UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Área de Toxicologia e Análises Toxicológicas

**Avaliação dos efeitos dos ligantes de TSPO
(*Translocator protein* 18 KDa) na ativação dos neutrófilos**

Léonard De Vinci Kanda Kupa

São Paulo

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Área de Toxicologia e Análises Toxicológicas

**Avaliação dos efeitos dos ligantes de TSPO
(*Translocator protein* 18 KDa) na ativação dos neutrófilos**

Léonard De Vinci Kanda Kupa

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Dissertação para obtenção do Título de
Mestre

Orientador: Prof. Dra. Sandra Helena
Poliselli Farsky

São Paulo

2015

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

K95a Kupa, Léonard De Vinci Kanda
Avaliação dos efeitos dos ligantes de TSPO (*Translocator protein*
18 KDa) na ativação dos neutrófilos / Léonard De Vinci Kanda
Kupa. -- São Paulo, 2015.
75p.

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

Orientador: Farsky, Sandra Helena Poliselli

1. Imunotoxicologia 2. Farmacologia I. T. II. Farsky, Sandra
Helena Poliselli, orientador.

615.9 CDD

Léonard De Vinci Kanda Kupa

Avaliação dos efeitos dos ligantes de TSPO (Translocator
protein 18 KDa) na ativação dos neutrófilos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr.
orientador/presidente

1o. examinador

2o. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2015.

*A Deus, Pai amoroso e dono de toda sabedoria, que me deu tudo por meio do seu
amado Filho Jesus, e à sua Igreja na terra, uma família de muitos filhos semelhantes a Jesus,
dedico este trabalho.*

*À mon cher papa, Léonard Kupa Kazadi, ma chère maman Joséphine Kalala Kabashi et
à ma famille que j'aime du fond de mon coeur, je dédie ce travail.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus e Pai, autor de todas as coisas e a seu Filho Jesus, Senhor e Salvador dos que creem Nele. Agradeço a todos que contribuíram em toda a minha caminhada até aqui, desde os meus pais Léonard Kupa Kazadi e Josephine Kabashi Kalala, que me geraram e me ensinaram os primeiros passos da vida, os meus irmãos cujo convívio forjou meu caráter, muito obrigado! Agradeço aos meus pais espiritual, Sílvio e Cleia, Sidney e Maria Eugênia, Sérgio e Lumi que tem cooperado para me tornar cada dia um pouco mais parecido com Jesus. Agradeço a todos os meus irmãos e irmãs da caminhada, vocês são muito importantes para mim. Dentre estes, um agradecimento todo especial à minha noiva Marjorie Welsch, que eu amo muito. Agradeço ao Programa de Toxicologia e Análises Toxicológicas, mais especificamente, sua Comissão Coordenadora pela prontidão e por todo serviço dedicado aos alunos. Agradeço a professora Sandra Farsky pela orientação deste trabalho, mas também pelo interesse na minha formação, pela dedicação, compromisso e paciência, muito obrigado! Agradeço a CAPES pela concessão da bolsa para a realização deste projeto.

Agradeço finalmente todos os colegas do laboratório de Toxicologia Experimental pelas ajudas, parcerias e amizades. A todos que de alguma forma participaram desta parte da minha história, muito obrigado!

*"Ne demandez jamais quelle est l'origine d'un homme: interrogez plutôt sa vie et
vous saurez ce qu'il est"*

abd el-kader

RESUMO

KUPA, L. V. K. Avaliação dos efeitos dos ligantes de TSPO (*translocator protein* 18 KDa) na ativação dos neutrófilos. 2015. 75f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O TSPO (*Translocator protein* 18 KDa) é uma proteína intracelular localizada na membrana mitocondrial externa, mas também na membrana citoplasmática, e no núcleo. O TSPO está envolvido na biossíntese de esteroides, proliferação celular, apoptose, estresse oxidativo, e na modulação da inflamação, principalmente no sistema nervoso central, onde a proteína é considerada um marcador da neuroinflamação. Os neutrófilos representam células-chave no processo inflamatório sendo as primeiras células a chegarem no foco inflamatório onde exercem atividades fagocíticas, secretórias e microbidas. O presente trabalho investigou os efeitos de diferentes ligantes de TSPO Diazepam, Ro5-4864 (agonistas parciais) e PK-11195 (antagonista) na ativação dos neutrófilos *in vitro* focando na via de ativação do Toll-like receptor (TLR) e de receptores transmembranas ligados a proteína G (GPCR). Neutrófilos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos BalbC machos quatro horas após injeção do glicogênio de ostra (1%), foram tratados *in vitro* com meio de cultura, veículo, Diazepam, Ro5-4864, PK-11195 (10, 100, e 1000 nM), e estimulados ou não com Lipopolissacarídeo (LPS) ou Leucotrieno B4 (LTB4). Foram avaliados em condições basais e após estímulo: a expressão de TSPO e de moléculas de adesão por citometria de fluxo; a migração pelo ensaio de quimiotaxia em placa; a produção de citocinas e do óxido nítrico por ELISA e pela reação de Griess, respectivamente; e finalmente, a geração de espécies reativas de oxigênio por espectrofotômetro de fluorescência. Os resultados obtidos mostram que o TSPO é expresso em neutrófilos em condições basais, e que os estímulos inflamatórios com LPS ou LTB4 não alteram essa expressão. Os ligantes de TSPO não afetam as funções de neutrófilos ativados pelo LPS, salvo a acentuação da geração de espécies reativas (ROS) observada com Ro5-4864 em células estimuladas com LPS. Os neutrófilos estimulados pelo LTB4, quando pré-tratados com os ligantes de TSPO, apresentaram redução na clivagem da L-selectina, redução de quimiotaxia, e indução da geração de ROS. Baseado nestes resultados e nos dados da literatura, concluímos que os efeitos dos ligantes de TSPO sobre as funções neutrofílicas concentram-se na expressão de moléculas de adesão, no estresse oxidativo e na migração. Estes efeitos dependem da via de ativação e do tipo celular.

Palavras-chaves: inflamação; Toll-like receptor; receptor transmembrana ligado a proteína G, Diazepam; Ro5-4864; PK-11195.

Abstract

KUPA, L. V. K. Evaluation of TSPO (translocator protein 18 kDa) ligands effects on neutrophils activation. 2015. 75p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

TSPO (Translocator protein 18 kDa) is an intracellular protein located on the out mitochondrial membrane, but also on the cytoplasmatic membrane and in the nucleus. TSPO is involved in endogen steroids substances biosynthesis, cellular proliferation, apoptosis, oxidative stress and in the modulation of inflammatory process, principally in the central nervous system where the protein is a marker of neuroinflammation. Neutrophils are key-cells in the inflammatory process, being the first cell line that reach the inflammatory focus, where they realize their phagocytic, secretory and microbicidal activities. This study assessed the effects of TSPO ligands Diazepam, Ro5-4864 (partial agonists) and PK-11195 (antagonist) on in vitro neutrophils activation, focusing on the Toll-like receptor (TLR) and G protein coupled receptors (GPCRs) pathways. Neutrophils obtained from de peritoneal cavity of male BalbC mouse after four hours of Oyster glycogen injection (1%), were treated in vitro with culture medium, vehicle, Diazepam, Ro5-4864, PK-11195 (10, 100, e 1000 nM) and stimulated or not with lipopolysaccharide (LPS) or Leukotriene B4 (LTB4). We assessed in basal conditions and after stimulus: The TSPO and adhesion molecules proteic expression by flow cytometry; the migration by a plate chemotaxis assay; Nitric oxide and cytokines production by ELISA and the Griess reaction, respectively; and finally the reactive oxygen species generation by a fluorescence spectrophotometer. The results show that TSPO is expressed in neutrophils in basal conditions, and that inflammatory stimulus with LPS and LTB4 did not alter this expression. We also show that TSPO ligands did not affect neutrophil function activated by LPS. However, neutrophils stimulated by LTB4, when pre-treated with TSPO ligands shown a reduced L-selectina cleavage, chemotaxis reduction and induction of ROS generation. Based on these data and in literature data, we concluded that the effects of TSPO ligands in neutrophilic functions is concentrated on adhesion molecules expression, on oxidative stress and on the migration. These effects depend to the activation pathways and to the cellular type.

Keywords: Inflammation; Toll like receptor; G Protein coupled receptor; Diazepam; Ro5-4864; PK-11195.

