gradativo. Os cortes foram feitos na espessura de 8 μ m em criostato a -25°C . Após bloqueio dos sítios inespecíficos com solução Super Block[®] Blocking Buffer, a expressão basal de PECAM-1 foi mensurada nas células endoteliais com anticorpo monoclonal de camundongo contra ratos ligado a biotina. A revelação foi feita com solução de diaminobenzidina (DAB). Os dados expressam a média $\pm$ e.p.m. da intensidade de coloração de DAB em vasos obtidos de 3 animais em cada grupo.

FIGURA 16- Efeitos da ausência dos GCen sobre a expressão de ICAM-1 em células endoteliais. Os animais foram anestesiados pelo pentobarbital sódico (65 mg/Kg, i.p.) e seus testículos foram retirados e inseridos em banho de hexana imersa em nitrogênio líquido para congelamento gradativo. Os cortes foram feitos na espessura de 8 μ m em criostato a -25°C . Após bloqueio dos sítios inespecíficos com solução Super Block[®] Blocking Buffer, a expressão basal de ICAM-1 foi mensurada nas células endoteliais com anticorpo monoclonal de camundongo contra ratos ligado a biotina. A revelação foi feita com solução de diaminobenzidina (DAB). Os dados expressam a média $\pm$ e.p.m. da intensidade de coloração de DAB em vasos obtidos de 3 animais em cada grupo.

4.4. Participação do receptor citosólico nos efeitos sobre o rolling e a aderência de leucócitos circulantes

Com o intuito de investigar a participação do receptor citosólico sobre o comportamento rolling e aderência dos leucócitos circulantes, foram realizados ensaios de citometria de fluxo para determinar a expressão de CD62L, CD18 e quantificação do número de PMN que expressam essas moléculas. Os dados obtidos mostraram que o tratamento com o antagonista do receptor de GC, RU 38 486, não alterou a capacidade dos leucócitos expressarem CD62L (Figura 17) e CD18 (Figura 18) e nem o número de PMN que expressam ambas as moléculas (Figuras 17 e 18).

FIGURA 17- Efeito do tratamento com RU 38 486 sobre a expressão de CD62L em leucócitos circulantes (A) e a população de PMN que expressam a molécula (B). Os animais receberam doses de 10mg/kg, por via subcutânea (s.c.), 12 horas e 2 horas antes do início dos ensaios. Em seguida, foram anestesiados pelo pentobarbital sódico (65 mg/Kg, i.p.) e o sangue coletado, por meio de punção da aorta abdominal, utilizando-se EDTA 1% como anticoagulante. Após lise de eritrócitos com solução 0,13 M de cloreto de amônio, os leucócitos foram lavados com solução tamponada de Hanks. A expressão basal de CD62L foi mensurada em 1×10^6 células incubadas (37 °C, 20 min) com anticorpo monoclonal de camundongos contra rato marcado com isotiocianato de fluoresceína. A quantificação da expressão foi realizada em FACs calibur. Os dados expressam a média $\pm$ e.p.m. de células obtidas de 6 animais em cada grupo.

FIGURA 18- Efeito do tratamento com RU 38 486 sobre a expressão de CD18 em leucócitos circulantes (A)) e a população de PMN que expressam a molécula (B). Os animais receberam doses de 10mg/kg, por via subcutânea (s.c.), 12horas e 2 horas antes do início dos ensaios. Em seguida, foram anestesiados pelo pentobarbital sódico (65 mg/Kg, i.p.) e o sangue coletado, por meio de punção da aorta abdominal, utilizando-se EDTA 1% como anticoagulante. Após lise de eritrócitos com solução 0,13 M de cloreto de amônio, os leucócitos foram lavados com solução tamponada de Hanks. A expressão basal de CD18 foi mensurada em 1×10^6 células incubadas (37 °C, 20 min) com anticorpo monoclonal de camundongos contra rato marcado com isotiocianato de fluoresceína. A quantificação da expressão foi realizada em FACs calibur. Os dados expressam a média $\pm$ e.p.m. de células obtidas de 6 animais em cada grupo.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesta fase de investigação mostram que o modelo experimental empregado para induzir deficiência hormonal está adequado para a realização dos ensaios, que visam a investigação do papel dos GCen sobre os mecanismos que regem a migração leucocitária. Os dados aqui encontrados mostram que os valores de corticosterona no plasma, glicocorticóide predominante em ratos, são extremamente baixos e significativamente diferentes dos obtidos nos animais controles.

A adrenalectomia bilateral é um procedimento empregado exaustivamente para detecção da influência de GCen em diferentes processos fisiopatológicos. Neste contexto, no que tange a influência sobre a resposta inflamatória, foi demonstrado através da adrenalectomia bilateral que os GCen são secretados nas etapas iniciais de uma reação inflamatória, e que exercem diferentes efeitos moduladores no processo (GARCIA-LEME, 1989; HADDAD *et al.*, 2002). No entanto, a retirada das glândulas adrenais promove também a depleção de mineralocorticóides e aminas simpatomiméticas secretadas pelo córtex e medula adrenal, respectivamente. Desta forma, este procedimento cirúrgico constituiu a linha inicial de investigação, com o subsequente emprego de terapia farmacológica que inclui a metopirona, agente farmacológico que bloqueia a produção de glicocorticóides, mas mantém a atividade mineralocorticóide e da função medular da glândula (BARNES, 1998).

Além dos valores de corticosterona extremamente baixos, verificamos que os animais ADR não ganharam peso corporal durante os 7 dias entre a cirurgia e os inícios dos experimentos. Este efeito não é decorrente do estresse cirúrgico, já que animais falso-operados, que sofreram a mesma manipulação que os ADR, mas a glândula adrenal foi preservada, tiveram ganho de peso corporal equivalente aos animais normais. Está muito bem estabelecido na literatura que os GCen interferem com o metabolismo de proteínas e carboidratos e, desta forma modulam importantes atividades metabólicas (CASADEVALL, *et al.*, 1999). Adicionalmente, a ausência de

aminas simpatomiméticas e mineralocorticóides contribui para os distúrbios metabólicos, que promovem incremento na concentração de glicose e diminuição na secreção de insulina (KAWAI & KUZUYA, 1977; BISHAYI & GHOST, 2003).

Como já citado na Introdução, a interação dos leucócitos circulantes ao endotélio de vênulas pós-capilares é etapa inicial e fundamental para o recrutamento leucocitário na vigência de processo inflamatório (HARLAN, 1985; RAMPART, 1994; WIEDLE *et al.*, 2001). Foi demonstrado anteriormente que animais adrenalectomizados apresentam número maior de leucócitos em comportamento rolling em condições basais. Adicionalmente, a aplicação de estímulo inflamatório promove incremento exacerbado nas células brancas que aderem ao endotélio. A comprovação do papel dos GCen nos efeitos detectados foi conseguida pelos mesmos comportamentos leucocitários em animais tratados com metopirona (FARSKY *et al.*, 1995). Estes dados, em conjunto, sugerem o papel modulador dos GCen sobre os fenômenos de interação leucócito- endotélio, e que este pode ser um mecanismo importante na propriedade antiinflamatória destes hormônios.

A interação entre os leucócitos circulantes e o endotélio dos vasos da microcirculação é dependente de fluxo sangüíneo e das cargas elétricas e moléculas de adesão expressas nas membranas celulares. A diminuição do fluxo sangüíneo após um estímulo inflamatório contribui para marginação dos leucócitos (FIRREL & LIPOWSKY, 1989). Uma vez que em animais ADR o número de leucócitos "rollers" é maior que o observado em animais controles, seria possível inferir que o fluxo sangüíneo poderia estar diminuído nestes animais, e portanto, contribuir para o efeito. No entanto, os dados aqui obtidos descartam esta possibilidade e corroboram os dados anteriores de FARSKY *et al.*, (1995), uma vez que velocidade de eritrócitos em vênulas e arteríolas, foi equivalente em animais ADR, e controles FO e normais.

Dando continuidade à investigação dos mecanismos envolvidos na modulação dos GCen sobre a interação leucócito-endotélio, foi avaliada a

participação de L-selectina (CD62L) na etapa inicial desta interação. Sabe-se que a L-selectina é componente da membrana da maioria dos leucócitos e é a principal molécula responsável pelo comportamento "rolling" de neutrófilos sobre o endotélio (RAINER, 2002). Tem sido evidenciado que os GCex e os Gcen modulam a expressão desta molécula em neutrófilos de diferentes espécies animais, e que esta diminuição na expressão está associada à neutrofilia (FASSBENDER *et al.*, 1999; SEEKAMP *et al.*, 2001). É importante ressaltar que os trabalhos que demonstram o papel dos GGen sobre a expressão de L-selectina foram realizados em condições de estresse ou após manipulações experimentais que determinaram concentrações circulantes dos hormônios maiores que as encontradas fisiologicamente (LEE *et al.*, 1998; PREISLER *et al.*, 2000). Os nossos resultados ratificaram os dados de literatura, já que animais ADR apresentaram aumento na expressão de L-selectina na membrana de PMN circulantes, e mostraram ainda que a ausência hormonal aumenta o número dos PMN que expressam a molécula na circulação. A maior expressão em animais ADR foi ainda mais evidenciada quando as células foram estimuladas com o fMLP, o que pode sugerir que na ausência hormonal os PMN estão em estado de ativação alterado. Associados, estes dados sugerem que os GGen modulam a expressão de L-selectina em PMN e que este pode ser um dos responsáveis pelo aumento de leucócitos "rollers" em animais ADR, como já mencionado (FARSKY *et al.*, 1995).

O maior número de PMN circulantes que expressam L-selectina aqui detectado e os dados de literatura que associam o aumento de GC circulantes, tanto exógeno como endógeno à neutrofilia (LEE *et al.*, 1998; PREISLER *et al.*, 2000), conduziu nossas investigações para caracterização do papel dos GGen sobre a hematopoese e sobre a expressão de moléculas de adesão nas diferentes etapas de maturação celular. Assim, demonstramos que a ausência hormonal acarretou alteração no processo de maturação da série granulocítica, com deslocamento das células mais maduras para circulação, e conseqüente neutrofilia. Possivelmente, o mecanismo de ação dos CGen envolve a modulação da L-selectina, uma

vez que a expressão da molécula foi menor em granulócitos na última etapa de maturação. Trabalhos prévios demonstraram que a neutrofilia em coelhos após a administração de dexametasona pode ser decorrente de alterações de expressão de L-selectina em PMN na medula óssea (NAKAGAWA *et al.*, 1998; 1999). É importante salientar que a população de mononucleares não foi alterada quanto ao número de células circulantes (dados não mostrados) nem quanto à expressão da molécula de adesão.

Em conjunto, nossos resultados mostram o papel modulador dos GCen sobre a expressão de L-selectina em PMN tanto nas células presentes na medula como nas células circulantes. Estes efeitos podem ser responsáveis, pelo menos em parte, pela neutrofilia e pelo aumento de células em comportamento rolling detectado em animais adrenalectomizados. É importante ressaltar que a confirmação dos GCen nestes efeitos será realizada em ensaios que serão conduzidos em animais tratados com metopirona. Acreditamos que esta estratégia experimental seja a preponderante à reposição hormonal, pela dificuldade da manutenção dos valores fisiológicos de corticosterona após administrações sistêmicas.

Para avaliar os eventos que modificam a aderência, etapa subsequente ao comportamento "rolling" na mobilização leucocitária, foi verificada a habilidade de PMN aderirem à cultura primária de célula endotelial. Para tanto, PMN foram obtidos do sangue circulante e cultura primária de célula endotelial foi obtida do músculo cremaster de animais ADR, FO ou normal. Apesar dos ensaios *in vitro* apresentarem limitações, uma vez que o leucócito sofre ativação no processo de separação e o processo de aderência não contar com a participação dos demais componentes do sangue e da velocidade do fluxo sanguíneo, é uma estratégia experimental válida para estabelecer características individuais dos PMN e do endotélio no processo. Os resultados aqui detectados indicaram que os GCen parecem modular a aderência sobre a célula endotelial, visto que a aderência de PMN proveniente de animal normal ao endotélio de animal ADR foi maior que a obtida em endotélio de animais controles. Por outro lado, o efeito dos GCen sobre o PMN parece ser o

oposto, porque PMN de animal ADR adere menos à célula endotelial obtida de todos os grupos de animais estudados que PMN de animais controles.

Visando o esclarecimento destes dados, foi avaliado o papel dos GCen sobre a expressão de moléculas de adesão que medeiam o processo. Inicialmente investigamos os efeitos da ausência de GCen sobre a expressão de β_2 integrina (CD18), molécula presente exclusivamente em leucócitos e que medeiam a aderência ao endotélio e sua subsequente diapedese. Diferentemente do papel dos GC exógenos, que sob diferentes condições experimentais inibem a expressão de β_2 integrina (DAVENPECK *et al.*, 1998; BRANDT *et al.*, 2000; LIM *et al.*, 2000), os dados existentes na literatura indicam que os GCen não interferem com a expressão destas moléculas em leucócitos circulantes. Apenas FASSBENDER *et al.* (1999) mostraram que após estresse cirúrgico em humanos, onde altas concentrações hormonais são encontradas, a expressão de integrinas foi discretamente aumentada. Os nossos resultados corroboraram a literatura, uma vez que a ausência do hormônio não alterou a expressão basal e/ou estimulada com fMLP de CD18 na membrana de leucócitos circulantes de animais ADR. Diferentemente do observado para a expressão de L-selectina, o número de leucócitos circulantes que expressam a moléculas foi equivalente nos três grupos de animais, indicando que apesar da neutrofilia existente não há um aumento do número de PMN que expressam a β_2 integrina.

Tem sido demonstrado que além do papel de aderência ao microambiente hematopoiético (WAELE *et al.*, 1997; LICHTERFELD *et al.*, 2000; LUNDAHL *et al.*, 2002; CARION *et al.*, 2002) as integrinas funcionam como sinalizadoras intracelulares para a maturação leucocitária (TAKEDA *et al.*, 2003; SHI *et al.*, 2004). Como nos animais ADR foi observada alteração na maturação da série granulocítica, avaliamos o papel dos GCen na expressão de CD18 nas diferentes etapas de maturação celular. Os dados obtidos mostraram que a ausência de GCen não afetou a expressão de CD18 na membrana de células precursoras de leucócitos presentes na medula óssea. Adicionalmente, a deficiência hormonal também não

comprometeu a habilidade dos PMN expressarem a molécula em condições de estimulação, uma vez que os aumentos na expressão foram equivalentes nas células obtidas de animais ADR, FO ou normais após estimulação com fMLP.

Os ligantes para as $\beta 2$ integrinas na célula endotelial são as moléculas pertencentes à família das imunoglobulinas (GONZÁLEZ-AMARO & SÁNCHEZ-MADRID, 1999). Uma vez que mostramos que a célula endotelial proveniente de animais ADR possui maior habilidade de aderir PMN *in vitro*, investigamos o papel hormonal sobre a expressão das imunoglobulinas. Para tanto, foram realizadas reações de imunohistoquímica em vasos da microcirculação obtidos de músculo cremaster. Os resultados obtidos até o momento mostraram que a ausência do hormônio acarretou aumento na expressão de PECAM-1 e ICAM -1, indicando um papel modulador dos GCen sobre estas moléculas que participam da aderência no fenômeno de interação leucócito-endotélio. Estes dados confirmam os resultados encontrados na literatura que mostraram inibição da expressão imunoglobulinas e P e E-selectinas em concentrações elevadas de GCen em situações patológicas, como a artrite reumatóide (LEECH *et al.*, 1998) e em diferentes modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* após administração de GC exógenos (TAILOR *et al.*, 1999; POLAT *et al.*, 2002). É objetivo imediato deste trabalho a investigação dos efeitos dos GCen sobre as demais imunoglobulinas e selectinas.

Em conjunto os dados do papel dos GCen sobre a aderência indicam efeitos diferentes dos hormônios sobre a célula endotelial e PMN. A ausência hormonal acarretou aumento na capacidade de aderência da célula endotelial e aumento na expressão imunoglobulinas (PECAM-1 e ICAM-1). Diferentemente, determinou diminuição na capacidade de aderência de PMN e não alterou a expressão de $\beta 2$ integrinas.

Como vem sendo descrito na literatura, o mecanismo molecular de ação dos GC nas diferentes etapas da mobilização local de leucócitos parece envolver o receptor citosólico. A administração de RU 38 486, antagonista do receptor de GC, abolem completamente a redução de influxo

de leucócitos provocada pelos hormônios em diferentes modelos experimentais de inflamação (PEERS *et al.*, 1988, LEECH *et al.*, 1998). Adicionalmente, foi mostrado que animais normais tratados com o antagonista apresentam o mesmo padrão de interação leucócito-endotélio que animais ADR (FARSKY *et al.*, 1995). Com o intuito de investigar a participação deste receptor sobre as moléculas de adesão envolvidas nos fenômenos de "rolling" e aderência, foram realizados ensaios de citometria de fluxo com animais tratados com o RU 38 486. Os resultados mostraram que o tratamento com o antagonista não alterou a capacidade dos leucócitos expressarem CD62L e CD18, e nem modificou o número de PMN que expressaram a selectina, como detectado em animais ADR. A participação do receptor citosólico na expressão de moléculas de adesão tem sido bem demonstrado recentemente após administração exógena de GC. LIM *et al.* (2000) mostraram que a incubação de eosinófilos de camundongos com dexametasona promovia diminuição na expressão de CD11b, e que este efeito era bloqueado pela administração de RU 38 486. Weber *et al.*, (2004) demonstraram que a administração de dexametasona em gatos provocou diminuição na expressão de RNAm CD62L em neutrófilos circulantes e que o efeito envolvia a participação do receptor citosólico para GC. Além de mostrar a importância do mecanismo de ação gênomico na expressão de CD62L, este trabalho evidenciou que a modulação sobre a molécula está associada à inibição de síntese e não somente à sua clivagem protéica.

A discussão do mecanismo molecular de ação hormonal tem sido amplamente evidenciada ultimamente e diferenças marcadas estão sendo observadas. Neste contexto, um outro mecanismo, conhecido como não gênomico, tem sido proposto para diferentes efeitos hormonais, entre os quais os antiinflamatórios, e parece estar relacionado às concentrações elevadas de GC. Os efeitos mediados por este mecanismo são rápidos (segundos e minutos) e não são abolidos pela ação de inibidores da transcrição gênica e síntese protéica. Acredita-se que sejam decorrentes de

interações físico-químicas dos GC com constituintes da membrana, incluindo canais de íons e proteínas de membrana celular (PITZALIS *et al.*, 2002)

Surpreendentemente, tem sido relatado papéis diferentes, até mesmo antagônicos, para os GC dependendo da concentração dos hormônios no sítio de ação. Uma série de trabalhos na literatura ilustram o papel estimulatório dos GC em eventos inflamatórios que incluem a síntese de proteínas de fase aguda hepática, a síntese de citocinas e receptores para as mesmas e sobre a apoptose. Interessantemente, estes efeitos são observados a baixas concentrações dos hormônios, próximas às concentrações basais encontradas *in vivo*. Assim, tem sido sugerido que os efeitos dos GCen no processo inflamatório pode ser tempo dependente, de acordo com a cinética de secreção hormonal e conseqüente concentração no sítio de ação (YEAGER *et al.*, 2004). Os dados obtidos até o momento mostram um papel diferencial dos GCen sobre as células durante a interação leucócito-endotélio. A modulação sobre a expressão de selectinas no leucócito e no endotélio podem ser os mecanismos responsáveis pelo controle inicial da interação celular inicial. Diferentemente, o efeito sobre a aderência parece ser primordialmente sobre a célula endotelial, modulando a expressão das super família das imunoglobulinas. Esses efeitos parecem depender da concentração e do tempo da ausência hormonal. No entanto, esta hipótese será melhor fundamentada após os ensaios com animais tratados com metopirona e inibição do receptor citosólico por período de tempo mais prolongado (7 dias), que estão em fase de execução.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos em animais adrenalectomizados permitem sugerir que a deficiência de GCen:

- 1) provoca perda de peso corporal;
- 2) não altera a velocidade de eritrócitos em arteríolas e vênulas pós-capilares,
- 3) acarreta neutrofilia, possivelmente pela alteração nas etapas de maturação da série granulocítica na medula;
- 4) provoca diminuição na expressão de CD62L nas membranas de leucócitos segmentados na última fase de maturação na medula óssea, e diferentemente, induz aumento na expressão desta molécula nas membranas de PMN presentes no compartimento periférico;
- 5) possivelmente não compromete a capacidade de síntese de CD62L em células da medula ou da circulação, uma vez que a expressão *in vitro* após estimulação com fMLP não foi alterada;
- 6) não altera a expressão de CD18 em células segmentadas na medula ou em PMN na circulação;
- 7) promove efeitos diferentes na habilidade de aderência de neutrófilos à célula endotelial *in vitro*: diminui e aumenta a habilidade de aderência de neutrófilos e da célula endotelial, respectivamente;
- 8) aumenta a expressão de PECAM-1 e ICAM-1 na célula endotelial.

Adicionalmente, os resultados obtidos em animais tratados com RU 38486 indicam que o receptor citosólico de GC não participa da alteração na expressão de CD62L em neutrófilos circulantes.

Em conjunto, podemos concluir que os GCen podem modular a interação leucócito-endotélio pelo controle das etapas de maturação e distribuição de neutrófilos na circulação, possivelmente por modular a expressão de L-selectina, e ainda, os GCen podem modular a expressão de imunglobulinas (ICAM-1 e PECAM-1) na célula endotelial responsáveis pela aderência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, R.; SHIMOSEGAWA, T.; KIMURA, K.; ABE, T.; KASHIMURA, J.; KOIZUMI, M.; TOYOTA, T. The role of endogenous glucocorticoids in rat experimental models of acute pancreatitis. *Gastroenterology*, Miyagi, v.109, n.3, p.933-943, 1995.
- ALMAWI, W.Y.; MELEMEDJIAN, O.K.; Negative regulation of nuclear factor-kappaB activation and function by glucocorticoids. *J. Mol. Endocrinol.*, Manama, v.28, n.2, p.69-78, 2002.
- ARNAOUT, M.A.; PITT, J.; COHEN, H.J.; MELAMED, J.; ROSEN, F.S.; COLTEN, H.R.; Deficiency of a granulocyte-membrane glycoprotein (gp150) in a boy with recurrent bacterial infections. *N. Engl. J. Med.*, v.306, n.12, p.693-699, 1982.
- BARNES, P.J.; ADCOCK, I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends. Pharmacol. Sci.*, London, v.14, n.12, p.436-441, 1993.
- BARNES, P.J. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin. Sci.*, London, v.94, n.6, p.557-572, 1998.
- BISHAYI, B.; GHOST, S. Metabolic and immunological responses associated with in vivo glucocorticoid depletion by adrenalectomy in mature Swiss albino rats. *Life Sci.*, West Bengal, v.73, n.24, p.3159-3174, 2003.
- BLAGOVESHCHENSKAYA, A.D.; HEWITT, E.W.; CUTLER, D.F. A balance of opposing signals within the cytoplasmic tail controls the lysosomal targeting of P-selectin. *J. Biol. Chem.*, London, v.273, n.43, p.27896-27903, 1998.
- BORDERS, J.L.; GRANGER, H.J. An optical doppler intravital velocimeter. *Microvasc. Res.*, v.27, n.1, p.117-127, 1984.
- BORLAND, G.; MURPHY, G.; AGER, A. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits shedding of L-selectin from leukocytes. *J. Biol. Chem.*, London, v.274, n.5, p. 2810-2815, 1999.