LISTSA DE ABREVIATURAS

AMPC – Adenosina monofosfato cíclica

ANOVA – Análise de variância

ANT – Transportador do nucleotídeo adenina

BLT-1 - Receptor de leucotrieno B - 1

BLT2 - Receptor de leucotrieno B - 2

BV2 – Células microglial murina imortalizadas BV-2

CBR – Receptor central de benzodiazepínico

CO₂ – Dióxido de carbono

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

COXs - ciclooxigenases

CXCL1- Chemokine (C-X-C motif) ligand-1

CXCL2 - Chemokine (C-X-C motif) ligand-2

CXCR2 – Receptor de quimiocinas- 2

CXCR4 - Receptor de quimiocinas- 3

CYP11A1 – Citocromo P 11A1

DAG - diacilglicerol

DAMPs - moléculas padrão associadas ao dano

DBI – Ligante inibidor de Diazepam

DCFH - Diacetato de 2', 7'-Dicloro-dihidro-fluorceína

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent assay*

ENP - Eiksoneuropeptide

ERKs – Quinases reguladoras de sinais extracelulares

FCF-USP- Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

FITC – Isotiocianato de Fluoresceína

fMLP - N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine

FPRs – Receptores de peptídeo formilado

GABA_A – Ácido gama-amino butírico A

G-CSF - Fator de Estimulador de Colônias de Granulócitos

GPCR – Receptor acoplado a proteína G

HBSS – Solução salina balanceada de Hanks

iCa²⁺ - cálcio intracelular

ICAMs – Moléculas de adesão intercelular

IL-10 – Interleucina 10

IL-17 - Interleucina 17

IL1-β - Interleucina 1beta

IL-23 - Interleucina 23

IL-6 - Interleucina 6

INF- β – Interferon beta

IP3 - Inositol trifosfato

IP3- 1,2,5-Inositol trifosfato

IRF3 – Fator -3 regulador de interferon

JAMs - moléculas de adesão juncional

LFA1 – *Lymphocyte Function-associated Antigen -1*

LPS - Lipopolissacarídeo

LTB4 - Leucotrieno B4

MAC-1 – *Macrophage antigen -1*

MAPKs – *Mitogen –activated Protein Kinases*

MMP8 – Metaloproteinase-8 da Matrix

MMP9 - Metaloproteinase-9 da Matrix

MMPs - Metaloproteinases da Matrix

MPTP - *Mitochondrial Permeability Transtion Pore*

MyD88 - *Myeloid Differentiation fator 88*

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

NETs - Redes extracelulares de neutrófilos

NF-kB – Fator nuclear kappa de células B ativadas

NO - Óxido Nítrico

PAMPs - moléculas padrão associada patógenos

PAP7 (ACBD3) – *Acyl-coenzyme A binding domain containing 3*

PBRs - Receptores Periféricos de Benzodiazepínico

PBS – Tampão fosfato

PE - *Phycoerythrin*

PECAM-1 - moléculas de adesão de plaquetas e células endoteliais-1

PGs - Prostaglandinas

PIP2 - 4,5-fosfatidilinositol difosfato

PIP3 - Inositol-3-fosfato

PK-11195 – antagonista de TSPO

PKA – Proteína Quinase A

PKC - Proteína Quinase C

PLC β – Fosfolipase C beta

PMA - Phorbol Myristate Acetate

PRR - *Pattern Recognition Receptors*

PSGL - Glicoproteína ligante de P-selectina

RAC – Ras-related C3 Botulinum Toxin substrate

ROS - Espécies reativas de oxigênio

RPMI – Roswell Park Memorial Institute Medium

SDF-1 -Fator derivado de células estromais-1

SNC – Sistema Nervosa Central

SNP – Sistema Nervosa Periférico

SOCS1 – Supressor da sinalização de citocinas -1

TLR - *Toll-like Receptor*

TLR3- *Toll-like Receptor 3*

TLR4 - *Toll-like Receptor 4*

TNF- α – Fator de necrose tumoral - Alfa

TRIF – *TIR-Domain-containing Adapter-inducing Interferon-beta*

TSPO - *Translocator protein 18 kDa*

TTN - Triakontatetraneuropeptide

VCAM – Proteína Vascular de Adesão Celular

VDAC – Canal aniônico Voltagem dependente

VE-caderina: vascular-endotelial cadherin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ativação do receptor acoplado à proteína G (GPCR).....	25
Figura 2: Ativação celular pela via do TLR4.....	27
Figura.3: Estrutura do complexo protéico do MPTP: Localização do TSPO.....	30
Figura 4: Estrutura química dos ligantes de TSPO.....	32
Figura 5: Expressão protéica de TSPO em neutrófilos.....	42
Figura 6: Expressão de moléculas de adesão em neutrófilos estimulados pelo LPS.....	44
Figura 7: Expressão de moléculas de adesão em neutrófilos estimulados pelo LTB4.....	45
Figura 8: Quantificação de nitritos e TNF- α em sobrenadante de neutrófilos tratados com ligantes deTSPO.....	48
Figura 9: Quantificação IL-6 e IL-10 em sobrenadante de neutrófilos tratados com ligantes de TSPO.....	49
Figura 10: Efeito dos ligantes de TSPO na geração de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos.....	51
Figura 11: Efeito dos ligantes de TSPO na quimiotaxia.....	53

SUMÁRIO

1 Introdução	14
2 Objetivo	16
3 Revisão bibliográfica	18
3.1 Neutrófilos	18
3.1.1 Produção	18
3.1.2 Função	19
3.1.3 Ativação	21
3.1.4 Vias de ativação	24
3.2 Translocator protein 18 kda (Tspo)	28
3.2.1 Receptor central e periférico de benzodiazepínico	28
3.2.2 Estrutura e importância	28
3.2.3 Expressão	30
3.2.4 Função	31
3.2.5 Ligantes endógenos e exógenos	31
3.2.6 TSPO e imunidade	33
4 Material e métodos	35
4.1 Animais	35
4.2 Obtenção dos neutrófilos	35
4.3 Expressão protéica de TSPO por citometria de fluxo	35
4.4 Expressão protéica de moléculas de adesão por citometria de fluxo	36
4.5 Quantificação de citocinas	37
4.6 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (<i>Burst</i> oxidativo)	37
4.7 Avaliação da produção do óxido nítrico (NO)	38
4.8 Avaliação da quimiotaxia	39
4.9 Análise estatística	39
5 Resultados	41
5.1 Avaliação da expressão proteica do TSPO	41
5.2 Efeito dos ligantes de TSPO sobre a expressão de moléculas de adesão	42
5.3 Avaliação dos efeitos dos ligantes de TSPO na produção de NO e na secreção de citocinas	47
5.4 Avaliação dos ligantes de TSPO na geração de ROS	50

5.5 Avaliação dos efeitos dos ligantes de TSPO na quimiotaxia	52
6 Discussão.....	54
7 Conclusão	59
8 Referências bibliográficas	60

1 INTRODUÇÃO

Os neutrófilos são células do sistema imune derivados de progenitores mielóides da medula óssea. Durante a hematopoiese estas células passam por diferentes estágios de maturação num processo conhecido como granulopoiese, processo complexo e altamente controlado, que culmina na diferenciação de células tronco indiferenciadas em neutrófilos maduros. As células maduras são lançadas na circulação sistêmica onde representam um subgrupo de leucócitos, relacionado ao sistema imune inata. Em condições fisiológicas os neutrófilos circulam como células inativadas até detectarem sinais inflamatórios que são responsáveis pela passagem dos neutrófilos de um estado inativado para um estado de ativação, iniciando o recrutamento dos mesmos para o foco inflamatório. O recrutamento dos neutrófilos inicia-se com a interação celular neutrófilo-endotélio que compreende a estimulação do endotélio vascular, o *rolling* dos leucócitos, a adesão e transmigração dos leucócitos, mecanismos orquestrados pelas moléculas de adesão celular da família das selectinas e integrinas com seus respectivos ligantes. Uma vez ocorrida a transmigração, os neutrófilos seguem um gradiente quimiotático até o foco inflamatório. O processo de ativação neutrofílica acarreta a mobilização das vesículas secretoras, bem como a produção e liberação de citocinas próinflamatórias e anti-inflamatórias, além de espécies reativas de oxigênio (ROS), com o objetivo de modular a resposta inflamatória, além orquestrar o reparo e o retorno ao homeostase. Todo este processo é altamente controlado e modulado por diferentes proteínas, e envolve a produção de muitos mediadores químicos. Recentemente, a literatura tem relatado o envolvimento da proteína chamada *Translocator Protein* 18KDa (TSPO) na modulação da inflamação.

O TSPO é uma proteína intracelular presente na membrana mitocondrial externa, mas também na membrana citoplasmática, e no núcleo, e é associado à produção de esteroides e substâncias endógenas, entre outras funções.

Trabalhos recentes mostram que o TSPO pode regular positivamente ou negativamente a inflamação dependendo do ligante e do tipo do estímulo inflamatório, porém, os mecanismos envolvidos nesta regulação ainda permanecem obscuros, e, as vias de ativação moduladas por este receptor em neutrófilos, ainda não foram descritas.

Visto que o neutrófilo é uma célula com papel central na inflamação, e que a modulação do processo inflamatório pelo TSPO tem-se mostrado ser dependente dos ligantes deste receptor, do tipo celular, bem como das vias de estimulação celular, faz-se necessário investigar o quanto o TSPO poderia controlar a função dos neutrófilos em condições basais e quando ativados.

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi, portanto, de avaliar o possível controle do TSPO na ativação de neutrófilos, utilizando os ligantes Diazepam (agonista parcial), Ro5-4864 (agonista parcial) e PK-11195 (antagonista) na presença do lipopolissacarídeo (LPS) ou do leucotrieno B₄ (LTB₄), dois estímulos inflamatórios que atuam por diferentes vias de ativação.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Neutrófilos

3.1.1 Produção

Os neutrófilos são células do sistema imune provenientes da medula óssea, produzidos durante a hematopoiese a partir de células progenitoras mielóides (MANZ e BOETTCHER, 2014). Na medula óssea, células indiferenciadas passam por diferentes estágios de maturação num processo conhecido como granulopoiese, o qual é controlado por vários mediadores químicos, entre os quais fatores de transcrição e citocinas, com o objetivo de levar estas células-tronco indiferenciadas à maturação completa e posterior liberação das mesmas na circulação sistêmica (BORREGAARD, 2010).

A produção de neutrófilos representa quantitativamente a maior atividade da medula óssea, com cerca de $1 \text{ a } 2 \times 10^{11}$ células produzidas por dia em adultos normais (STARK *et al.*, 2005; BORREGAARD, 2010). Esta produção é regulada pela taxa de *clearance* de neutrófilos nos tecidos em condições fisiológicas (CASANOVA-ACEBES *et al.*, 2013). Em condições fisiológicas, os neutrófilos circulam no sangue periférico por 1,5 horas (camundongos) e de 8 – 20 horas (humanos) (BASU *et al.*, 2002). Após este período, migram para os órgãos de *clearance* como medula óssea, fígado e baço (FURZE e RANKIN, 2008), onde entram em apoptose por mecanismos celulares de morte constitutivo (LUO e LOISON, 2007), e são finalmente fagocitadas por células residentes como macrófagos e células dendríticas. A fagocitose de neutrófilos apoptóticos por estas células causa redução na liberação da interleucina 23 (IL-23) pelos macrófagos ou células dendríticas. A IL-23 estimula, num subgrupo de linfócitos T a produção da interleucina 17 (IL-17) que por sua vez age nas células estromais e causa a liberação do Fator de Estimulado de Colônias de Granulócitos (G-CSF), um estímulo importante, embora não absolutamente requerido na granulopoiese (LIESCHKE, *et al.*,

1994; STARK *et al.*, 2005; LEY *et al.*, 2006; VON VIETINGHOFF e LEY, 2009). Durante o processo inflamatório, a produção de neutrófilos é igualmente regulada pelas interleucinas IL-17 e IL-23, via o controle da produção do fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF). Diferentemente das condições fisiológicas, durante o processo inflamatório, o fator G-CSF torna-se essencial, para que a produção dos neutrófilos esteja na altura da necessidade que surge frente ao processo inflamatório (LIESCHKE, *et al.*, 1994). Uma vez a diferenciação celular completada na medula óssea, as células maduras (polimorfonucleares) são liberadas para o sangue periférico, sendo que neste processo, estão envolvidos dois receptores de quimiocinas cruciais, CXCR4 e seu ligante SDF-1 (Fator derivado de células estromais -1) que favorece a retenção de células na medula óssea, e o CXCR2 com seus ligantes CXCL1 e CXCL2 que favorece a liberação de células da medula óssea para o sangue periférico (EASH *et al.*, 2009; 2010). O balanço na expressão desses dois receptores, assim como o dos seus ligantes, determina se os neutrófilos serão retidos na medula óssea ou se serão liberados para o sangue periférico.

3.1.2 Função

Dentre as células envolvidas no processo inflamatório, os neutrófilos, possuem um papel central na defesa do organismo frente a agentes agressores, sendo os primeiros fagócitos a chegarem no foco inflamatório, geralmente dentro de 90 minutos após a lesão (KAVELAARS *et al.*, 2003; ARRUDA e BARJA-FIDALGO, 2009; WANG e ARASE, 2014). Os neutrófilos migram rapidamente para o sítio onde há lesão, e exercem suas funções como fagocitose, desgranulação, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de diferentes citocinas, com o objetivo de eliminar o estímulo nocivo presente (NATHAN, 2006; MARWICK *et al.*, 2013). Desde o descobrimento dessas células no final do século 19, descritos como leucócitos de núcleo segmentado com tendência a reter corantes neutros (AMULIC *et al.*, 2012), os neutrófilos foram considerados por muito tempo apenas como células efetoras finais da resposta inflamatória aguda, com meia vida e capacidade biosintética limitadas, e exercendo papel primário no *clearance* de patógenos extracelulares (NATHAN, 2006; MANTOVANI *et al.*, 2011). Sendo assim, os neutrófilos são

classicamente caracterizados pela sua capacidade de atuarem como fagócitos, de liberar enzimas líticas dos seus grânulos, e de produzir ROS com potencial antimicrobiano (MANTOVANI *et al.*, 2011). Esta visão tradicional do neutrófilo como uma simples célula efetora de meia-vida curta, com função antimicrobiana na resposta imune permaneceu por décadas (MANTOVANI *et al.*, 2011; AMULIC *et al.*, 2012), porém evidências recentes tem mostrado novas funções dos neutrófilos, bem como seu envolvimento na fisiopatologia de diferentes doenças. Hoje sabe-se que os neutrófilos representam um componente importante do circuito efetor e regulador no sistema imune, não apenas inata, mas também adaptativa (MANTOVANI *et al.*, 2011; AMULIC *et al.*, 2012; KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013; MANZ e BOETTCHER, 2014; WANG e ARASE, 2014). Os estudos mencionados mostram que os neutrófilos têm capacidade de responder a sinais gerados por células do sistema imune inata e adaptativa em interações bidirecionais; que os neutrófilos podem polarizar-se em um fenótipo proinflamatório ou anti-inflamatório dependendo do microambiente mostrando uma alta plasticidade; podem produzir substâncias tóxicas pouco conhecidas num passado recente como NETs (*neutrophils extracellular traps*) (MANTOVANI *et al.*, 2011). Além destas funções, os estudos relatam uma ampla gama de citocinas e quimiocinas produzidas pelos neutrófilos, as quais estão envolvidas nas funções ativadora, reguladora e efetora do sistema imune inata e adaptativa (MANTOVANI *et al.*, 2011).

As funções neutrofílicas em contínua descoberta tem consolidado o papel dos neutrófilos na patogênese de várias desordens, incluindo infecções por patógenos intracelulares, doenças autoimunes, doenças inflamatórias crônicas e câncer, entre outras (RAZA *et al.*, 2006; WEBER, 2008; ROTZIUS *et al.*, 2010; SNELGROVE *et al.*, 2010; LANDE *et al.*, 2011; ; RAO *et al.*, 2012; COOLS-LARTIGUE *et al.*, 2013).

3.1.3 Ativação

Como já mencionado, em condições fisiológicas os neutrófilos circulam como células inativadas até detectarem sinais inflamatórios que são responsáveis pela passagem dos neutrófilos de um estado inativado para um estado de ativação, iniciando o recrutamento dos mesmos para o foco inflamatório (AMULIC *et al.*, 2012). Este recrutamento inicia-se com uma interação celular neutrófilo-célula endotelial, geralmente nas vênulas pós-capilares (LEY *et al.*, 2007; BORREGAARD, 2010; MULLER, 2013). Como evento inicial dessa interação, as células endoteliais recebem estímulos de citocinas como TNF- α , IL1- β , IL-17 que são produzidas por células sentinelas teciduais como macrófago, ou células dendríticas quando entram em contato com moléculas padrão associadas ao dano (DAMPs) ou associado a patógenos (PAMPs) (KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013). Esta estimulação resulta no aumento da expressão de moléculas de adesão da família das selectinas (P-selectina e E-selectina) presentes nas plaquetas e nas células endoteliais, bem como das moléculas de adesão da superfamília das integrinas (ICAMs, VCAMs). As selectinas ligam-se nos seus ligantes, PSGL (glicoproteína ligante da P-selectina) e L-selectina, ambos expressos constitutivamente em neutrófilos, o que leva a um contato inicial estabelecido entre neutrófilos e células endoteliais ativadas, ocasionando o *rolling* dos neutrófilos sobre o endotélio vascular. Dentro da família das selectinas, a L-selectina constitui a principal molécula de adesão por ser expresso em quase todos os leucócitos e por se ligar a vários ligantes. É expressa constitutivamente na membrana citoplasmática, e sofre clivagem enzimática na presença de estímulos inflamatórios. Isto permite que as beta-integrinas possam ser expressas na superfície celular (GOMEZ-GAVIRO *et al.*, 2000).

O *rolling* é seguido da firme adesão mediada pelas β_2 -integrinas presentes nos neutrófilos e seus ligantes, membros da superfamília das imunoglobulinas (*intercellular cell adhesion molecule-1* e *2* ICAM-1 e ICAM-2) presentes nas células endoteliais (BRUEHL *et al.*, 1997; HIDALGO *et al.*, 2007; LEY *et al.*, 2007; KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013; MULLER, 2013). Está

descrito que o aumento da expressão das β_2 -integrinas envolve a ação das quinases, do Inositol-3-fosfato (PIP3), do diacilglicerol (DAG), além do aumento do cálcio intracelular (iCa^{2+}) (ANTHIS *et al.*, 2009; MUELLER *et al.*, 2010; YAGO *et al.*, 2010). Esses mesmos mediadores são igualmente essenciais para a ativação do complexo NADPH, responsável pela produção de ROS (VIEIRA *et al.*, 2001; BISSONNETTE *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2014). Uma vez a adesão firme estabelecida, há uma polarização dos neutrófilos, tendo um polo onde diferentes receptores de quimiocinas e para fagocitoses ficam concentrados, um processo que envolve sinalizações como PIP3, Rho GTPase e RAC (XU *et al.*, 2003; VAN KEYMEULEN *et al.*, 2006).

As células aderidas ao endotélio vascular e polarizadas atravessam então a barreira vascular, mediante um processo conhecido como migração transendotelial, o qual pode ocorrer por via paracelular ou transcelular. Na migração paracelular o neutrófilo passa através do espaço intercelular entre as células endoteliais, enquanto que na migração transcelular o neutrófilo passa através do citoplasma da célula endotelial (KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013). A proporção entre as duas formas de migração numa resposta inflamatória depende do tecido, do tipo e grau de estimulação das células endoteliais, entre outros fatores (WOODFIN, 2010). Ambas as formas de migração envolvem a participação das β_2 -integrinas LFA1 e MAC-1, com seus respectivos ligantes, ICAM-1 e ICAM-2 (BARREIRO *et al.*, 2008), bem como outras moléculas de adesão tais como PECAM-1 (molécula de adesão de plaquetas e células endoteliais- 1), JAMs (moléculas de adesão juncional), VE-caderina (*vascular-endotelial cadherin*), entre outras (ALCAIDE, 2009; BORREGAARD, 2010).

Após cruzar a barreira vascular, os neutrófilos rompem a membrana basal e a matriz extracelular, usando proteínas presentes em seus grânulos como as elastases, as metaloproteinases (MMPs), principalmente a MMP8 e MMP9 (KANG *et al.*, 2001). Fora dos vasos sanguíneos, os neutrófilos encontram um microambiente riquíssimo em quimioatraentes e estímulos inflamatórios endógenos e/ou de origem patogênica que agem sobre os

mesmos ditando o seu comportamento nesse novo microambiente. Os neutrófilos seguem então por um gradiente quimiotático em direção ao foco inflamatório. As vias intracelulares de quimiotaxia envolvem a participação dos segundo mensageiros como IP3 (Inositol trifosfato) e DAG (Diacilglicerol), liberados no citoplasma após ativação dos receptores acoplados à proteína G (GPCRs). Estes segundo mensageiros são responsáveis pelo aumento de cálcio intracelular, bem como ativação das quinases e fosfolipases (FROONINCKX *et al.*, 2012). Tanto o cálcio quanto as quinases, participam da organização dos microfilamentos de actina no processo de quimiotaxia. As quinases e as fosfolipases são igualmente responsáveis pela ativação das subunidades de NADPH levando à geração de grandes quantidades de ROS (AMULIC *et al.*, 2012; WANG e ARASE, 2014).

Posteriormente, os neutrófilos ativados alcançam o foco inflamatório e organizam vários mecanismos celulares para sua atividade citotóxica. Esses mecanismos incluem a fagocitose, a mobilização das vesículas secretórias e grânulos, a produção de peptídeos e proteínas antimicrobianos, bem como a produção e liberação de ROS (BORREGAARD, 2007; MANTOVANI *et al.*, 2011; AMULIC *et al.*, 2012). Os neutrófilos podem estender a sua atividade citotóxica ainda depois da morte celular por apoptose ou por necrose. Isso é possível pela formação de redes extracelulares de neutrófilos (*NETs*). Os *NETs* consistem em filamentos de cromatina condensada projetados para o meio extracelular e carregados de proteínas e conteúdo dos grânulos citoplasmáticos (BRINKMANN, *et al.* 2004; 2007; URBAN *et al.*, 2009). Os *NETs* possuem atividade citotóxica e bactericida, sendo associados recentemente na literatura com a fisiopatologia de várias doenças como as doenças infecciosas, genéticas, trombozes, vasculites, doenças autoimunes, entre outras (BRINKMANN, *et al.* 2004; BIANCHI *et al.*, 2009; KESSENBROCK *et al.*, 2009; HAKKIM *et al.*, 2010; GARCIA-ROMO *et al.*, 2011; VON BRUHL *et al.*, 2012; THAMMAVONGSA, 2013).

Após exercer seu papel no *clearance* de patógenos, os neutrófilos são removidos do sítio inflamatório por macrófagos, com o objetivo de promover o retorno a homeostase. O *clearance* de neutrófilos é um processo ativo de

remoção de células apoptóticas evitando que as mesmas evoluam para necrose, o que previne o recrutamento de novos leucócitos (COLOTTA *et al.*, 1992; SOEHNLEIN e LINDBOM, 2010).

3.1.4 Vias de ativação

Várias substâncias endógenas e exógenas podem desencadear a ativação dos neutrófilos, essas substâncias podem ser tanto de origem patogênica (PAMPs), ou não patogênica (DAMPs) (KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013). O leucotrieno B₄ (LTB₄), um dos principais mediadores endógeno da inflamação, é um mediador lipídico proveniente do metabolismo do ácido araquidônico via a ação da 5-lipoxigenase. Produzido primariamente pelas células inflamatórias, o LBT₄ é reconhecido como um potente ativador de neutrófilos, causando seus efeitos em concentrações nanomolares (LUNDEEN *et al.*, 2006; BROCK, 2007). Dentre os seus efeitos, o LTB₄ causa alterações no influxo de cálcio, polarização celular, quimiotaxia e desgranulação com liberação de enzimas lisossomais, bem como a geração de ROS e inibição da apoptose espontânea nos neutrófilos (HÉBERT *et al.*, 1996; MURRAY *et al.*, 2003; BARCELLOS-DE-SOUZA *et al.*, 2012). Além desses efeitos, o LTB₄ amplifica, através do seu receptor BLT1, a ativação do fator nuclear NF- κ B pela redução da inibição do fator de transcrição SOCS1 sobre a expressão do adaptador MyD88 (SEREZANI *et al.*, 2011).