- BRANDT, P.C.; VANAMAN, T.C. Elevated glucocorticoid receptor transactivation and down-regulation of alpha 1 integrin are associated with loss of plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform 1. *J. Biol. Chem.*, Texas, v.275, n.32, p.24534-24539, 2000.
- BRAUN, M.; PIETSCH, P.; FELIX, S.B.; BAUMANN, G. Modulation of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 on human coronary smooth muscle cells by cytokines. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, Berlin, v.27, n.12, p.2571-2579, 1995.
- BRUEHL, R.E.; SPRINGER, T.A.; BANTON, D.F. Quantification of L-selectin distribution on human leukocyte microvilli by immunogold labeling and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, San Francisco, v.44, n.8, p.835-844, 1996.
- BULLARD, C.D.; BEAUDET, A.L. *The Selectins. Initiators of Leukocyte Endothelial Adhesion*, Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1997. p.133-142.
- BURNS, A.R.; BOWDEN, R.A.; ABE, Y.; WALKER, D.C.; SIMON, S.I.; ENTMAN, M.L.; SMITH, C.W. P-selectin mediates neutrophil adhesion to endothelial cell borders *J. Leukoc. Biol.*, Texas, v.65, n.3, p.299-306, 1999.
- BUTTGEREIT, F.; WEHLING, M.; BURMESTER, G.R. A new hypothesis of modular glucocorticoid actions: steroid treatment of rheumatic diseases revisited. *Arthritis Rheum.*, Berlin, v.41, n.5, p. 761-767, 1998.
- CARION, A.; DOMENECH, J.; HERAULT, O.; BENBOUBKER, L.; CLEMENT, N.; BERNARD, M.C.; DESBOIS, I.; COLOMBAT, P.; BINET, C. Decreased stroma adhesion capacity of CD34+ progenitor cells from mobilized peripheral blood is not lineage- or stage-specific and is associated with low beta 1 and beta 2 integrin expression. *J. Hematother. Stem. Cell. Res.*, France, v.11, n.3, p.491-500, 2002.
- CARLOS, T.M.; HARLAN, J.M. Membrane proteins involved in phagocyte adherence to endothelium. *Immunol. Ver.*, Washington, v. 114, p.5-28, 1990.

- CASADEVALL, M.; SAPERAS, E.; PANES, J.; SALAS, A.; ANDRESON, D.C.; MALAGELADA, J.R.; PIQUE, J.M. Mechanism underlying the anti-inflammatory action of central corticotropin releasing factor. *Am. J. Physiol.*, Barcelona, v.276, n.4, p.1016-1026, 1999.
- CASTAGLIUOLO, I.; KARALIS, K.; VALENICK, L.; PASHA, A.; NIKULASSON, S.; WLK, M.; POTHOUKAKIS, C. Endogenous corticosteroids modulate Clostridium difficile toxin A-induced enteritis in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, Boston, v.280, n.4, p.539-545, 2001.
- CHATILA, T.A.; GEHA, R.S.; ARNAOUT, M.A. Constitutive and stimulus-induced phosphorylation of CD11/CD18 leukocyte adhesion molecules. *J. Cell. Biol.*, Boston, v.109, n.6, p.3435-3444, 1989.
- CHEN, S.F.; FEI, X.; LI, S.H. A new simple method for isolation of microvascular endothelial cells avoiding both chemical and mechanical injuries. *Microvasc. Res.*, v.50, p.119-128.
- CHEN, W.; LEE, J.Y.; HSIEH, W.C. Effects of dexamethasone and sex hormones on cytokine-induced cellular adhesion molecule expression in human endothelial cells. *Eur. J. Dermatol.*, Tainan, v.12, n.5, p.445-448, 2002.
- CRONSTEIN, B.N.; KIMMEL, S.C.; LEVIN, R.I.; MARTINIUK, F.; WEISSMANN, G. A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, New York, v.89, n.21, p.9991-9995, 1992.
- CROWLEY, C.A.; CURNUTTE, J.T.; ROSIN, R.E.; ANDRE-SCHWARTZ, J.; GALLIN, J.I.; KLEMPNER, M.; SNYDERMAN, R.; SOUTHWICK, F.S.; STOSSEL, T.P.; BABIOR, B.M. An inherited abnormality of neutrophil adhesion. Its genetic transmission and its association with a missing protein. *N. Engl. J. Med.*, v.302, n.21, p.1163-1168, 1980.

- DANA, N.; ARNAOUT, M.A. Leucocyte adhesion molecules (CD11/CD18) deficiency. *In* Bailliere's Clin. Immunol. Allergy. vol.2, London: Baillier Tindall, 1988. p.453-476.
- DARCIE, J. V.; LEWIS, S. M. *In: Pratical haematology*, Churcill Livingstone, 1995. p.57-58.
- DAVENPECK, K.L.; ZAGORSKI, J.; SCHLEIMER, R.P.; BOCHNER, B.S. Lipopolysaccharide-induced leukocyte rolling and adhesion in the rat mesenteric microcirculation: regulation by glucocorticoids and role of cytokines. *J. Immunol.*, Baltimore, v.161, n.12, p.6861-6870, 1998.
- DE WAELE, M.; RENMANS, W.; DAMIAENS, S.; FLAMENT, J.; SCHOTS, R.; VAN RIET, I. Different expression of adhesion molecules on myeloid and B-lymphoid CD34+ progenitors in normal bone marrow. *Eur. J. Haematol.*, Brussels, v.59, n.5, p.277-286, 1997.
- DECKING, J.; MAYER, A.; PETROW, P.; SEIFFGE, D.; KARBOWSKI, A. Antibodies to PECAM-1 and glucocorticoids reduce leukocyte adhesion in adjuvant arthritis of the rat knee synovium in vivo. *Inflamm. Res.*, Mainz, v.50, n.12, p.609-615, 2001.
- DELISSER, H.M.; CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU, M.; SUN, J.; NAKADA, M.T.; SULLIVAN, K.E. Loss of endothelial surface expression of E-selectin in a patient with recurrent infections. *Blood*, Philadelphia, v.94, n.3, p.1999.
- DERRY, C.J.; FAVEEUW, C.; MORDSLEY, K.R.; AGER, A. Novel chondroitin sulfate-modified ligands for L-selectin on lymph node high endothelial venules. *Eur. J. Immunol.*, London, v.29, n.2, p.419-430, 1999.
- DIMITROFF, C.J.; LEE, J.Y.; SCHOR, K.S.; SANDMAIER, B.M.; SACKSTEIN, R. Differencial L-selectin binding activities of human hematopoietic cell L-selectin ligands IICELL and PSGL-1. *J. Biol. Chem.*, Boston, v.276, n.50, p.47623-47631, 2001.
- ETZIONI, A.; DOERSCHUK, C.M.; HARLAN, J.M. Of man and mouse: leukocyte and endothelial adhesion molecule deficiencies. *Blood*, Haifa, v.94, n.10, p.3281-3288, 1999.

- ETZIONI, A.; FRYDMAN, M.; POLLACK, S.; AVIDOR, I.; PHILLIPS, M.L.; PAULSON, J.C.; GERSHONI-BARUCH, R.P. Recurrent severe infections caused by a novel leukocyte adhesion deficiency. *N. Engl. J. Med.*, Haifa, v.327, n.25, p.327-1789, 1992.
- FARSKY, S.P.; SANNOMIYA, P.; GARCIA-LEME, J. Secreted glucocorticoids regulate leukocyte-endothelial interactions in inflammation. A direct vital microscopic study. *J. Leukoc. Biol.*, São Paulo, v.57, n.3, p.379-386, 1995.
- FASSBENDER, K.; KAPTUR, S.; BECKER, P.; GROSCHEL, J.; SCHMIDT, R.; HENNERICI, M. Inverse association between endogenous glucocorticoid secretion and L-selectin (CD62L) expression in trauma patients. *Life Sci.*, Mannheim, v.65, n.23, p.2471-2480, 1999.
- FESSLER, B.J.; PALIOGIANNI, F.; HAMA, N.; BALOW, J.E.; BOUMPAS, D.T. Glucocorticoids modulate CD28 mediated pathways for interleukin 2 production in human T cells: evidence for posttranscriptional regulation. *Transplantation.*, Maryland, v.62, n.8, p.1113-1118, 1996.
- FILEP, J.G.; DELALANDRE, A.; PAYETTE, Y.; FOLDES-FILEP, E. Glucocorticoid receptor regulates expression of L-selectin and CD11/CD18 on human neutrophils. *Circulation.*, Quebec, v.96, n.1, p.295-301, 1997.
- FIRRELL, J.C.; LIPOWSKY, H.H. Leukocyte margination and deformation in mesenteric venules of rat. *Am. Physiol.*, New York, v.256, n.6, p.1667-1674, 1989.
- FLOWER, R.J.; PARENTE, L.; PERSICO, P.; SALMON, J.A. A comparison of the acute inflammatory response in adrenalectomised and sham-operated rats. *Br. J. Pharmacol.*, v.87, n.1, p.57-62, 1986.
- FREEHAN, C.; DARLAK, K.; KAHAN, J.; WALCHECK, B.; SPATOLA, A.F.; KISHIMOTO, T.K. Shedding of the lymphocyte L-selectin adhesion molecule is inhibited by a hydroxamic acid-based protease inhibitor. Identification with an L-selectin-alkaline phosphatase reporter. *J. Biol. Chem.*, Ridgefield, v.271, n.12, p.7019-7024, 1996.

- GAHMBERG, C.G.; TOLVANEN, M.; KOTOVUORI, P. Leukocyte adhesion—structure and function of human leukocyte beta2-integrins and their cellular ligands. *Eur. J. Biochem.*, Helsinki, v.245, n.2, p.215-232, 1997.
- GARCIA-LEME, J. *Hormones and inflammation*, Boca Raton, CRC Press, 1989.
- GONZALEZ-AMARO, R.; SANCHEZ-MADRID, F. Cell adhesion molecules: selectins and integrins. *Crit. Rev. Immunol.*, San Luis Potosi, v.19, n.5-6, p.389-429, 1999.
- GOULDING, N.J.; OGBOURN, S.; PIPITONE, N.; BIAGINI, P.; GERLI, R.; PITZALIS, C. The inhibitory effect of dexamethasone on lymphocyte adhesion molecule expression and intercellular aggregation is not mediated by lipocortin 1. *Clin. Exp. Immunol.*, London, v.118, n.3, p.376-383, 1999.
- GRANGER, D.N.; KUBES, P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J. Leukoc. Biol.*, Shreveport, v.55, n.5, p.662-675, 1994.
- HADDAD, J.J.; SAADE, N.E.; SAFIEH-GARABEDIAN, B. Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis. *J. Neuroimmunol.*, San Francisco, v.133, n.1-2, p.1-19, 2002.
- HARLAN, J.M. Leukocyte-endothelial interactions. *Blood*, v.65, n.3, p.513-525, 1985.
- HARTWELL, D.W.; MAYADAS, T.N.; BERGER, G.; FRENETTE, P.S.; RAYBURN, H.; HYNES, R.O.; WAGNER, D.D. Role of P-selectin cytoplasmic domain in granular targeting in vivo and in early inflammatory responses. *J. Cell. Biol.*, Boston, v.143, n.4, p.1129-1141, 1998.
- HILL, G.E.; ALONSO, A.; THIELE, G.M.; ROBBINS, R.A. Glucocorticoids blunt neutrophil CD11b surface glycoprotein upregulation during cardiopulmonary bypass in humans. *Anesth. Analg.*, Nebraska, v.79, n.1, p.23-27, 1994.