O LTB₄ liga-se aos receptores BLT1 e BLT2 que são receptores de membrana acoplados à proteína G (YOKOMIZO *et al.*, 1997, 2000, 2001a; TAGER *et al.*, 2003). O receptor BLT1, predominantemente expresso em neutrófilos, mas igualmente em eosinófilos, macrófagos e células T ativadas, apresenta maior afinidade para o LTB₄, e está envolvido na produção de ROS (FRIEDRICH *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2005). Quando os receptores BLTs são ativados, há desacoplamento das duas subunidades da proteína G (G α e G $\beta\gamma$). As subunidades liberadas no citoplasma levam a ativação da fosfolipase C β (PLC β), que inicia a conversão do PIP₂ (4,5-fosfatidilinositol difosfato) para

IP3 (1,3,5-Inositol trifosfato) e DAG (Diacilglicerol), o que resulta na mobilização do cálcio intracelular e na ativação das quinases como as MAPKs e ERKs (Figura 1) (YOKOMIZO, 2001b; BRINK *et al.*, 2003; BÄCK *et al.*, 2011).

O LTB4 está envolvido na fisiopatologia de doenças inflamatórias crônicas, como a asma e artrite reumatoide, bem como na inflamação aguda. Altas concentrações de LTB4 têm sido encontradas nas lesões inflamatórias crônicas de doenças como nas acima mencionadas, confirmando sua participação no processo inflamatório crônico. Existem vários agentes terapêuticos tais como Accolate, Montelukast, Singulair que são empregados na clínica como tratamento para doenças como asma. Esses agentes agem antagonizando os receptores de derivados de LTB4 como LTD4 e LTE4, reduzindo os sintomas clínicos da asma (GRIFFITHS *et al.*, 1995; HENDERSON *et al.*, 1996; TSUJI *et al.*, 1999; Medscape, 2015).

Figura 1. Ativação do receptor acoplado à proteína G (GPCR)

Fonte: FROONINCKX e colaboradores (2012).

O lipopolissacarídeo (LPS) é uma endotoxina presente na parede celular de bactérias Gram-negativas com alto potencial para induzir inflamação

(RAETZ e WHITFIELD, 2002). O LPS interage com seus receptores de membrana da família *Toll-like receptors* (TLRs) iniciando a ativação celular via uma cascata de reações que inclui a fosforilação das proteínas quinases mitógeno ativadas (MAPKs) e a ativação do fator de transcrição nuclear (NF- κ B) (NAHAS *et al.*, 1996; MEYLAN *et al.*, 2004; CARMODY e CHEN, 2007; JUKNAT *et al.*, 2013). Os receptores TLRs formam um grupo bem caracterizado de receptores pertencente à família dos receptores PRR (*Pattern Recognition Receptors*), essenciais para o sistema imune inata (SABROE, 2005; PARKER *et al.*, 2005).

A sinalização via os receptores TLRs (ilustrada pelo TLR4 na Figura 1) requer o adaptador MyD88 (*Myeloid Differentiation factor 88*), com exceção para os receptores TLR-3 e TLR4 que requer o adaptador Trif (ou TICAM-1) (KOPP e MEDZHITOV, 2003; YAMAMOTO, *et al.*, 2003; MEYLAN *et al.*, 2004). A transdução de sinais via MyD88 ou Trif resulta na ativação do NF- κ B e outros fatores reguladores culminando na regulação da expressão de vários genes envolvidos no processo inflamatório, (Figura 2) (KAISHO e AKIRA, 2006; O'NEILL e BOWIE, 2007; KAWAI e AKIRA, 2009; LOURES *et al.*, 2011). Como resultado final desta sinalização, os neutrófilos ativados liberam ROS, proteases, leucotrienos e citocinas inflamatórias entre outras substâncias (KARIMA *et al.*, 1999; ABRAHAM *et al.*, 2000; TOGBE, 2007; TSUSHIMA *et al.*, 2009). A inibição de alguns desses produtos, como as citocinas, constitui uma estratégia terapêutica no tratamento de diferentes doenças inflamatórias como é o caso do uso terapêutico de Infliximab e adalimumab (LEE *et al.*, 2012; *Medscape*, 2015). Em adição ao painel de citocinas inflamatórias, o LPS induz igualmente a expressão das ciclooxygenases (COXs), enzimas responsáveis pela síntese de prostaglandinas (PGs) (PORTER *et al.*, 2010).

Baseado nas funções neutrofílicas mostradas na literatura até o momento, e nas novas perspectivas, chega-se a conclusão de que o neutrófilo representa não apenas uma célula efetora final com função primária no *clearance* de patógenos, mas uma célula com grande plasticidade na sua função (NATHAN, 2006; WANG & ARASE, 2014), e um alvo terapêutico incontestável em doenças inflamatórias e no câncer, oferecendo oportunidades

potenciais para intervenções farmacológicas seletivas, com o objetivo de promover ou restringir a inflamação, conforme a necessidade.

AFigura 2. Ativação celular pela via do TLR

Fonte: MONGENSEN (2009).

Após ativação por produtos patogênicos (Ex. LPS), o receptor TLR4, ativa as vias dependentes, não-dependentes de MYD88, e a dependente de TRIF. A via dependente de MYD88 é responsável pela ativação precoce do NF-κB e da MAPK, os quais controlam a indução de citocinas pró-inflamatórias. As vias não-dependente de MYD88 e a via dependente de TRIF ativam o IRF3 para a indução do INF-β e de genes induzidos pelo INF. Além disso, esta via regula a ativação tardia do NF-κB e da MAPK, contribuindo também na resposta inflamatória.

3.2 Translocator protein 18 kda (Tspo)

3.2.1 Receptor central e periférico de benzodiazepínico

Em 1977 BRAESTRUP e colaboradores descobriram que o benzodiazepínico Diazepam também se ligava com alta afinidade a receptores de tecidos periféricos, como o tecido renal, e não somente ao receptor gabaminérgico (GABA_A) expresso no sistema nervoso central. Estes novos receptores nos tecidos periféricos foram chamados de Receptores Periféricos de Benzodiazepínico (PBRs) para diferenciá-los do receptor central (CBR). Apesar dos dois receptores terem afinidade por benzodiazepínicos, em 2006 PAPADOPOULUS e colaboradores sugeriram a alteração da nomenclatura de PBR para TSPO (*translocator protein* 18 KDa), pois estudos apontaram diferenças farmacológicas, anatômicas, funcionais e estruturais deste novo receptor (PBR) em relação ao receptor central (CBR) (WOODS, 1996; GAVISH, *et al.*, 1999; RUPPRECHT *et al.*, 2010). A diferença entre o CBR (GABA_A) e o PBR (TSPO) também foi evidenciada quando o tratamento com a isoquinolina PK11195 ligou-se com alta afinidade ao PBR em concentrações nanomolares, enquanto que a mesma molécula não mostrou nenhuma afinidade pelo receptor central. De igual modo, o tratamento com o benzodiazepínico clonazepan mostrou alta afinidade pelo receptor central, porém fraca afinidade pelo receptor periférico (SCHOEMARKER, 1981; BENAVIDES *et al.*, LE *et al.*, 1983; SAANO, 1989).

3.2.2 Estrutura e importância

Trata-se de uma proteína mitocondrial localizada na membrana mitocondrial externa e, formada por 169 amino ácidos codificados pelo DNA nuclear. Estruturalmente, o TSPO é uma proteína transmembrana de 5 domínios alfa-helices, com sequência genética altamente conservada em bactérias, plantas e animais, com cerca de 80% de homologia entre diferentes espécies animais (YELISEEV *et al.*, 1997; CHEN, 2008; AUSTIN *et al.*,

2013). Na membrana mitocondrial o TSPO é organizado em *clusters* de 4 a 6 unidades, e funciona como parte de um complexo heterotrimérico junto com o canal aniônico voltagem dependente de 32 KDa (VDAC), com o transportador de nucleotídeo adenina de 30 KDa (ANT) e outras proteínas (CHEN, 2008; AUSTIN *et al.*, 2013; FUKAYA *et al.*, 2013) (Figura 3). Este complexo representa uma importante estrutura que regula a permeabilidade mitocondrial, conhecido como MPTP (*Mitochondrial Permeability Transition Pore*) (Figura 3). Estudos em animais *knock out* mostraram que os dois outros componentes deste complexo (ANT e VDAC) não são essenciais para a permeabilidade mitocondrial (KOKOSZKA *et al.*, 2004; BAINES *et al.*, 2007; AUSTIN *et al.*, 2013). Por outro lado, embora relatado na literatura a letalidade de embriões de camundongos que possuem deleção do gene TSPO, gerando uma ideia de incompatibilidade da vida com a deleção desta proteína (PAPADOPOULOUS *et al.*, 1997), estudos recentes tem mostrado que animais com deleção para TSPO sobrevivem e possuem capacidade biosintética e funcional iguais a animais selvagens (TU *et al.*, 2014; 2015; BANATI *et al.*, 2014).

Figura 3. Estrutura do complexo protéico do MPTP: Localização do TSPO

A) Estado basal de interação protéica de TSPO, VDAC e ANT. B) Complexo protéico formado após estimulação hormonal aguda. O complexo TSPO, PAP7 e VDAC recrutam PKA-Ri α que se liga ao PAP7. O acúmulo do AMPc ativa a PKA-Ri α , liberando subunidades catalíticas e fosforilando StAR presente na membrana mitocondrial interna. O colesterol atravessa as membranas mitocondriais através deste complexo na presença do DBI (*Diazepam binding inhibitor*). Dentro da mitocôndria, o colesterol é metabolizado pela CYP11A1 e convertido em pregnenolona. **Fonte:** Adaptado de Rone (2009).

3.2.3 Expressão

O TSPO é expresso em todos os órgãos de mamíferos já avaliados, porém altas taxas de expressão são encontradas em órgãos envolvidos na esteroidogênese (RUPPRECHT *et al.*, 2010; PAPADOPOULOS, 2006). Da mesma forma, expressão do TSPO nos diferentes tipos celulares varia conforme o tipo celular, sendo expresso, desde em células nucleadas, como as do sistema imune, até em células anucleadas, como é o caso de eritrócitos maduros, onde modula diferentes funções celulares (BATARSEH, 2010; RUPPRECHT *et al.*, 2010). A expressão de TSPO encontra-se alterada em diversas condições patológicas (CHEN, 2008; PAPADOPOULUS, 2009). No microambiente inflamatório, a expressão de TSPO encontra-se substancialmente aumentada o que tornou esta proteína um marcador da inflamação, em especial no SNC (CHEN, 2008). Desta forma, trabalhos relatam

o aumento da expressão do TSPO em diferentes tecidos inflamados, em processos neoplásicos, e em doenças como Alzheimer, Huntington, entre outras (BROWN *et al.*, 2000; CHEN, 2008).

3.2.4 Função

A função primária desta proteína ainda precisa ser elucidada devido às várias evidências que mostram seu envolvimento na fisiologia do organismo e na fisiopatologia de vários distúrbios (GAVISH *et al.*, 1999; FAN *et al.*, 2012). Em termos de fisiologia celular, o TSPO está envolvido na proliferação celular (CARMEL *et al.*, 1999), na apoptose (MAASER *et al.*, 2001; EVERETT *et al.*, 2002), na respiração celular (HIRSCH *et al.*, 1989), na síntese do heme (TAKETANI *et al.*, 1995), na eritropoeise (RAMPON, *et al.*, 2009), no fluxo do cálcio (PHYTON, *et al.*, 1993), na imunidade (LENFANT, 1986), na resposta ao estresse (DRUGAN *et al.*, 1986), nas neoplasias (NOVAS *et al.*, 1987), e na biossíntese de hormônios esteroidais (PAPADOPOULUS *et al.*, 1997), entre outras funções. Dentre essas funções, a mais estabelecida na literatura é o transporte do colesterol para o interior da mitocôndria, para a produção do precursor de esteroides, pregnenolona, pela ação da enzima CYP11A1, sendo a passagem do colesterol para dentro da mitocôndria o passo limitante na produção da pregnenolona (AUSTIN *et al.*, 2013). Na regulação do transporte entre a mitocôndria e o citoplasma, o TSPO exerce um papel importante através do MPTP, que controla a passagem do colesterol do citoplasma para a mitocôndria para biossíntese de esteróides, controle do fluxo de cálcio, bem como a passagem dos fatores apoptóticos e necróticos da mitocôndria para o citoplasma (OSTUNI *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2011 AUSTIN *et al.*, 2013).

3.2.5 Ligantes endógenos e exógenos

Já está bem estabelecido na literatura o papel de TSPO em diversas disfunções, e que alguns ligantes deste receptor revertem o processo inflamatório, tanto no SNC como no SNP (RYU *et al.*, 2005; GIRARD *et al.*,

2008; PAPADOPOULOS e LECANU, 2009; RUPPRECHT *et al.*, 2010). Dentre os principais ligantes endógenos deste receptor, podemos citar as porfirinas e o colesterol que mantêm afinidade com o receptor em concentrações na escala micromolar e nanomolar, respectivamente (VERMA *et al.*, 1987; LI e PAPADOPOULOS, 1998). Outros ligantes endógenos incluem endozepinas e neuropeptídeos (TOKAY *et al.*, 2008). Além dos ligantes endógenos, já foram descritos diferentes ligantes exógenos como o Ro5-4864, PK11195, etifoxine, diazepam, entre outros, os quais possuem afinidades variadas pelo receptor e modulam o mesmo de maneiras diferentes (RUPPRECHT *et al.*, 2010; AOUAD *et al.*, 2009; AUSTIN *et al.*, 2013). Não está ainda bem estabelecido na literatura quanto à ação desses ligantes como agonistas ou antagonistas. O efeito agonista ou antagonista desses ligantes pode variar conforme o efeito celular avaliado, porém a literatura tem se referido ao Ro5-4864 como agonista parcial de núcleo benzodiazepínico com maior afinidade pelo TSPO do que pelo GABA_A, o PK11195, um antagonista de núcleo isoquinolínico e de maior afinidade pelo TSPO, e Diazepam como uma agonista parcial de núcleo benzodiazepínico, e com afinidade equivalente entre o TSPO e o receptor GABA_A (LE FUR *et al.*, 1983; JORDÀ *et al.*, 2005; SARNOWSKA *et al.*, 2009).

Figura 4. Estrutura química dos ligantes de TSPO utilizados.

Fonte: Gut e colaboradores (2013)

3.2.6 TSPO e imunidade

Na relação TSPO e imunidade, sabe-se que o TSPO é expresso nas células do sistema imune, tanto inata como adaptativa (VEENMAN e GAVISH, 2006), e que, o tratamento agudo ou crônico *in vivo* com ligantes de TSPO altera os parâmetros inflamatórios nas células inflamatórias (MONTEIRO, 2008; LAZZARINI *et al.*, 2006, 2010). Com tratamento *in vitro*, os parâmetros como o *burst* oxidativo, fagocitose, quimiotaxia e produção de citocinas são igualmente alterados de diferentes formas conforme o ligante de TSPO, o tipo celular e o estímulo inflamatório utilizado (RUFF *et al.*, 1985; DA SILVA *et al.*, 2003; WEI, 2009; ZHAO *et al.*, 2011; CHOI *et al.*, 2011; KARLSTETTER *et al.*, 2014).

No neutrófilo, já foi mostrado que ligantes de TSPO como TTN (*Triakontatetrapeptide*) e ENP (*Eiksononeuropeptide*) induzem o aumento de cálcio intracelular, sendo que o ligante TTN induz, além deste efeito, a quimiotaxia, a produção de ROS e aumenta a fagocitose. Por outro lado, o ligante ENP, além de aumentar o cálcio intracelular, aumenta a fagocitose, porém não afeta a produção de ROS nem a quimiotaxia (COSENTINO *et al.*, 2000). No referido trabalho os neutrófilos foram obtidos de humanos e estimulados *in vitro* com fMLP (*N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenyllanine*), um peptídeo de parede bacteriana usado como estímulo quimiotático e que age via os receptores FPRs, um receptor do tipo GPCR (LE, 2002), ou com PMA (*Phorbol Myristate Acetate*), um estímulo inflamatório ativador direto da proteína quinase C (PKC) intracelular (NIMITVILAI *et al.*, 2013). Nesse mesmo trabalho, o Ro5-4864 induziu o aumento de cálcio intracelular, efeito antagonizado pelo PK11195. Em outro estudo, realizado pelo nosso grupo, o ligante diazepínico Ro5-4864, inibiu a quimiotaxia, a expressão de moléculas de adesão, e o influxo de cálcio intracelular em neutrófilos estimulados com fMLP. Esses efeitos *in vitro* foram antagonizados pelo ligante isoquinolínico PK11195 (LIMA *et al.*, 2012), corroborando outros resultados anteriores da literatura (FINNERTY *et al.*, 1991; MARINO *et al.*, 2001; JAYAKUMAR, 2002).

Em conjunto, os dados citados acima sobre o TSPO sugerem participação deste receptor em condições fisiológicas e em doenças, principalmente, as de origem inflamatória. No entanto muitas questões cercam as funções exatas do TSPO no processo inflamatório, quanto às células alvos de agonistas e antagonistas do receptor; e quanto à modulação sobre vias específicas de ativação celular.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos BALB/c, machos, pesando cerca de 30 g (10-12 semanas) provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP). Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, no biotério experimental do departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, em salas com controle de temperatura (22-25°C), umidade (60%) e ciclos claro/escuro (de 12 horas cada), tendo ração e água *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal recomendados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O projeto foi submetido ao comitê de ética em pesquisa com animais da Faculdade Ciências Farmacêuticas da USP, e aprovado sob o protocolo nº432.

4.2 Obtenção dos neutrófilos

Os neutrófilos foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos após a administração de 3 mL da solução de glicogênio de ostra (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 1% em PBS estéril pela via intraperitoneal (i.p.). Após 4 horas, os animais foram anestesiados (quetamina/xilazina, 80/8 mg/kg) por via subcutânea, sacrificados por secção da artéria carótida, e então, as células foram coletadas por lavagem da cavidade peritoneal com 3 mL de PBS estéril. O número de neutrófilos foi contado no lavado peritoneal utilizando câmara de Neubauer por microscopia óptica. Os neutrófilos obtidos foram tratados conforme o protocolo próprio para cada experimento, descritos a seguir.

4.3 Expressão protéica de TSPO por citometria de fluxo

A expressão de TSPO nos neutrófilos foi avaliada por citometria de fluxo. Os neutrófilos obtidos conforme descrito anteriormente foram incubados (5 x

10⁵ células) com meio de cultura na presença ou ausência dos estímulos inflamatórios LPS (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) (5µg/mL por 60 minutos,) ou LTB₄ (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) (100 nM por 20 min). A concentração de LPS utilizada foi baseado em trabalhos anteriores (HEBEDA *et al.*, 2011; 2012; STEFANI *et al.*, 2012; SANTIN *et al.*, 2013). Para a determinação da concentração e tempo de estímulo para o LTB₄, foi realizada uma curva de concentração, tempo e efeito, sendo a melhor concentração e o melhor tempo escolhidos para o prosseguimento com os ensaios. No presente trabalho foi utilizado como meio de cultura, o meio RPMI acrescido de 10% de soro fetal bovino. Este meio foi denominado R10. Após os períodos de incubação, as células foram centrifugadas por 5 minutos (1000 g, 4°C). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido com 250 µL de uma solução comercial de fixação e permeabilização (BD Cytotfix/Cytoperm™, BD Biosciences, San Diego, USA) por 30 minutos. Em seguida as células foram centrifugadas por 5 minutos (1000 g, 4°C), e incubadas com 250 µL de uma solução comercial de permeabilização (BD Perm/Wash™, BD Biosciences, San Diego, USA) por 30 minutos. Após este período de incubação, as células foram novamente centrifugadas e incubadas com uma solução de bloqueio (Glicina 0,3M + 10% soro de cabra normal) por 30 minutos para o bloqueio de sítios inespecíficos de ligação de anticorpo. Após o bloqueio e centrifugação, o *pellet* foi incubado por 30 minutos com 50 µL do anticorpo primário anti-PBR (1:100 em PBS) (Abcam, Cambridge, USA) à temperatura ambiente. As células foram novamente centrifugadas e incubados por 30 minutos com 50 µL do anticorpo secundário Anti-IgG conjugado com o fluoróforo FITC (1:200 em PBS) (Abcam, Cambridge, USA). Por fim, as células foram lavadas (200 µL de PBS), e em seguida analisadas no citômetro de fluxo FACS Canto II (Becton and Dickinson, San Jose, CA, USA). Foram analisados 10.000 eventos e os resultados foram expressos como mediana da intensidade de fluorescência.