- HOGG, N.; HENDERSON, R.; LEITINGER, B.; MCDOWALL, A.; PORTER, J.; STANLEY, P. Mechanisms contributing to the activity of integrins on leukocytes. *Immunol. Rev.*, London, v.186, p.164-171, 2002.
- HUBBARD, A.K.; ROTHLEIN, R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free. Radic. Biol.*, Storrs, v.28, n.9, p.1379-1386, 2000.
- HUO, Y.; LEY, K. Adhesion molecules and atherogenesis. *Acta. Physiol. Scand.*, Charlottesville, v.173, n.1, p.35-43, 2001.
- JUTILA, M.A.; ROTT, L.; BERG, E.L.; BUTCHER, E.C. Function and regulation of the neutrophil MEL-14 antigen in vivo: comparison with LFA-1 and MAC-1. *J. Immunol.*, Stanford, v.143, n.10, p.3318-3324, 1989.
- KANAME, H.; MORI, Y.; SUMIDA, Y.; KOJIMA, K.; KUBO, C.; TASHIRO, N. Changes in the leukocyte distribution and surface expression of adhesion molecules induced by hypothalamic stimulation in the cat. *Brain. Behav. Immun.*, Fukuoka, v.16, n.4, p.351-367, 2002.
- KANSAS, G.S. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood*, Chicago, v.88, n.9, p.3259-3287, 1996.
- KARSAN, A.; CORNEJO, C.J.; WINN, R.K.; SCHWARTZ, B.R.; WAY, W.; LANNIR, N.; GERSHONI-BARUCH, R.; ETZIONI, A.; OCHS, H.D.; HARLAN, J.M. Leukocyte Adhesion Deficiency Type II is a generalized defect of de novo GDP-fucose biosynthesis. Endothelial cell fucosylation is not required for neutrophil rolling on human nonlymphoid endothelium. *J. Clin. Invest.*, Vancouver, v.101, n.11, p.2438-2445, 1998.
- KAWAI, A.; KUZUYA, N. On the role of glucocorticoid in glucose induced insulin secretion. *Horm. Metab. Res.*, v.9, n.5, p.361-365, 1977.
- KIRVESKARI, J.; HELINTO, M.; MOILANEN, J.A.; PAAVONEN, T.; TERVO, T.M.; RENKONEN, R. Hydrocortisone reduced in vivo, inflammation-induced slow rolling of leukocytes and their extravasation into human conjunctiva. *Blood*, Helsinki, v.100, n.6, p.2203-2207, 2002.
- KONING, G.A.; SCHIFFELERS, R.M.; STORM, G. Endothelial cells at inflammatory sites as target for therapeutic intervention. *Endothelium*, Netherlands, v.9, n.3, p.161-171, 2002.

- KRZESICKI, R.F.; FLEMING, W.E.; WINTERROWD, G.E.; HATFIELD, C.A.; SANDERS, M.E.; CHIN, J.E. T lymphocyte adhesion to human synovial fibroblasts. Role of cytokines and the interaction between intercellular adhesion molecule 1 and CD11a/CD18. *Arthritis Rheum.*, Kalamazoo, v.34, n.10, p.1245-1253, 1991.
- KUROKOUCHI, K.; KAMBE, F.; KIKUMORI, T.; SAKAI, T.; SARKAR, D.; ISHIGURO, N; IWATA, H.; SEO, H. Effects of glucocorticoids on tumor necrosis factor alpha-dependent activation of nuclear factor kappaB and expression of the intercellular adhesion molecule 1 gene in osteoblast-like ROS17/2.8 cells. *J. Bone. Miner. Res.*, Nagoya, v.15, n.9, p.1707-1715, 2000.
- LAUE, L.; KAWAI, S.; BRANDON, D.D.; BRIGHTWELL, D.; BARNES, K.; KNAZEK, R.A.; LORIAUX, D.L.; CHROUSOS, G.P. Receptor-mediated effects of glucocorticoids on inflammation: enhancement of the inflammatory response with a glucocorticoid antagonist. *J. Steroid. Biochem.*, Bethesda, v.29, n.6, p.591-598, 1988.
- LEE, E.K.; KEHRLI JR, M.E. Expression of adhesion molecules on neutrophils of periparturient cows and neonatal calves. *Am. J. Vet. Res.*, Iowa, v.59, n.1, p.37-43, 1998.
- LEECH, M.; HUTCHINSON, P.; HOLDSWORTH, S.R.; MORAND, E.F. Endogenous glucocorticoids modulate neutrophil migration and synovial P-selectin but not neutrophil phagocytic or oxidative function in experimental arthritis. *Clin. Exp. Immunol.*, Melbourne, v.112, n.3, p.383-388, 1998.
- LEME, J.G.; SCHAPOVAL, E.E. Stimulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis by compounds formed in inflamed tissue. *Br. J. Pharmacol.*, São Paulo, v.53, n.1, p.75-83, 1975.
- LEME, J.G.; WILHELM, D.L. The effects of adrenalectomy and corticosterone on vascular permeability responses in the skin of the rat. *Br. J. Exp. Pathol.*, São Paulo, v.56, n.5, p.402-407, 1975.
- LEUNG, D.Y.; BLOOM, J.W. Update on glucocorticoid action and resistance. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, Denver, v.111, n.1, p.3-23, 2003.

- LEY, K. Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. *Immunol.Rev.*, Charlottesville, v.186, p.8-18, 2002.
- LI, Y.F.; KAWASHIMA, H.; WATANABE, N.; MIYASAKA, M. Identification and characterization of ligands for L-selectin in the kidney. II. Expression of chondroitin sulfate and heparan sulfate proteoglycans reactive with L-selectin. *FEBS Lett.*, Suita, v.444, n.2-3, p.201-205, 1999.
- LICHTERFELD, M.; MARTIN, S.; BURKLY, L.; HAAS, R.; KRONENWETT, R. Mobilization of CD34+ haematopoietic stem cells is associated with a functional inactivation of the integrin very late antigen 4. *Br. J. Haematol.*, Heidelberg, v.110, n.1, p.71-81, 2000.
- LIDEN, J.; RAFTER, I.; TRUSS, M.; GUSTAFSSON, J.A.; OKRET, S. Glucocorticoid effects on NF-kappaB binding in the transcription of the ICAM-1 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Huddinge, v.273, n.3, p.1008-1014, 2000.
- LIM, L.H.; FLOWER, R.J.; PERRETTI, M.; DAS, A.M. Glucocorticoid receptor activation reduces CD11b and CD49d levels on murine eosinophils: characterization and functional relevance. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, London, v.22, n.6, p.693-701, 2000.
- LUJAN, S.; MASJUAN, J.; ROLDAN, E.; VILLAR, L.M.; GONZALEZ-PORQUE, P.; ALVAREZ-CERMENO, J.C. The expression of integrins on activated T-cells in multiple sclerosis. Effect of intravenous methylprednisolone treatment. *Mult. Scler.*, Madrid, v.4, n.3, p.239-242, 1998.
- LUNDAHL, J.; SEHMI, R.; MOSFEGH, A.; HAYES, L.; HOWIE, K.; UPHAM, J.; DENBURG, J.A. Distinct phenotypic adhesion molecule expression on human cord blood progenitors during early eosinophilic commitment: upregulation of beta (7) integrins. *Scand. J. Immunol.*, Stockolmo, v.56, n.2, p.161-167, 2002.
- LUND-JOHANSEN, F.; TERSTAPPEN, L.W. Differential surface expression of cell adhesion molecules during granulocyte maturation. *J. Leukoc. Biol.*, Norway, v.54, n.1, p.47-55, 1993.

- MARSHALL, D.; HASKARD, D.O. Clinical overview of leukocyte adhesion and migration: where are we now? *Semin. Immunol.*, London, v.14, n.2, p.133-140.
- MCEWAN, I.J.; WRIGHT, A.P.; GUSTAFSSON, J.A. Mechanism of gene expression by the glucocorticoid receptor: role of protein-protein interactions. *Bioessays*, Huddinge, v.19, n.2, p.153-160, 1997.
- MIDDELHOVEN, P.J.; AGER, A.; ROOS, D.; VERHOEVEN, A.J. Involvement of metalloprotease in the shedding of human neutrophil Fc gamma RIIB. *FEBS Lett.*, Netherlands, v.414, n.1, p.14-18, 1997.
- MIKI, I.; KUSANO, A.; OHTA, S.; HANAI, N.; OTOSHI, M.; MASAKI, S.; SATO, S.; OHMORI, K. Histamine enhanced the TNF-alpha-induced expression of E-selectin and ICAM-1 on vascular endothelial cells. *Cell. Immunol.*, Shizuoka, v.171, n.2, p.285-288, 1996.
- MORAES, F.R.; BECHARA, G.H.; MORAES, J.R. Effect of alloxan diabetes and adrenalectomy on carrageenin-induced pleurisy in the rat. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, São Paulo, v.20, n.1, p.47-53, 1987.
- MORAES, F.R.; GARCIA, L.J. Endogenous corticosteroids and insulin in acute inflammation. *Microvasc. Res.*, São Paulo, v.23, n.3, p.281-293, 1982.
- MORAND, E.F.; LEECH, M. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis regulation of inflammation in rheumatoid arthritis. *Immunol. Cell. Biol.*, Victoria, v.79, n.4, p.395-399, 2001.
- MORI, Y.; KANAME, H.; SUMIDA, Y.; TANAKA, S.; KUBO, C.; TASHIRO, N.; NOMOTO, K. Changes in the leukocyte distribution and surface expression of adhesion molecules accompanied with hypothalamically induced restlessness in the cat. *Neuroimmunomodulation*, Fukuoka City, v.7, n.3, p.135-146, 2000.
- MULLER, W.A.; RANDOLPH, G.J. Migration of leukocytes across endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes. *J. Leukoc. Biol.*, v.66, n.5, p.698-704, 1999.
- NAKAGAWA, M.; BONDY, G.P.; WAISMAN, D.; MINSHALL, D.; HOGG, J.C.; VAN EEDEN, S.F. The effect of glucocorticoids on the expression of

- L-selectin on polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, Vancouver, v.93, n.8 p.2730-2737, 1999.
- NAKAGAWA, M.; TERASHIMA, T.; D'YACHKOVA, Y.; BONDY, G.P.; HOGG, J.C.; VAN EEDEN, S.F. Glucocorticoid-induced granulocytosis: contribution of marrow release and demargination of intravascular granulocytes. *Circulation*, v.98, n.21, p.2307-2313, 1998.
- LU, N.Z.; CIDLOWSKI, J.A. The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, Research Triangle Park, v.1024, p.102-123, 2004.
- O'LEARY, E.C.; MARDER, P.; ZUCKERMAN, S.H. Glucocorticoid effects in an endotoxin-induced rat pulmonary inflammation model: differential effects on neutrophil influx, integrin expression, and inflammatory mediators. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, Indiana, v.15, n.1, p.97-106, 1996.
- ODA, T.; KATORI, M. Inhibition site of dexamethasone on extravasation of polymorphonuclear leukocytes in the hamster cheek pouch microcirculation. *J. Leukoc. Biol.*, Sagamihara, v.52, n.3, p.337-342, 1992.
- PEERS, S.H.; , D.; FLOWER, R.J. Reversal of the anti-inflammatory effects of dexamethasone by the glucocorticoid antagonist RU 38486. *Biochem. Pharmacol.*, Claverton Down, v.37, n.3, p.556-557, 1988.
- PERRETTI, M.; BECHERUCCI, C.; SCAPIGLIATI, G.; PARENTE, L. The effect of adrenalectomy on interleukin-1 release in vitro and in vivo. *Br. J. Pharmacol.*, Siena, v.98, n.4, p.1137-1142, 1989.
- PIPITONE, N.; SINHA, M.; THEODORIDIS, E.; GOULDING, N.; HALL, M.; LANCHBURY, J.; CORRIGALL, V.; PANAYI, G.; PITZALIS, C. The glucocorticoid inhibition of LFA-1 and CD2 expression by human mononuclear cells is reversed by IL-2, IL-7 and IL-15. *Eur. J. Immunol.*, London, v.31, n.7, p.2135-2142, 2001.
- PITZALIS, C.; PIPITONE, N.; BAJOCCHI, G.; HALL, M.; GOULDING, N.; LEE, A.; KINGSLEY, G.; LANCHBURY, J.; PANAYI, G. Corticosteroids inhibit lymphocyte binding to endothelium and intercellular adhesion: an

- additional mechanism for their anti-inflammatory and immunosuppressive effect. *J. Immunol.*, London, v.158, n.10, p.5007-5016, 1997.
- PITZALIS, C.; PIPITONE, N.; PERRETTI, M. Regulation of leukocyte-endothelial interactions by glucocorticoids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, London, v.966, p.108-118, 2002.
- POLAT, A.; NAYCI, A.; POLAT, G.; AKSOYEK, S. Dexamethasone down-regulates endothelial expression of intercellular adhesion molecule and impairs the healing of bowel anastomoses. *Eur. J. Surg.*, Mersin, v.168, n.8-9, p.500-506, 2002.
- PREECE, G.; MURPHY, G.; AGER, A. Metalloproteinase-mediated regulation of L-selectin levels on leucocytes. *J. Biol. Chem.*, London, v.271, n.20, p.11634-11640, 1996.
- PREISLER, M.T.; WEBER, P.S.; TEMPELMAN, R.J.; ERSKINE, R.J.; HUNT, I.I.; BURTON, J.L. Glucocorticoid receptor down-regulation in neutrophils of periparturient cows. *Am. J. Vet. Res.*, East Lansing, v.61, n.1, p.14-19, 2000.
- PUJOLS, L.; XAUBET, A.; RAMÍREZ, J.; MULLOL, J.; ROCA-FERRER, J.; TORREGO, A.; CIDLOWSKI, J.A.; PICADO, C. Expression of glucocorticoid receptors α and β in steroid sensitive and steroid insensitive interstitial lung diseases. *Thorax.*, Barcelona, v.59, n.8, p.687-693, 2004.
- RAINER, T.H. L-selectin in health and disease. *Resuscitation.*, Hong Kong, v.52, n.2, p.127-141, 2002.
- RAMPART, M. *Immunopharmacology of Microcirculation*. Neutrophil-endothelial cell interactions. Ed. Brain: San Diego, 1994. Academic Press: 77-107.
- REICHARDT, H.M.; SCHUTZ, G. Glucocorticoid signalling—multiple variations of a common theme. *Mol. Cell. Endocrinol.*, Heidelberg, v.146, n.1-2, p.1-6, 1998.
- ROEBUCK, K.A.; FINNEGAN, A. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J. Leukoc. Biol.*, Chicago, v.66, n.6, p.876-888, 1999.

- ROMERO, M.; GARCIA MONZON, C.; CLEMENTE, G.; SALCEDO, M.; BANARES, R.; ALVAREZ, E.; DE DIEGO, A.; SANTOS, L.; MORENO OTERO, R. Modulation of ICAM-1 tissue expression in patients with liver transplantation (LT) and acute rejection (AR) after glucocorticoid treatment. *Transpl. Int.*, Madrid, v.13, n.1, p.456-460, 2000.
- ROSEN, S.D.; BERTOZZI, C.R. The selectins and their ligands. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, San Francisco, v.6, n.5, p.663-673, 1994.
- ROSENBAUM, R.M.; CHELI, C.D.; GERRITSEN, M.E. Dexamethasone inhibits prostaglandin release from rabbit coronary microvessel endothelium. *Am. J. Physiol.*, v.250, n.6, p.970-977, 1986.
- ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. *Mem. Inst. Butantan.*, São Paulo, v.20, p.315-328, 1947
- ROSSETTI, G.; COLLINGE, M.; BENDER, JR, MOLTENI R, PARDI R. Integrin-dependent regulation of gene expression in leukocytes. *Immunol. Rev.*, Milan, v.186, p.189-207, 2002.
- RUEGG, C.; DORMOND, O.; FOLETTI, A. Suppression of tumor angiogenesis through the inhibition of integrin function and signaling in endothelial cells: which side to target? *Endothelium.*, Switzerland, v.9, n.3, p.151-160, 2002.
- RYU, J.S.; MAJESKA, R.J.; MA, Y.; LACHAPELLE, L.; GULLER, S. Steroid regulation of human placental integrins: suppression of alpha2 integrin expression in cytotrophoblasts by glucocorticoids. *Endocrinology*, New York, v.140, n.9, p.3904-3908, 1999.
- SCHLEIMER, R.P.; FREELAND, H.S.; PETERS, S.P.; BROWN, K.E.; DERSE, C.P. An assessment of the effects of glucocorticoids on degranulation, chemotaxis, binding to vascular endothelium and formation of leukotriene B4 by purified human neutrophils. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Baltimore, v.250, n.2, p.598-605, 1989.
- SCHWEITZER, K.M.; DRAGER, A.M.; VAN DER VALK, P.; THIJSEN, S.F.; ZEVENBERGEN, A.; THEIJSMEIJER, A.P.; VAN DER SCHOOT, C.E.; LANGENHUIJSEN, M.M. Constitutive expression of E-selectin and

- vascular cell adhesion molecule-1 on endothelial cells of hematopoietic tissues. *Am. J. Pathol.*, v.148, n.1, p.165-175, 1996.
- SEEKAMP A, VAN GRIEENSVEN M, HILDEBRANDT F, BRAUER N, JOCHUM M, MARTIN M. The effect of trauma on neutrophil L-selectin expression and sL-selectin levels. *Shock* 2001; 15:254-260.
- SHI, C.; ZHANG, X.; CHEN, Z.; SULAIMAN, K.; FEINBERG, M.W.; BALLANTYNE, C.M.; JAIN, M.K.; SIMON, D.I. Integrin engagement regulates monocyte differentiation through the forkhead transcription factor Foxp1. *J. Clin. Invest.*, Boston, v.114, n.3, p.408-418, 2004.
- SHIMOYAMA, M.; SHIMMURA, S.; TSUBOTA, K.; OGUCHI, Y. Suppression of nuclear factor kappa B and CD18-mediated leukocyte adhesion to the corneal endothelium by dexamethasone. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, Tokyo, v.38, n.11, p.2427-2431, 1997.
- SIMONCINI, T.; MAFFEI, S.; BASTA, G.; BARSACCHI, G.; GENAZZANI, A.R.; LIAO, J.K.; CATERINA, R. Estrogens and glucocorticoids inhibit endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression by different transcriptional mechanisms. *Circ. Res.*, Pisa, v.87, n.1, p.19-25, 2000.
- SMITH, M.D.; AHERN, M.J.; BROOKS, P.M.; ROBERTS-THOMSON, P.J. The clinical and immunological effects of pulse methylprednisolone therapy in rheumatoid arthritis. III. Effects on immune and inflammatory indices in synovial fluid. *J. Rheumatol.*, Bedford Park, v.15, n.2, p.238-241, 1988.
- SPRINGER, T.A. The LFA-1, Mac-1 glycoprotein family and its deficiency in an inherited disease. *Fed. Proc.*, v.44, n.10, p.2660-2663, 1985.
- STARUCH, M.J.; WOOD D.D. Reduction of serum Interleukin-1-like activity after treatment with dexamethasone. *J. Leukoc. Biol.*, v.37, n.2, p.193-207, 1985.
- STENBERG, V.I.; BOULEY, M.G.; KATZ, B.M.; LEE, K.J.; PARMAR, S.S. Negative endocrine control system for inflammation in rats. *Agents Actions*, Grand Forks, v.29, n.3-4, p.189-195, 1990.
- STRAUSBAUGH, H.J.; ROSEN, S.D. A potential role for annexin 1 as a physiologic mediator of glucocorticoid-induced L-selectin shedding from

- myeloid cells. *J. Immunol.*, San Francisco, v.166, n.10, p.6294-6300, 2001.
- TAILOR, A.; FLOWER, R.J.; PERRETTI, M. Dexamethasone inhibits leukocyte emigration in rat mesenteric post-capillary venules: an intravital microscopy study. *J. Leukoc. Biol.*, London, v.62, n.3, p.301-308, 1997.
- TAKEDA, Y.; FU, J.; SUZUKI, K.; SENDO, D.; NITTO, T.; SENDO, F.; ARAKI, Y. Expression of GPI-80, a beta2-integrin-associated glycosylphosphatidylinositol-anchored protein, requires neutrophil differentiation with dimethyl sulfoxide in HL-60 cells. *Exp. Cell. Res.*, Ymagata-City, v.286, n.2, p.199-208, 2003.
- TEDDER, T.F.; MATSUYAMA, T.; ROTHSTEIN, D.; SCHLOSSMAN, S.F.; MORIMOTO, C. Human antigen-specific memory T cells express the homing receptor (LAM-1) necessary for lymphocyte recirculation. *Eur. J. Immunol.*, Boston, v.20, n.6, p.1351-1355, 1990.
- TILDERS, F.J.; DERIJK, R.H.; VAN DAM, A.M.; VINCENT, V.A.; SCHOTANUS, K.; PERSOONS, J.H. Activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by bacterial endotoxins: routes and intermediate signals. *Psychoneuroendocrinology*, Amsterdam, v.19, n.2, p.209-232, 1994.
- TJANDRA, K.; KUBES, P.; RIOUX, K.; SWAIN M.G. Endogenous glucocorticoids inhibit neutrophil recruitment to inflammatory sites in cholestatic rats. *Am. J. Physiol.*, Alberta, 1996; 270(5 Pt 1):G821-G825.
- TORSTEINSDOTTIR, I.; ARVIDSON, N.G.; HALLGREN, R.; HAKANSSON, L. Enhanced expression of integrins and CD66b on peripheral blood neutrophils and eosinophils in patients with rheumatoid arthritis, and the effect of glucocorticoids. *Scand. J. Immunol.*, Uppsala, v.50, n.4, p.433-439, 1999.
- TSURUFUJI, S.; KURIHARA, A.; KISO, S.; SUZUKI, Y.; OHUCHI, K. Dexamethasone inhibits generation in inflammatory sites of the chemotactic activity attributable to leukotriene B4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.119, n.3, p.884-890, 1984.

- VAN EEDEN, S.F.; BICKNELL, S.; WALKER, B.A.; HOGG, J.C. Polymorphonuclear leukocytes L-selectin expression decreases as they age in circulation. *Am. J. Physiol.*, Vancouver, v.272, n.1, p.401-408, 1997.
- VAN MOURIK, J.A.; ROMANI DE WIT, T.; VOORBERG, J. Biogenesis and exocytosis of Weibel-Palade bodies. *Histochem. Cell. Biol.*, Amsterdam, v.117, n.2, p.113-122, 2002.
- VESTWEBER, D.; BLANKS, J.E. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol. Rev.*, Munster, v.79, n.1, p.181-213, 1999.
- VON ANDRIAN, U.H.; BERGER, E.M.; RAMEZANI, L.; CHAMBERS, J.D.; OCHS, H.D.; HARLAN, J.M.; PAULSON, J.C.; ETZIONI, A.; ARFORS, K. In vivo behavior of neutrophils from two patients with distinct inherited leukocyte adhesion deficiency syndromes. *J. Clin. Invest.*, California, v.91, n.6, p.2893-2897, 1993.
- WANG, Q.; DOERSCHUK, C.M. The signaling pathways induced by neutrophil-endothelial cell adhesion. *Antioxid. Redox. Signal.*, Cleveland, v.4, n.1, p.39-47, 2002.
- WEBER, P.S.; MADSEN, S.A.; SMITH, G.W.; IRELAND, J.J.; BURTON, J.L. Pre-translational regulation of neutrophil L-selectin in glucocorticoid-challenged cattle. *Vet. Immunol. Immunopat.*, East Lansing, v.83, n.3-4, p.213-240, 2001.
- WEBER, P.S.; TOELBOELL, T.; CHANG, L.C.; TIRRELL, J.D.; SAAMA, P.M.; SMITH, G.W.; BURTON, J.L. Mechanisms of glucocorticoid-induced down-regulation of neutrophil L-selectin in cattle: evidence for effects at the gene-expression level and primarily on blood neutrophils. *J. Leukoc. Biol.*, East Lansing, 2004; 75: 815-827.
- WERB, Z.; YAN, Y. A cellular striptease act. *Science.*, San Francisco, v.282, n.5392, p.1279-1280, 1998.
- WIEDLE, G.; DUNON, D.; IMHOF, B.A. Current concepts in lymphocyte homing and recirculation. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, Geneva, v.38, n.1, p.1-31, 2001.