4.4 Expressão protéica de moléculas de adesão por citometria de fluxo

Para avaliar a expressão das moléculas de adesão (L-selectina e β-2

integrina), 5×10^5 dos neutrófilos obtidos conforme o item 4.2, foram incubados com meio de cultura, veículo (Dimetilformamida 0,01) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) , Diazepam, Ro5-4864 ou PK11195 (10, 100, 1000 nM) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) , por duas horas a 37 °C. Após este período, as células foram centrifugadas por 5 minutos (1000 g, 4°C), o sobrenadante foi descartado, e o *pellet* foi incubado com 100 µL de meio de cultura ou dos estímulos inflamatórios: LPS (5µg/mL por 60 minutos) ou LTB4 (100 nM por 20 min). Após esta incubação, as células foram novamente centrifugadas 5 minutos (1000 g, 4°C), e o *pellet* ressuspensão com 100 µL dos anticorpos anti-CD62L e anti-CD18 conjugados, respectivamente, com o fluorocromos PE e FITC (BD Biosciences, San Diego, USA), e diluídos em PBS (1:100). As células foram incubadas com esses anticorpos por 30 minutos, em seguida lavadas com 200 µL de PBS, centrifugadas conforme descrito acima, e por fim analisadas no citômetro de fluxo FACS Canto II (Becton and Dickinson, San Jose, CA, USA). Foram analisados 10.000 eventos e os resultados foram expressos como mediana da intensidade de fluorescência.

4.5 Quantificação de citocinas

As citocinas fator de necrose tumoral (TNF-α), IL-6 e IL-10 foram quantificadas em sobrenadante de neutrófilos (1×10^6 células) tratados por 2 horas a 37°C com meio de cultura, veículo, Diazepam, Ro5-4864 ou PK-11195 (10, 100 e 1000 nM), e incubados por 16 horas com LPS (5µg/mL) a 37°C com 5% de CO₂. Após o período de incubação, o sobrenadante foi coletado e as citocinas foram quantificadas usando kits de ELISA (BD Biosciences, San diego, USA) conforme as instruções dos fabricantes.

4.6 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (Burst oxidativo)

As espécies reativas de oxigênio foram quantificadas através do ensaio com Diacetato de 2', 7'-Dicloro-dihidro-fluorceína (DCFH) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), conforme descrito por Tarpey e Fridovich (2001). Dos neutrófilos obtidos conforme o item 4.2, 1×10^5 células foram incubadas com o

meio de cultura, veículo, Diazepam, Ro5-4864 ou PK-11195 (10, 100 e 1000 nM) a 37°C por 2 horas. Após este período, as células foram centrifugadas por 5 minutos (1000 g, 4°C), o sobrenadante foi descartado, e o *pellet* foi incubado por 30 minutos com 200 µL da solução de DCFH 10 µM diluído em Etanol (0,04%). As células foram novamente centrifugadas, e o *pellet* foi ressuspensionado em 200 µL de PBS ou dos estímulos inflamatórios: LPS (5µg/mL por 60 minutos) ou LTB₄ (100 nM por 20 min). As células foram incubadas a 37°C, e em seguida foi lida a fluorescência emitida pelas células ($\lambda_{exc.}$: 485 nm e $\lambda_{emi.}$: 530 nm) em leitor de fluorescência para microplacas (Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader, Biotek Instruments, Winooski, USA). A intensidade de fluorescência foi expressa como média de fluorescência emitida pelas células. Como controle positivo do experimento, usamos neutrófilos incubados com peróxido de hidrogênio na concentração de 10 µM pelo tempo correspondente ao dos estímulos inflamatórios.

4.7 Avaliação da produção do óxido nítrico (NO)

A produção do NO foi avaliada indiretamente pela quantificação da concentração de nítrito pela reação de Griess (TARTPEY e FRIDOVICH, 2001). Após o tratamento das células (1×10^6 células) com meio de cultura, veículo, Diazepam, Ro5-4864 ou PK-11195 (10, 100 e 1000 nM) por 2 horas a 37°C, e estímulo com LPS (5µg/mL) por 16 horas, 100 µL do sobrenadante foram incubadas com 100 µL de reagente de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de di-hidrocloridato de nafitiletenodiamida diluída em ácido fosfórico) por 10 minutos, em microplaca de 96 poços. Após este período, a absorbância foi lida em espectrofotômetro UV (SpectraMax 190, Molecular devices, Sunnyvale, USA) em 540 nm. Uma curva com concentrações conhecidas de nítrito de sódio foi utilizada para a quantificação da concentração de nítrito presente nas amostras, e os resultados foram expressos em µM de nítrito de sódio.

4.8 Avaliação da quimiotaxia

Para a avaliação da migração dos neutrófilos *in vitro*, foi utilizado o ensaio descrito por Lima *et al.* (2012). As células obtidas conforme descrito no item 4.2 foram incubadas (1×10^5 células) com meio de cultura, veículo, Diazepam, Ro5-4864 ou PK-11195 (10, 100 e 1000 nM) por 2 horas a 37°C. Após este período, as células foram lavadas com 2 mL da solução HBSS (*Hank's Balanced salt solution*) e centrifugadas a 1000 *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram resuspensas em 30 μ L de HBSS e transferidas para o compartimento superior da microplaca ChemoTx-101-8, com filtro de 8 μ m (Neuroprobe, Leamington Spa, UK). No compartimento inferior, foram previamente adicionados 30 μ L do estímulo quimiotático LTB₄ (10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} M, diluído em solução HBSS). A placa foi incubada a 37°C, 5% CO₂ por 2 horas. Após este tempo, o número de células migradas para o compartimento inferior foi obtido pela contagem das mesmas em câmara de Neubauer, usando um microscópio óptico.

4.9 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. A comparação entre dois grupos experimentais foi realizada utilizando o teste *t* de student. Para a análise de mais de dois grupos experimentais foi realizada uma análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Dunnet. A diferença foi considerada significativa entre os grupos experimentais para valores de $P < 0,05$ (*).

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da expressão proteica do TSPO

Os dados apresentados na Figura 5 mostram que os neutrófilos em condições basais expressaram a proteína TSPO. A incubação com LPS ou com LTB₄ não alterou a expressão de TSPO, uma vez que as expressões não foram diferentes das encontradas em células tratadas com meio de cultura (basal).

Figura 5. Expressão proteica de TSPO em neutrófilos.

A expressão de TSPO foi avaliada por citometria de fluxo em neutrófilos incubados apenas com meio de cultura (RPMI + 10% de soro fetal bovino) ou com estímulos: LPS (5µg/mL por 60 minutos) ou LTB4 (100 nM por 20 minutos). Os resultados são apresentados como média da intensidade de fluorescência (MFI) $\pm$ o erro padrão da média de células obtidas de 3 animais. A análise estatística foi feita pelo test t.

5.2 Efeito dos ligantes de TSPO sobre a expressão de moléculas de adesão

Foi avaliada a expressão proteica de duas moléculas de adesão (L-selectina e β_2 -integrina) em neutrófilos, por citometria de fluxo. Os resultados

apresentados mostraram que ambas as moléculas de adesão estão expressas em neutrófilos em condições basais.

Após a incubação com LPS por 60 minutos (Figura 6) ou LTB₄ por 20 minutos (figura 7), observa-se a redução da expressão de L-selectina e aumento da expressão de β_2 -integrina nas células tratadas apenas com o meio de cultura. Quanto às células tratadas com os ligantes de TSPO (Diazepam, Ro5-4864 e PK-11195), não se observou nenhuma alteração na expressão de ambas as moléculas de adesão, tanto em condições basais, bem como após o estímulo com LPS (Figura 6).

Nas células tratadas com ligantes de TSPO e incubadas com LTB₄ (Figura 7), houve alteração na expressão da L-selectina, uma vez que os três tratamentos inibiram a clivagem da L-selectina induzida pelo LTB₄, principalmente quando as células foram tratadas com 1000 nM dos ligantes de TSPO. A expressão de β_2 -integrina não foi modificada pelos tratamentos com os ligantes de TSPO em condições basais ou em condições de estímulo pelo LTB₄ (Figura 7 D, E, F).

Figura 6. Expressão de moléculas de adesão em estimulados pelo LPS

Expressão de L-selectina (A, B, C) e β 2-integrina (D, E, F) foi avaliada por citometria de fluxo em neutrófilos tratados com meio de cultura (RPMI + soro fetal bovino), veículo (DMF 0,01%), Diazepam, Ro5-4864 ou PK-11195 (10, 100 e 1000 nM) por duas horas e incubadas, subseqüentemente, com LPS (5 μg/mL por 60 minutos). Os resultados são apresentados como média da intensidade de fluorescência (MFI) $\pm$ o e.p.m. de células obtidas de 4 animais. A análise estatística foi feita por ANOVA e teste t. * $P < 0,05$ (Basal Vs estimulado). ** $P < 0,01$ (Basal Vs estimulado). *** $P < 0,001$ (Basal Vs estimulado).

Figura 7. Expressão de moléculas de adesão em neutrófilos estimulados ao Leucotrieno B4.

A expressão de L-selectina (A, B, C) e $\beta 2$ -integrina (D, E, F) foi avaliada por citometria de fluxo em neutrófilos tratados com meio de cultura (RPMI + soro fetal bovino), veículo (DMF 0,01%), Diazepam, Ro5-4864 e PK-11195 (10, 100 e 1000 nM) por duas horas, e incubadas com LTB4 (100 nM por 20 minutos). Os resultados são apresentados como média da intensidade de fluorescência (MFI) $\pm$ o erro padrão da média de células obtidas de 4 animais. A análise estatística foi feita por ANOVA e teste t. * $P < 0,05$ (Basal Vs estimulado). ** $P < 0,01$ (Basal Vs estimulado). *** $P < 0,001$ (Basal Vs estimulado).

5.3 Avaliação dos efeitos dos ligantes de TSPO na produção de NO e na secreção de citocinas

A produção do NO foi avaliada pela quantificação de nitrito pelo método de Griess, e as citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 foram quantificadas pelo método de ELISA, utilizando o sobrenadante de neutrófilos incubado com meio de cultura, veículo, Diazepam, Ro5-4864 ou PK-11195 (10, 100 ou 1000 nM) por 2 horas, e estimulados ou não com LPS (5 μ g/mL). Os resultados apresentados nas figuras 8 e 9 mostram que os neutrófilos apresentaram expressão basal de cada mediador químico quantificado. Após incubação por 16 horas com LPS, observou-se aumento da concentração de todos os mediadores químicos quantificados nos grupos tratados com o meio de cultura, mostrando que o LPS foi eficiente em induzir a produção de NO. Nos grupos de células tratadas com ligantes de TSPO (Diazepam, Ro5-4864 ou PK-11195) a produção de NO não foi alterada, sendo que os valores obtidos em condições basais ou após estimulação pelo LPS foram equivalentes às obtidas em células tratadas com meio de cultura em condição basal e após o estímulo (Figura 8 A, B, C).