- WILSON, S.J.; WALLIN, A.; DELLA-CIOPPA, G.; SANDSTROM, T.; HOLGATE, S.T. Effects of budesonide and formoterol on NF-kappaB, adhesion molecules, and cytokines in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, Southampton, v.164, n.6, p.1047-1052, 2001.
- WISSINK, S.; VAN HEERDE, E.C.; VAND DER, B.B.; VAN DER SAAG, P.T. A dual mechanism mediates repression of NF-kappaB activity by glucocorticoids. *Mol. Endocrinol.*, Utrecht, v.12, n.3, p.355-363, 1998.
- XU, X.; OTSUKI, M.; SAITO, H.; SUMITANI, S.; YAMAMOTO, H.; ASANUMA, N.; KOUHARA, H.; KASAYAMA, S. PPARalpha and GR differentially down-regulate the expression of nuclear factor-kappaB-responsive genes in vascular endothelial cells. *Endocrinology*, Osaka, v.142, n.8, p.3332-3339, 2001.
- YEAGER, M.P.; GUYRE, P.M.; MUNCK, A.U. Glucocorticoid regulation of the inflammatory response to injury. *Acta. Anaesthesiol. Scand.*, Hanover, v.48, n.7, p.799-813, 2004.
- YOSHIKAWA, H.; NAKAJIMA, Y.; TASAKA, K. Glucocorticoid suppresses autocrine survival of mast cells by inhibiting IL-4 production and ICAM-1 expression. *J. Immunol.*, Yamanashi, v.162, n.10, p.6162-6170, 1999.

ANEXOS

ANEXO A

OICEEA nº 24

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

Comissão de Ética em Experimentação Animal

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Papel dos glicocorticóides endógenos na expressão de moléculas de adesão envolvidas na interação leucócito-endotélio" (Protocolo nº20), sob a responsabilidade do(a) Sr(a). Danielle Maia de Holanda Cavalcanti e do orientador(a) Sandra Helena P. Farsky, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 01/09/2003.

São Paulo, 02 de setembro de 2003.

Prof. Assoc. Elfriede Marianne Bacchi
Coordenadora da CEEA

ANEXO B

sandra

De: <mce@mednet.swmed.edu>
Para: <sfarsky@usp.br>
Enviada em: sexta-feira, 5 de agosto de 2005 15:50
Assunto: Confirmation new paper No. sfarsky.AT.usp/20050805/1 submitted to MCE

This is an automated email
05-Aug-2005

Dear Dr Farsky,

Thank you for submitting the paper entitled:

'Adrenal deficiency alters mechanisms of neutrophil mobilization'

to Molecular and Cellular Endocrinology

The e-submission number for your paper is
MCE_sfarsky.AT.usp_20050805_1

Your paper will be evaluated as quickly as possible,
and we will be in touch again in due course

W.E. Rainey (Managing Editor for the Americas).
Dept. of Obstetrics and Gynecology Division of Reproductive Endocrinology,
The University of Texas Southwestern Medical Center,
5323 Harry Hines Boulevard,
Dallas, TX 75390-9032,
USA
Fax: +1 214 648 8066
Email: mce@mednet.swmed.edu

5/8/2005

ADRENAL DEFICIENCY ALTERS MECHANISMS OF NEUTROPHIL MOBILIZATION

Danielle M. H. Cavalcanti^a, Celina M. C. Lotufo^b, Primavera Borelli^a; José A. Rodrigues^c, Jorge M. Ferreira Jr^d; Regina P. Markus^b; Sandra H.P. Farsky^{a*}

^aDepartment of Clinical and Toxicological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 580 Bl. 13 B, São Paulo, SP, 05503-900; ^bDepartment of Physiology, Bioscience Institute, University of São Paulo; ^cDepartment of Physiology, School of Medicine, University of São Paulo; ^dImmunochemistry Laboratory, Butantan Institute.

*Corresponding author: Department of Clinical and Toxicological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo. Av. Prof. Lineu Prestes 580 Bl. 13 B, São Paulo, SP, 05503-900; Tel: 55-11- 3091-2197; Fax: 55-11- 3815-6593; sfarsky@usp.br

Abstract

Deficiency of adrenal hormones promotes exacerbated neutrophil influx into inflammatory sites. Here we investigated the effect of adrenal deficiency on neutrophil mobilization comparing adrenalectomized (ADX) male Wistar rats to sham-operated (SO) or non-manipulated (N) animals, as controls. Seven days after surgeries, the number of neutrophils in peripheral blood was increased in ADX rats. Acceleration of neutrophil maturation steps in the bone marrow may have contributed to this effect, since modifications on number of segmented cells in the later phases of maturation were observed in ADX rats. The investigation of adhesive properties on neutrophil membranes indicated opposite effects on L-selectin expression, detected by reduced and increased expressions on cells present in the bone marrow and circulating blood, respectively. Even though no differences on the expression of $\beta 2$ integrin by neutrophils were detected, an *in vitro* adherence assay demonstrated that circulating neutrophils from ADX rats were unable to adhere to normal endothelium. We conclude that adrenal hormones control the adhesive interactions of neutrophils with the bone marrow microenvironment and with the vascular endothelium chiefly by modulation of L-selectin expression.

Key words: Adrenal Deficiency, Neutrophils, Bone Marrow, Adhesion Molecules

1. Introduction

Glucocorticoids are well known antiinflammatory substances when used in pharmacological concentrations, and the adrenal cortex hormone production is increased during the course of an inflammatory response. In contrast, the effect of typical diurnal concentrations of these hormones on the mechanisms that support inflammatory responses is not well understood.

Leukocyte recruitment, one of the first steps in mounting an inflammatory response, is known to be altered in adrenalectomized (ADX) rats, in which a higher influx of neutrophils into injured areas is observed, compared to control subjects (Abe et al., 1995; Flower et al., 1986; Rovai et al., 1998; Leech et al., 2000). This higher influx is probably due to the loss of glucocorticoid negative control on the rolling and adhesion of leukocytes to postcapillary venules (Farsky et al., 1995). Adrenalectomy of normal rats leads to an increase in rolling and adhesion of leukocytes to postcapillary venules *in vivo*. Similar results are obtained after inhibition of the corticosterone synthesis with metyrapone or inhibition of glucocorticoid receptors with mifepristone (RU 38486), suggesting that the corticosterone synthesized by the adrenal gland plays a role in negatively modulating the migration of blood cells from the vascular bed (Farsky et al., 1995).

The initial rolling behavior and the subsequent adherence to the vessel wall are influenced by the expression of adhesion molecules on the membranes of leukocytes and endothelial cells and changes in hemodynamic behavior of circulating cells (Gonzalez-Amaro & Sanchez-Madrid, 1999; Pearson & Lipowsky, 2000; Sun, et al. 2003; Marshall and Haskard, 2002). Transient expression of selectins on leukocytes and endothelial cells mediates rolling behavior (Zhao et al., 2001; Rosen, 2004), whereas the subsequent expression of β_2 integrin on leukocytes and its binding to immunoglobulin receptors on the endothelium are responsible for adhesion (Hubbard et al., 2000; Hogg, et al., 2002; McIntyre et al., 2003). This same set of molecules contribute to maintaining leukocytes in the bone marrow compartment during the maturation phase of these cells, and

changes in their expression can alter the adhesion either to the bone marrow microenvironment or to the vascular endothelium (Dimitroff *et al.*, 2001; Carion *et al.*, 2003).

Glucocorticoids interfere with the expression of adhesion molecules, and this is thought to be the basis for the inhibition of rolling and adhesion of leukocytes to endothelial cells (Nakagawa *et al.*, 1998; Torsteinsdottir *et al.*, 1999; Fassbender *et al.*, 1999; Weber *et al.*, 2001; Kaname *et al.*, 2002; Weber *et al.*, 2004). However, these results were obtained with very high doses of natural or synthetic hormones, and may not represent the normal mechanism responsible for the effects of cortical adrenal hormonal production.

The aim of the current study is to determine the influence of adrenal cortical hormones on the distribution of leukocytes between the bone marrow and the blood compartment, and on leukocyte migration to peripheral tissues independently of the occurrence of an injury. We show that adrenal hormone deficiency accelerates the maturation of bone marrow neutrophils resulting in a faster migration of these cells to the peripheral compartment. A reduced expression of L-selectin on bone marrow segmented-quiescent polymorphonuclear (PMN) cells may underlie the facilitation of cell migration to peripheral blood. In addition, the increased expression of the same molecule in blood PMN cells favors the migration of leukocytes from blood vessels when adrenal glands are removed.

2. Material and methods

2.1. Animals

Male Wistar rats weighing 180-250g at the beginning of the experiments were used. The animals were allowed a standard pellet diet and water *ad libitum*. During experimental procedures the animals were anesthetized with pentobarbital sodium (65 mg/kg; intraperitoneally) to avoid any stress condition. All animal procedures were performed according to approved protocols and in accordance with recommendations for the proper use and care of laboratory animals.

2.2. Surgical procedures

Bilateral adrenalectomy was performed with entrance into the cavity through bilateral skin and muscle incisions. Adrenalectomized rats (ADX) were supplied with physiological saline solution in addition to water. In the set of sham-operated animals, surgical incisions, handling of the abdominal viscera, and closure of the incisions were of similar extent as those of actual surgery. No special postoperative care was required in this case. Surgical procedures were performed with pentobarbital sodium anaesthesia; the animals were used for 7 days postoperatively. Intact controls were kept under the same conditions as operated rats.

2.3. Determination of corticosterone concentration by radioimmunoassay

The concentration of corticosterone was determined by radioimmunoassay (RIA) after extraction from plasma using ethanol (Lopez-Jimenez et al., 1989). The mean assay sensitivity and intra and interassay coefficients of variation were 0.4µg/dl and 6.7%. The percentage of recovery

after extraction was 80%. All the samples obtained from each experiment were analyzed in duplicate in the same assay.

2.4. Hematological parameters

Blood

Animals were anaesthetized with pentobarbital sodium and whole blood samples were obtained via abdominal aorta punctures using EDTA (1mg/mL, Sigma, St. Louis, MO, USA). Total cells were quantified using a Neubauer chamber. Differential leukocyte counts were performed on blood smears stained with May Grunwald-Giemsa solution (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Bone Marrow

Bone marrow cells were obtained by flushing the femoral cavity with McCoy's 5A medium (Sigma, St. Louis, MO, USA) with EDTA (1 mg/mL). The number of total cells was quantified in Neubauer chamber. Differential counts were performed on the basis of 500 cells per slide in cytocentrifuge smears stained with May-Grumwald and Giemsa dye.

2.5. Flow cytometry

Leukocytes were isolated from blood collected from the abdominal aorta or from the bone marrow to quantify L-selectin or β_2 integrin expressions. Blood was collected using EDTA solution 2% and bone marrow content was harvested by perfusion with Hank's balanced solution (HBSS) containing BSA 1% and EDTA 10%. In brief, erythrocyte lysis was performed using ammonium chloride solution (0.13 M) in both samples and leukocytes were recovered after washing with HBSS. Cells (1×10^6) were incubated with or without *N*-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP 10^{-8} M/15 or 30 min).

After washing, leukocytes were further incubated for 20 min at 4°C in the dark with 10 µL of monoclonal antibody against L-selectin (FITC conjugated, mouse anti-rat L-selectin, BD PharMingen Technical, CA, USA, 50 mg/mL) or β_2 -integrin (FITC conjugated, mouse anti-rat β_2 -integrin, BD PharMingen Technical, CA, USA, 50 mg/mL). Immediately after incubation, cells were analyzed on a FACScalibur flow cytometer (Becton & Dickinson – San Jose, CA, USA). Data from 10,000 cells were obtained and only the morphologically viable leukocytes were considered for analysis. Results were expressed as fluorescence units.

2.6. *In vitro* neutrophil-endothelium adherence

Microvascular Endothelial Primary Cultures

Primary cultures of microvascular endothelial cells were obtained from the rat cremaster muscle using the method described by Chen et al. (1995). Rats were anesthetized and non-coagulated by intraperitoneal injection of heparin (Liquimine®, Roche, 1000 units per animal). The animals were exsanguinated by cutting the bilateral carotid arteries. Subsequently the cremaster muscles were isolated, cut into pieces of approximately 2x2 mm, and two pieces were placed into a flask and cultured in DMEM supplemented with 20% fetal calf serum and 1% penicillin/streptomycin. After 48h, the tissues were discarded and the medium changed. The flask contained only endothelial cells and blood cells. The cells were sub-cultured with 10% pancreatin in PBS solution and used for an adherence assay on the 8th day, when they achieved confluence. The endothelial identification was performed by adding monoclonal antibody against PECAM-1 (Becton & Dickinson – San Jose, CA, USA, 50 mg/mL).

PMN cell-enriched leukocytes

Blood was collected from the abdominal aorta of anesthetised rats using EDTA 2%. Cell separation was performed by adding 3 mL of Percoll (56% in sterile PBS) to 5 mL of blood samples. After centrifugation (1000g,

40min), the interface containing mainly PMN cells was collected and erythrocyte lysis was promoted by adding lysis solution (NH_4Cl 8,02 g/L, NaHCO_3 0,84 g/L). 10^6 cells/mL were suspended in HBSS with 0,5% BSA and used for an adherence assay.

Adherence assay

First-passage endothelial cells were plated in 6.4 mm diameter wells at 10^4 cells/mL in DMEM supplemented with 20% fetal calf serum. Cells were washed with three-well volume exchange of HBSS and PMN cells (10^5 cells/50 μL /well) were then added in HBSS containing 0.5% BSA. Endothelial and PMN cells were incubated for 5 min (37°C , 5% CO_2). Non-adherent PMN cells were washed with a two-well volume exchange of HBSS. A colorimetric tetramethylbenzidine (TMB) assay was then applied to detect neutrophils adhering to the monolayers, using TMB as a peroxidase substrate. 50 μL of acetate buffer (0.05 M, pH 5.8) containing 0.25% of dodecyltrimethylammonium bromide as peroxidase solubilizing and 25 μL of TMB (16 mM in dimethylsulfoxide) were added and incubated for 5 min at room temperature. Subsequently, 100 μL of hydrogen peroxidase (final concentration of 2.5nM) were added. After 2 min, the peroxidase reaction was stopped by the addition of 50 μL of sulfuric acid (1M). The absorbance was determined at 420 nm using an ELISA microplate reader (spectraMAX 250, Molecular Devices). PMN adherence was calculated using a calibration curve obtained by performing the peroxidase reaction in wells containing known amounts of neutrophils.

2.7. Statistical analysis

Means and standard errors of means (SEM) of all data are presented and were compared by analysis of variance (ANOVA) or Tukey Multiple Comparisons Test with a significant probability of less than 0.05.

3. Results

3.1. Corticosterone levels

Adrenalectomy (7 days) reduced plasma concentration of corticosterone from $6.43 \mu\text{g/dL} \pm 0.71$ ($n=9$; normal) to $0.43 \mu\text{g/dL} \pm 0.03$ ($n=9$, ADX, $p < 0.05$), confirming the efficacy of adrenal removal surgery. In addition, no significant difference in corticosterone levels was detected between normal and sham-operated animals ($6.92 \mu\text{g/dL} \pm 0.69$, $n=9$) after 7 days of surgery, indicating that corticosterone returned to basal levels in sham-operated rats.

3.2. Effects of adrenal deficiency on the production and maturation of segmented and mononuclear cells

Adrenalectomy increased the number of total circulating leukocytes (Figure 1A), which reflected in an increment in the number of PMN cells (Figure 1 B). The adrenal ablation did not modify the number of mononuclear (MN) leukocytes (data not shown). No changes in the numbers of progenitor cells of MN or PMN lineages in the bone marrow compartment were observed (data not shown), although a shunting line to the left in the PMN sector was detected. In fact, this deviation was compensated by an increased number of band PMN cells and a reduced number of immature PMN cells (Figure 2). No modification in the number of PMN cells in the last phase of maturation was detected (Figure 2), probably due to their enhanced migration to the circulating compartment, as shown in Figure 1A.

3.3. Effects of adrenal deficiency on L-selectin and β_2 integrin expressions on bone marrow leukocytes

To evaluate a possible role of adhesion molecules on accelerated PMN maturation, the expressions of L-selectin or β_2 integrin were

investigated. Immature and band PMN cells from ADX animals presented L-selectin expression comparable to cells from control animals (data not shown). However, segmented PMN cells obtained from ADX rats presented reduced expression of L-selectin when compared with cells collected from SO or N rats (Figure 3A). In contrast, *in vitro* stimulation (fMLP 10^{-8} M) promoted similar increase on L-selectin expression in all groups of cells tested (Figure 3A). Expression of β_2 integrin was not altered, neither under quiescent nor stimulated conditions, in all phases of PMN maturation (Figure 3B). In addition, adrenal deficiency did not modify the expressions of both molecules on any stage of maturation of MN cells (data not shown).

3.4. Effects of adrenal deficiency on L-selectin and β_2 integrin expression on circulating leukocytes

Adrenalectomy promoted an increase on L-selectin expression on the membranes of total leukocytes (Figure 4A) which reflected a marked increased on PMN population (Figure 4B). The enhanced expression of L-selectin by PMN after *in vitro* addition of fMLP was similar in the three groups of cells tested (Figure 4 B). Conversely, adrenalectomy did not modify the expression of L-selectin on MN cells, since expression levels were not different than those from control cells, even on quiescent or fMLP stimulated cell membranes. Additionally, results presented in Figure 5A showed that the expression of β_2 integrin on total circulating leukocytes, such as on PMN (Figure 5 B) and on MN cells (data not shown), did not differ among cells obtained from the three groups of animals.

3.5. Effects of adrenal deficiency on neutrophil adherence

We performed *in vitro* assays using circulating neutrophils and cultured endothelium to investigate whether the deficiency of adrenal hormones affected the ability of neutrophils to adhere to the endothelium. Our data showed that the number of neutrophils from ADX animals adhering

to normal endothelium was significantly smaller than the number of neutrophils collected from SO or N rats (Figure 6).

4. Discussion

The present study described the alterations elicited by deficiency of adrenal hormones on neutrophil behavior during their mobilization steps. Most importantly, they suggest that modulation of adhesive properties promoted by L-selectin is an important mechanism of action of these hormones.

Recruitment of neutrophils from bone marrow is a characteristic phenomenon of different types of stress, and it is modulated by elevated concentrations of glucocorticoids. Neutrophilia has been fully detected in experimental animals and humans after dexamethasone injection (Burton et al., 1995; Nakagawa et al., 1999; Weber, et al., 2004) or during special physiological conditions, such as periparturient cows and neonatal calves (Lee et al., 1998; Preisler et al., 2000). The mechanisms involved are associated to demargination of immature cells (Meagher et al., 1996) or to impairment of neutrophil apoptosis (Liles et al., 1995; Chang et al., 2004). However, to our knowledge there are no demonstrations that depletion of endogenous adrenal hormones induces neutrophilia by inducing accelerated delivery of cells from bone marrow to blood, as suggested here by adrenalectomy. Our data also show that the mechanisms involved may be related to the expression of adhesion molecule on neutrophils, since impairment on L-selectin expression on segmented cells at the last phase of maturation in the bone marrow compartment was observed in cells from ADX animals. The modulation of L-selectin expression on bone marrow neutrophils by elevated concentrations of glucocorticoids had already been suggested (Weber et al., 2001), and inferred as a possible determinant of neutrophilia. However, the down regulation of L-selectin on segmented cells from bone marrow by high doses of glucocorticoids was recently questioned in a bovine experimental model. It was suggested that dexamethasone downregulates L-selectin expression predominantly on the membrane of circulating neutrophils through activation of glucocorticoid receptors and subsequent effects on intracellular reservoirs of L-selectin mRNA (Weber et

al., 2004). It is interesting to note that the impairment on L-selectin expression on ADX segmented bone marrow cells detected here apparently does not reflect a defect on the synthesis or expression machineries, given that the enhanced expression of L-selectin under *in vitro* fMLP stimulation on PMN from ADX rats was similar to that expressed on the same cells from control animals.

Interestingly, data herein show that on the circulating PMN cells, L-selectin expression is inversely modulated by adrenal hormones, as demonstrated by an increment on expression of L-selectin on peripheral neutrophils collected from ADX rats. These data corroborate the action of glucocorticoids on L-selectin expression, since impairment on L-selectin expression is observed by elevated endogenous glucocorticoids concentrations during several pathophysiological conditions (Fassbender et al., 1999; Nakagawa et al., 1998; Torsteinsdottir et al., 1999; Weber et al., 2001, 2004; Kaname et al., 2002). The mechanism proposed is a genomic hormonal action that induces reduction on L-selectin mRNA levels (Weber et al., 2001; 2004).

Taken together, our data indicate an important regulation on L-selectin expression in the absence of adrenal hormones depending on maturation phases and cell microenvironment. These hormonal actions may modulate the delivery of neutrophils into the circulation and toward the site of injury, and corroborate the *in vivo* enhancement of rolling leukocytes demonstrated in ADX animals (Farsky et al., 1995). Additionally, data herein suggest that the absence of adrenal hormones alters the mobilizations of PMN cells, since the alterations occurred preferentially in PMN rather than in MN cells.

It has been previously shown that ADX animals presented *in vivo* enhanced number of adhered leukocytes to postcapillary venules mediated by β_2 integrin expression (Farsky et al., 1995). However, these results were not herein confirmed by the following observations: 1) adrenalectomy did not modify β_2 integrins expression on leukocytes and 2) circulating neutrophils from ADX animals lost their capacity to adhere to normal cultured endothelium. The effects of glucocorticoid hormones on adherence and on β_2

integrin expression are controversial, and seem to be dependent on hormonal concentrations. *In vitro* or *in vivo* assays were carried out with pharmacological doses of dexamethasone inhibited β_2 integrin expression (Youssef et al., 1995; 1996; Filep et al., 1997; Lim et al., 2000), but the blockage of glucocorticoid synthesis in rheumatoid patients, with elevated concentration of cortisol, did not alter the pattern of integrin expression (Torsteinsdottir et al., 1999). Additionally, House et al. (1997) showed that differences on corticosteroid concentrations induced by the circadian rhythm alters the adherence of leukocyte to postcapillary venule walls *in vivo* throughout the day. Higher adherence of leukocytes to postcapillary venules was detected at elevated concentrations of corticosteroids.

Recent data have strongly suggested that adhesion molecules also mediate signal transduction. Initial interaction between leukocytes and the endothelium induces bi-directional signaling, which mediates events that impel leukocytes onward through microcirculatory vessels, as well as their responsiveness, differentiation states and survival at sites of inflammation (Wang & Doerschuk, 2002; Kluger, 2004; Puri et al., 2004; Nourshargh & Marelli-Berg, 2005). The enhanced *in vivo* adherence on postcapillary venules of ADX animals may then be influenced by elevated initial cellular contacts elicited by elevated L-selectin expression during rolling behavior, and/or by increased expressions of adhesion endothelial molecules, which bind to β_2 integrins expression on leukocytes during firm adherence.

Together data herein show that deficiency in adrenal hormone promotes molecular alterations predominantly on neutrophils that evoke modifications on cellular interactions. L-selectin expression seems to be a target point, since differential control of its expression is observed depending on its stage of maturation and localization. Our results provide a better understanding of physiological modulation of adrenal hormones on mechanisms involved on leukocyte recruitment.

5. Acknowledgements

The authors thank Pricila de Paulo Araujo and Ricardo A. Fock for technical assistance. This work was supported by FAPESP grants # 03/09410-5. Regina P. Markus and Sandra H. P. Farsky are fellows of the Conselho Nacional de Pesquisa e Tecnologia (CNPq). Danielle M. H. Cavalcanti is a CNPq graduate fellow.