A análise da concentração de TNF- α mostrou que o LPS também foi estímulo eficiente na secreção deste mediador (Figura 8 D, E, F) e que os tratamentos das células com Ro5-4864, apenas na concentração de 1000 nM, reduziu a secreção do TNF- α em condições basais (Figura 8E). Adicionalmente, o tratamento com diazepam (1000 nM) reduziu a secreção do TNF- α após estimulação com LPS.

Da mesma forma que o observado para o NO e TNF- α , o tratamento com LPS foi capaz de induzir a secreção de IL-6 e IL-10 e os tratamentos com os ligantes de TSPO não alteraram o perfil de secreção de ambos os mediadores químicos. (Figura 9).

Figura 8. Quantificação de nitritos e TNF- α em sobrenadante de neutrófilos tratados com ligantes de TSPO

A concentração de nitrito (A, B, C) e de TNF- α (D, E, F) foi quantificada por espectrofotometria usando a reação de Griess para nitrito e um kit de ELISA para TNF- α em sobrenadante de neutrófilos tratados com meio de cultura (RPMI + soro fetal bovino), veículo (DMF 0,01%), Diazepam, Ro5-4864 e PK-11195 (10, 100 e 1000 nM) por duas horas, e incubadas com LPS (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 16 horas). Os resultados são apresentados como média da concentração de cada analito $\pm$ o erro padrão da média. Foram usados de 4 animais. A análise estatística foi feita por ANOVA e teste t. * $P < 0,05$ (Basal vs estimulado). ** $P < 0,01$ (Basal Vs estimulado). *** $P < 0,001$ (Basal Vs estimulado). # $P < 0,05$ (Vs R10 estimulado); ## $P < 0,01$ (Vs R10 basal).

Figura 9. Quantificação IL-6 e IL-10 em sobrenadante de neutrófilos tratados com ligantes de TSPO

A concentração de IL-6 (A, B, C) e de IL-10 (D, E, F) foi quantificada por espectrofotometria usando kits de ELISA em sobrenadante de neutrófilos tratados com meio de cultura (RPMI + soro fetal bovino), veículo (DMF 0,01%), Diazepam, Ro5-4864 e PK-11195 (10, 100 e 1000 nM) por duas horas, e incubadas com LPS (5µg/mL por 16 horas). Os resultados são apresentados como média da cocentração de cada analito $\pm$ o erro padrão da média. Foram usados de 4 animais. A análise estatística foi feita por test t e ANOVA * $p < 0,05$ (Basal vs grupo estimulado). * $P < 0,05$ (Basal Vs estimulado). ** $P < 0,01$ (Basal Vs estimulado). *** $P < 0,001$ (Basal Vs estimulado).

5.4 Avaliação dos ligantes de TSPO na geração de ROS

A avaliação do *burst* oxidativo de neutrófilos tratados com ligantes de TSPO foi realizada pela quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) usando o ensaio com DCFH. Os resultados apresentados na figura 10 mostram que os neutrófilos possuem uma produção basal de ROS equivalente para todos os grupos, com exceção para as células tratadas com Ro5-4864 (100 nM), as quais mostraram aumento na geração de ROS quando comparado com as células tratadas apenas com o meio de cultura (Figura 10E). Os estímulos LPS e LTB4 foram eficientes em aumentar a geração de ROS nas células tratadas com o meio de cultura. Esse aumento foi intensificado nas células tratadas com Ro5-4864, quando estimuladas com LPS (Figura 10B), e nas células tratadas com PK-11195, quando estimuladas pelo LTB4 (Figura 10F).

Figura 10. Efeito dos ligantes de TSPO na geração de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos.

As espécies reativas foram quantificadas por espectrofotometria de fluorescência usando a sonda fluorescente DCFH, em neutrófilos tratados com meio de cultura (RPMI + soro fetal bovino), veículo (DMF 0,01%), Diazepam, Ro5-4864 e PK-11195 (10, 100 e 1000 nM) por duas horas, e incubadas com LPS 5 µg/mL por 60 minutos (A, B, C) ou com LTB4 100 nM por 20 minutos (D, E, F). Os resultados são apresentados como média da intensidade de fluorescência (MFI) ± o erro padrão da média de células obtidas de 4 animais. A análise estatística foi feita por test *t* e ANOVA. **P*<0,05 (Basal Vs estimulado). ***P*<0,01 (Basal Vs estimulado). ****P*<0,001 (Basal Vs estimulado).. #*p*<0,05 vs R10 estimulado. ###*p*<0,001 vs R10 estimulado. $\Delta\Delta$ *P*<0.01 Vs R10 basal.

5.5 Avaliação dos efeitos dos ligantes de TSPO na quimiotaxia

A quimiotaxia de neutrófilos em condições basais e de estímulo com LTB4 foi avaliada por contagem de neutrófilos migrados para o compartimento inferior da placa ChemoTx-101-8 em microscópio óptico. Em condições basais, a migração de neutrófilos foi semelhante para todos os grupos experimentais (Figura 11). O estímulo com LTB4 (10^{-10} a 10^{-7} M), nas células tratadas apenas com o meio de cultura, induziu a migração dos neutrófilos nas concentrações de 10^{-7} M, 10^{-8} M e 10^{-9} M, exceto para o experimento realizado com o Diazepam (Figura 11 A) onde não observou-se a quimiotaxia de neutrófilos estimulados com LTB4 10^{-7} M, uma vez que a contagem de células foi equivalente ao grupo tratado apenas com meio de cultura em condição basal (sem a presença do LTB4). Em relação ao tratamento com os ligantes de TSPO, observou-se redução de quimiotaxia em todas as concentrações de Diazepam utilizadas em neutrófilos estimulados por LTB4 10^{-8} M (Figura 9A). O tratamento com PK-11195 igualmente reduziu a quimiotaxia de neutrófilos frente ao LTB4 10^{-9} M (Figura 11C). Por outro lado, o tratamento com Ro5-4864 não causou alteração na quimiotaxia de neutrófilos para nenhuma das concentrações de LTB4 utilizada (Figura 11B).

Figura 11. Efeito dos ligantes de TSPO na quimiotaxia

A quimiotaxia foi avaliada em câmara de Boyden adaptada. Neutrófilos foram tratados por 2 horas com meio de cultura, veículo, diazepam, Ro5-4864 ou Pk-11195 (10,100, 1000 nM) em condições basais, e estimulados com LTB4 (10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} M) por 2 horas. Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m. de células contadas no compartimento inferior da câmara, para 4 animais. A análise estatística foi feita por ANOVA. * $p < 0,05$, vs R10 (Basal). ## $p < 0,01$ vs R10 de cada concentração de LTB4.

6 DISCUSSÃO

O TSPO é uma proteína mitocondrial associada a várias funções celulares que vem sendo elucidadas há cerca de 35 anos . O presente trabalho foi planejado com o intuito de continuar a elucidar a questão da modulação da inflamação pelo TSPO em neutrófilos. Os estudos existentes mostram que a função de TSPO pode variar dependendo do tipo celular (EVERETT *et al.*, 2002; RAMPON, *et al.*, 2009; FAN *et al.*, 2012). Nas células inflamatórias, como macrófagos, tem se observado uma relação diretamente proporcional entre a expressão de TSPO e a ativação dessas células durante o processo inflamatório em várias doenças, e principalmente na neuroinflamação (HATORI *et al.*, 2012). Este é o motivo pelo qual o TSPO é atualmente considerado um marcador da inflamação, em especial no sistema nervoso central (RUPPRECHT *et al.*, 2010; SURIDJAN *et al.*, 2014; GERSHEN *et al.*, 2015). Sabe-se igualmente que o tratamento *in vivo* ou *in vitro* com ligantes de TSPO altera o estado de ativação das células inflamatórias, ocasionando mudanças na função dessas células (COSENTINO *et al.*, 2000; MONTEIRO, 2008; LAZZARINI *et al.*, 2006; 2010; CHOI *et al.*, 2011; KARLSTETTER *et al.*, 2014). Entretanto, várias questões ainda permanecem para serem elucidadas quanto à modulação da inflamação pelo TSPO, já que essa modulação difere substancialmente dependendo do tipo celular, dos ligantes de TSPO, da via de ativação celular, entre outros fatores, como já comentado na introdução deste trabalho (DA SILVA *et al.*, 2003; WEI, 2009; CHOI *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2011; KARLSTETTER *et al.*, 2014). Os resultados recentemente publicados na literatura junto com os resultados apresentados no presente trabalho confirmam este fato. BAE e colaboradores (2014), por exemplo, mostraram que os ligantes de TSPO modulam negativamente a ativação e a função da micróglia estimulada pelo LPS, inibindo a produção do óxido nítrico e de citocinas (TNF- α , IL-6). No entanto, os resultados sobre a produção de citocinas em neutrófilos estimulados pelo LPS, apresentados neste trabalho, mostram que os ligantes de TSPO não modulam a produção do óxido nítrico, nem das citocinas nos neutrófilos em condições basais, nem após estímulo. No

presente trabalho propomos continuar na elucidação dos efeitos desses ligantes nas funções neutrofílicas avaliando duas vias de ativação diferentes, estimuladas pelo LPS e pelo LTB₄. Nossos resultados foram inicialmente delineados para validar os protocolos experimentais, e um eventual efeito citotóxico do veículo sobre as células. Para isso foi realizado um teste de viabilidade celular nas células tratadas com meio de cultura apenas ou com veículo. Nenhum efeito tóxico do veículo foi observado (dados não mostrados).

Ainda, no sentido de dar força aos objetivos do trabalho, investigamos se em nossas condições experimentais o neutrófilo expressava TSPO e, se esta expressão seria alterada frente aos dois estímulos inflamatórios usados neste trabalho. Os ensaios mostraram que os neutrófilos expressam a proteína TSPO em condições basais, porém esta expressão não sofre nenhuma alteração frente aos estímulos LPS ou LTB₄ nos tempos de 1 hora e 20 minutos, respectivamente. Este resultado corrobora com a ideia da variabilidade nos efeitos dos ligantes de TSPO dependendo da célula e da via de ativação, pois células da micróglia imortalizadas (BV2) sofrem aumento na expressão de TSPO quando estimulados com LPS (BAE *et al.*, 2014). Igualmente já foi mostrado no nosso trabalho anterior que o fMLP causa aumento da expressão de TSPO em neutrófilos, o que não foi possível observar nem com o LTB₄ nem com o LPS no presente trabalho. No mesmo trabalho mostramos que o tratamento com dois ligantes de TSPO modula as funções estimuladas pelo fMLP como quimiotaxia, influxo de cálcio e expressão de moléculas de adesão em neutrófilos obtidos de ratos, sendo que o derivado diazepínico Ro5-4864 inibe, e a isoquinolina PK-11195 aumenta esses efeitos (LIMA *et al.*, 2012).