Legend for figures

Figure 1 – Number of total leukocytes (A) and PMN cells (B) in the circulation compartment of normal (N), sham-operated (SO) or adrenalectomized (ADX) rats. Cells were collected seven days after surgeries. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. of values obtained in 6 animals in each group. * $p < 0,01$ vs SO or N values.

Figure 2- Number of Immature (A), Band (B) or Segmented PMN cells (C) from bone marrow of normal (N), sham-operated (SO) or adrenalectomized (ADX) rats. Cells were collected seven days after surgeries. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. of values obtained in 6 animals in each group. * $p < 0,05$ vs SO or N values.

Figure 3- Expression of adhesion molecules on segmented PMN cells from bone marrow. Data were obtained by blood flow cytometry analysis. Panel (A) represents L-selectin expression and panel (B) represents β_2 integrin expression. White columns show values obtained in non-stimulated cells and striped columns show values obtained after stimulation by fMLP (10^{-8} M). Cells were collected 7 days after surgeries. Results express mean $\pm$ S.E.M of cells collected from 6-8 non-manipulated (N), sham-operated (SO) and adrenalectomized (ADX) rats. ^a $p < 0,05$ vs SO or N non-stimulated values; ^b $p < 0,05$ vs respective non stimulated condition.

Figure 4 – Expression of L-selectin on total leukocytes (Panel A) and on PMN circulating cells (Panel B). Data were obtained by blood flow cytometry analysis. White columns show values obtained in non-stimulated cells and striped columns show values obtained after stimulation by fMLP (10^{-8} M). Cells were collected 7 days after surgeries. Results express mean $\pm$ S.E.M of cells collected from 6-8 non-manipulated (N), sham-operated (SO) and adrenalectomized (ADX) rats. (10^{-8} M). ^a $p < 0,05$ vs non-stimulated SO or N values; ^b $p < 0,05$ vs respective non- stimulated condition.

Figure 5- Expression of β_2 integrin on total leukocytes (Panel A) and on PMN circulating cells (Panel B). Data were obtained by blood flow cytometry analysis. White columns show values obtained in non-stimulated cells and striped columns show values obtained after stimulation by fMLP (10^{-8} M). Cells were collected 7 days after surgeries. Results express mean $\pm$ S.E.M of cells collected from 6-8 non-manipulated (N), sham-operated (SO) and adrenalectomized (ADX) rats. ^bp<0,05 vs respective non-stimulated condition.

Figure 6- Number of polymorphonuclear cells from ADX, SO or N rats adhered to cultured endothelium. Data express the mean $\pm$ S.E.M. of values obtained from 4 animals in each group. Cells were collected 7 days after surgeries. ^{*}p<0,05 vs SO or N values.

References

- Abe, R., Shimosegawa, T., Kimura, K., Abe, T., Kashimura, J., Koizumi, M., Toyota, T., 1995. The role of endogenous glucocorticoids in rat experimental models of acute pancreatitis. *Gastroenterology*. 109, 933-943.
- Burton, J.L., Kehrli, M.E. Jr., Kapil, S., Horst, R.L., 1995. Regulation of L-selectin and CD18 on bovine neutrophils by glucocorticoids: effects of cortisol and dexamethasone. *J. Leukoc. Biol.* 57, 317-325.
- Carion, A., Domenech, J., Herault, O., Benboubker, L., Clement, N., Bernard, M.C., Desbois, I., Colombat, P., Binet, C., 2002. Decreased stroma adhesion capacity of CD34+ progenitor cells from mobilized peripheral blood is not lineage- or stage-specific and is associated with low beta 1 and beta 2 integrin expression. *J. Hematother. Stem. Cell. Res.* 11, 491-500.
- Chang, L.C., Madsen, S.A., Toelboell, T., Weber, P.S., Burton, J.L., 2004. Effects of glucocorticoids on Fas gene expression in bovine blood neutrophils. *J. Endocrinol.* 183, 569-583.
- Dimitroff, C.J., Lee, J.Y., Schor, K.S., Sandmaier, B.M., Sackstein, R., 2001. Differential L-selectin binding activities of human hematopoietic cell L-selectin ligands, HCELL and PSGL-1. *J. Biol. Chem.* 276, 47623-47631.
- Farsky, S.P., Sannomiya, P., Garcia-Leme, J., 1995. Secreted glucocorticoids regulate leukocyte-endothelial interactions in inflammation. A direct vital microscopic study. *J. Leukoc. Biol.* 57, 379-386.
- Fassbender, K., Kaptur, S., Becker, P., Groschel, J., Schmidt, R., Hennerici, M., 1999. Inverse association between endogenous glucocorticoid secretion and L-selectin (CD62L) expression in trauma patients. *Life. Sci.* 29, 2471-2480.

- Filep, J.G., Delalandre, A., Payette, Y., Foldes-Filep, E., 1997. Glucocorticoid receptor regulates expression of L-selectin and CD11/CD18 on human neutrophils. *Circulation*. 96, 295-301.
- Flower, R.J., Parente, L., Persico, P., Salmon, J.A., 1986. A comparison of the acute inflammatory response in adrenalectomised and sham-operated rats. *Br. J. Pharmacol.* 87, 57-62.
- Gonzalez-Amaro, R., Sanchez-Madrid, F., 1999. Cell adhesion molecules: selectins and integrins. *Crit. Rev. Immunol.* 19, 389-429.
- Hogg, N., Henderson, R., Leitinger, B., McDowall, A., Porter, J., Stanley, P., 2002. Mechanisms contributing to the activity of integrins on leukocytes. *Immunol. Rev.* 186, 164-171.
- House, S.D., Ruch, S., Koscienski, W.F. 3rd, Rocholl, C.W., Moldow, R.L. 1997 Effects of the circadian rhythm of corticosteroids on leukocyte-endothelium interactions in the AM and PM. *Life Sci.* 60, 2023-2034.
- Hubbard, A.K., Rothlein, R., 2000. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free. Radic. Biol. Med.* 28, 1379-1386.
- Kaname, H., Mori, Y., Sumida, Y., Kojima, K., Kubo, C., Tashiro, N., 2002. Changes in the leukocyte distribution and surface expression of adhesion molecules induced by hypothalamic stimulation in the cat. *Brain. Behav. Immun.* 16, 351-367.
- Kluger, M.S., 2004. Vascular endothelial cell adhesion and signaling during leukocyte recruitment. *Adv. Dermatol.* 20, 163-201.
- Lee, E.K., Kehrl, M.E. Jr., 1998. Expression of adhesion molecules on neutrophils of periparturient cows and neonatal calves. *Am. J. Vet. Res.* 59, 37-43.
- Leech, M., Huang, X.R., Morand, E.F., Holdsworth, S.R., 2000. Endogenous glucocorticoids modulate experimental anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Clin. Exp. Immunol.* 119, 161-168.
- Liles, W.C., Dale, D.C., Klebanoff, S.J., 1995. Glucocorticoids inhibit apoptosis of human neutrophils. *Blood*. 86, 3181-3188.

- Lim, L.H., Flower, R.J., Perretti, M., Das, A.M., 2000. Glucocorticoid receptor activation reduces CD11b and CD49d levels on murine eosinophils: characterization and functional relevance. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 22, 693-701.
- Lopez-Jimenez M., Valenca, M.M., Moreira, A.C., Antunes-Rodrigues J., 1989. Ether and immobilization stress effects on pituitary adrenal function in hemidecorticate rats. *Braz J Med Biol Res.* 22: 779-82.
- Marshall, D., Haskard, D.O., 2002. Clinical overview of leukocyte adhesion and migration: where are we now? *Semin. Immunol.* 14, 133-140.
- McIntyre, T.M., Prescott, S.M., Weyrich, A.S., Zimmerman, G.A., 2003. Cell-cell interactions: leukocyte-endothelial interactions. *Curr. Opin. Hematol.* 10, 150-158.
- Meagher, L.C., Cousin, J.M., Seckl, J.R., Haslett, C., 1996. Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes. *J. Immunol.* 156, 4422-4428.
- Nakagawa, M., Bondy, G.P., Waisman, D., Minshall, D., Hogg, J.C., van Eeden, S.F., 1999. The effect of glucocorticoids on the expression of L-selectin on polymorphonuclear leukocyte. *Blood.* 93, 2730-2737.
- Nakagawa, M., Terashima, T., D'yachkova, Y., Bondy, G.P., Hogg, J.C., van Eeden, S.F., 1998. Glucocorticoid-induced granulocytosis: contribution of marrow release and demargination of intravascular granulocytes. *Circulation.* 98, 2307-2313.
- Nourshargh, S., Marelli-Berg, F.M., 2005. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. *Trends. Immunol.* 26, 157- 165.
- Pearson, M.J., Lipowsky, H.H., 2000. Influence of erythrocyte aggregation on leukocyte margination in postcapillary venules of rat mesentery. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 279, 1460-1471.
- Preisler, M.T., Weber, P.S., Tempelman, R.J., Erskine, R.J., Hunt, H., Burton, J.L., 2000. Glucocorticoid receptor down-regulation in neutrophils of periparturient cows. *Am. J. Vet. Res.* 61, 14-19.

- Puri, K.D., Doggett, T.A., Douangpanya, J., Hou, Y., Tino, W.T., Wilson, T., Graf, T., Clayton, E., Turner, M., Hayflick, J.S., Diacovo, T.G., 2004. Mechanisms and implications of phosphoinositide 3-kinase delta in promoting neutrophil trafficking into inflamed tissue. *Blood*. 103, 3448-3456.
- Rosen, S.D., 2004. Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 129-56.
- Rovai, L.E., Herschman, H.R., Smith, J.B., 1998. The murine neutrophil-chemoattractant chemokines LIX, KC, and MIP-2 have distinct induction kinetics, tissue distributions, and tissue-specific sensitivities to glucocorticoid regulation in endotoxemia. *J. Leukoc. Biol.* 64:494-502.
- Sun, C., Migliorini, C., Munn, L.L., 2003. Red blood cells initiate leukocyte rolling in postcapillary expansions: a lattice Boltzmann analysis. *Biophys. J.* 85, 208-222.
- Torsteinsdottir, I., Arvidson, N.G., Hallgren, R., Hakansson, L., 1999. Enhanced expression of integrins and CD66b on peripheral blood neutrophils and eosinophils in patients with rheumatoid arthritis, and the effect of glucocorticoids. *Scand. J. Immunol.* 50, 433-439.
- Wang, Q., Doerschuk, C.M., 2002. The signaling pathways induced by neutrophil-endothelial cell adhesion. *Antioxid. Redox. Signal.* 4, 39-47.
- Weber, P.S., Madsen, S.A., Smith, G.W., Ireland, J.J., Burton, J.L., 2001. Pre-translational regulation of neutrophil L-selectin in glucocorticoid-challenged cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 83, 213-240.
- Weber, P.S., Toelboell, T., Chang, L.C., Tirrell, J.D., Saama, P.M., Smith, G.W., Burton, J.L., 2004. Mechanisms of glucocorticoid-induced down-regulation of neutrophil L-selectin in cattle: evidence for effects at the gene-expression level and primarily on blood neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 75, 815-827.
- Youssef, P., Roberts-Thomson, P., Ahern, M., Smith, M., 1995. Pulse methylprednisolone in rheumatoid arthritis: effects on peripheral blood and synovial fluid neutrophil surface phenotype. *J Rheumatol.* 22, 2065-2071.

- Youssef, P.P., Cormack, J., Evill, C.A., Peter, D.T., Roberts-Thomson, P.J., Ahern, M.J., Smith, M.D., 1996. Neutrophil trafficking into inflamed joints in patients with rheumatoid arthritis, and the effects of methylprednisolone. *Arthritis. Rheum.* 39, 216-225.
- Zhao, L.C., Edgar, J.B., Dailey, M.O., 2001. Characterization of the rapid proteolytic shedding of murine L-selectin. *Dev. Immunol.* 8, 267-277.

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4

Figure 6