Neste ponto investigamos a possibilidade dos ligantes de TSPO modular a função dos neutrófilos ativados, independentemente do fato da expressão de TSPO não tenha sido alterada nestas células. Investigamos algumas ações dos ligantes Diazepam e Ro5-4864, e PK-11195 em neutrófilos ativados pela via dos Toll-like Receptor (TLR) estimulados pelo LPS, e também pela via dos Receptores acoplados à proteína G (GPCRs) estimulados pelo LTB₄. Os resultados obtidos mostraram que o tratamento com os ligantes diazepínicos de TSPO não afetaram a biossíntese nem a liberação de citocinas, exceto por uma pequena redução da secreção de TNF- α em células estimuladas por LPS.

Estes dados sugerem que os ligantes de TSPO não interferem na via de ativação do NF κ B, principal via responsável pela produção de citocinas, moléculas de adesão e outros mediadores inflamatórios (HOESEL e SCHMID, 2013; YADAV e RAMANA, 2013; MARIANI, 2014).

A expressão de moléculas de adesão nas membranas celulares, além de esclarecer os mecanismos de adesão celular heterotípicas durante o tráfego de leucócitos no organismo (PETRUZZELLI, 1999), é um indicativo de ativação celular nas células inflamatórias (BORREGAARD, 2010; MANTOVANI *et al.*, 2011; KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013). Está bem estabelecido que ativação das vias do TLRs e GPCR pelo LPS ou fMLP respectivamente, levam a clivagem enzimática da L-selectina e aumento de expressão de β -2 integrina (JUTILA, *et al.*, 1989; HAYASHI, 2003; MITCHELL e KING, 2012). Estes efeitos foram observados em nossos resultados após ativação da via do TLR e GPCR. Os ligantes de TSPO interferiram na expressão da L-selectina apenas quando as células foram estimuladas pelo LTB₄, mostrando o possível controle do TSPO sobre a expressão de moléculas de adesão, e reforçando novamente a hipótese da especificidade da via de ativação na ação dos ligantes de TSPO. Este resultado corrobora com os nossos resultados anteriormente publicados, em que neutrófilos obtidos de ratos expressaram menos moléculas de adesão após tratamento *in vitro* com ligantes de TSPO, e estimulados com fMLP (LIMA *et al.*, 2012). Em conjunto, os nossos resultados e os da literatura sugerem que a via do TLR estimulada pelo LPS em neutrófilos não é uma via passível do controle pelo TSPO ou de seus ligantes.

Embora o tratamento de neutrófilos com os ligantes de TSPO não alterou a produção de espécies reativas de oxigênio em condições basais, foi observado um efeito indutor na produção de ROS, quando as células foram tratadas com Ro5-4864 ou PK-11195 e estimuladas tanto com LPS, quanto com LTB₄, mostrando um efeito comum de indução na geração de ROS nas duas vias de ativação. Com efeito, a literatura mostra que a modulação do TSPO induz a produção de ROS em diferentes tipos celulares (JAYAKUMAR, 2002; CHOI *et al.*, 2011). Estas espécies reativas por sua vez causam a liberação do citocromo c (Cyt c) que desencadeia a apoptose (REPALLI, 2014), um mecanismo celular muito relacionado na literatura com a modulação do

TSPO (MAASER *et al.*, 2001; EVERETT *et al.*, 2002). Vale ressaltar que o Ro5-4864 e o PK-11195 possuem maior afinidade pelo TSPO do que o diazepam (CASELLAS, 2002; MEURICE, 2005) o que pode explicar a ausência de efeito observada no tratamento com diazepam.

O controle do TSPO sobre a produção de ROS parece ser dependente do estímulo e do tipo celular, pois trabalhos anteriores mostraram que Ro5-4864, em condições basais, induz a produção de ROS em macrófagos e astrócitos, porém não em neurônios (JAYAKUMAR, 2002; CHOI *et al.*, 2011), e frente a neutrófilos estimulados com fMLP, Ro5-4864 inibe a produção de ROS (FINNERTY, 1991). Junto com nossos resultados, sugere-se que o controle do TSPO sobre a produção de ROS é dependente do ligante, do tipo celular e da via de ativação celular.

Além das funções neutrofílicas mostradas acima, sabe-se que o TSPO regula outros mecanismos intracelulares que são de grande importância no processo inflamatório, como é o caso do fluxo de cálcio intracelular, entre outros (CANTOR *et al.*, 1984; PHYTON *et al.*, 1993). O cálcio representa um segundo mensageiro chave para várias respostas neutrofílicas (BARRITT, 1999; MENA *et al.*, 2013), entre elas a quimiotaxia, um passo fundamental no processo inflamatório (WONG, 2010). Quanto a esta função, os resultados apresentados mostram que o LTB₄ induz a quimiotaxia de neutrófilos, como já descrito na literatura (HENDERSON, 1994; HEBERT, 1996), e que tratamento com Diazepam e PK-11195 reduzem a quimiotaxia de neutrófilos estimulados pelo LTB₄. Estes resultados corroboram com vários outros resultados da literatura, inclusive de estudos realizados *in vivo* (FINNERTY, 1991; MARINO *et al.*, 2001; MONTEIRO, 2008; LAZZARINI *et al.*, 2006, 2010), apesar de nenhum dos estudos tenha usado o LTB₄ como agente quimiotático, e embora nossos resultados anteriores tenham mostrado que PK-11195 induz a quimiotaxia de neutrófilos estimulados com fMLP (LIMA *et al.*, 2012). O efeito dos ligantes de TSPO na quimiotaxia pode sugerir uma modulação do TSPO no influxo do cálcio intracelular, um dos principais mediadores na quimiotaxia, uma vez que a literatura mostra que os ligantes de TSPO modulam o influxo de cálcio em diversos tipos celulares (COSENTINO *et al.*, 2000; OSTUNI *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2012; YOUSEFI *et al.*, 2013).

Em conjunto, os dados apresentados mostram que a expressão de TSPO em neutrófilos não é alterado após a ativação das vias dos TLRs (*Toll-like receptors*) nem das vias de BLT (*Leukotriene B receptors*). Os dados mostram igualmente que os tratamentos com os ligantes de TSPO afetam de forma diferente as funções de neutrófilos dependendo do estímulo utilizado para ativar as células. Em suma, os resultados reforçam a possibilidade do controle do TSPO na modulação das funções neutrofílicas, sendo esse controle dependente do ligante empregado, da via de ativação e do efeito estudado.

Permanecem ainda questões importantes a serem respondidas sobre o quanto a ação dos ligantes de TSPO sobre os neutrófilos deve ser atribuída ao controle de TSPO sobre essas ações. Isto porque a literatura tem mostrado a possibilidade dos ligantes de TSPO atuarem diretamente sobre alvos celulares outros que o TSPO, desencadeando respostas celulares (TU *et al.*, 2015). Nesta ordem de ideia, uma resposta celular obtida após tratamento com os ligantes de TSPO não implica necessariamente no controle do TSPO sobre a referida resposta. Isso abre a possibilidades das respostas celulares observadas neste trabalho após tratamento dos neutrófilos com os ligantes de TSPO não serem devido ao controle do TSPO sobre a função de neutrófilos, mas talvez uma ação direta desses ligantes em alvos celulares específicas associadas à expressão de moléculas de adesão, à migração ou à geração de ROS.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados concluímos que:

- 1) O TSPO é expresso em neutrófilos em condições basais, e os estímulos inflamatórios LPS e LTB₄ não alteram a expressão de TSPO;
- 2) Os ligantes de TSPO não afetam a produção de citocinas, do óxido nítrico, nem a expressão de moléculas de adesão, após estímulo de neutrófilos com LPS, o que nos leva a concluir que a ativação dos neutrófilos pela via do TLR estimulada pelo LPS não é afetada pela ação desses ligantes;
- 3) A geração de espécies reativas é um efeito modulado pelos ligantes de TSPO em neutrófilos nas duas vias de ativação avaliadas neste trabalho;
- 4) Os ligantes de TSPO causam redução na migração de neutrófilos estimulados com LTB₄;
- 5) Os ligantes de TSPO inibem a clivagem da L-selectina em neutrófilos estimulados com LTB₄.
- 6) Os efeitos dos ligantes de TSPO se concentram, portanto, na expressão de moléculas de adesão, no estresse oxidativo e na migração celular para os ligantes utilizados. Estes efeitos dependem da via de ativação e do tipo celular.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, E. et al. Neutrophils as early immunologic effectors in hemorrhage- or endotoxemia-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* v 279, p1137-1145, 2000.

ALCAIDE, P; AUERBACH, S; LUSCINSKAS, F W. Neutrophil recruitment under shear flow: It's all about endothelial cell rings and gaps. *Microcirculation.* v16, p43–57, 2009.

AMULIC, B et al. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu. Rev. Immunol.* V30, p459-489, 2012.

ANTHIS, N J et al. The structure of an integrin/talin complex reveals the basis of inside-out signal transduction. *EMBO J.* v28, p3623–3632, 2009.

AOUAD, M. et al. Reduction and prevention of vincristine-induced neuropathic pain symptoms by the non-benzodiazepine anxiolytic etifoxine are mediated by 3alpha-reduced neurosteroids. *Pain.* v 147, p54–59, 2009.

ARRUDA, M A; BARJA-FIDALGO, C. NADPH oxidase activity: in the crossroad of neutrophil life and death. *Front. Biosci.* v.14, p4546–4556, 2009.

AUSTIN, C J D et al. The translocator protein (TSPO): A novel target for cancer chemotherapy. *The Int J Bioch Cel Biol.* v.45, p1212-1216, 2013.

BAE, K et al. Translocator protein 18 kDa negatively regulates inflammation in microglia. *J Neuroimmune Pharmacol.* DOI 10.1007/s11481-014-9540-6, 2014.

BAINES, C P et al. Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nature Cell Biology.*v. 9, p550–555, 2007.

BANATI, R B et al. Positron emission tomography and functional characterization of a complete PBR/TSPO knockout. *Nature commun.* V19(5), p1-12, 2014.

BARCELLOS-DE-SOUZA, P. et al. Leukotriene B4 inhibits neutrophil apoptosis via NADPH oxidase activity: Redox control of NF-κB pathway and mitochondria stability. *Biochimica et Biophysica Acta.* v 1823, p1990-1997, 2012.

BARREIRO, O et al. Endothelial adhesion receptors are recruited to adherent leukocytes by inclusion in pre-formed tetraspanin nanoplateforms. *J. Cell Biol.* v183, p527–542, 2008.

BARRITT, G. Receptor-activated Ca^{2+} inflow in animal cells: a variety of pathways tailored to meet different intracellular Ca^{2+} signaling requirements. *Biochem J.* v 337, p153–169, 1999.

Basu S, et al. Evaluation of role of G-CSF in the production, survival, and release of neutrophils from bone marrow into circulation. *Blood.* v100, p854–861, 2002.

BATARSEH, A; PAPADOPOULOS, V. Regulation of translocator protein 18 kDa (TSPO) expression in health and disease states. *Mol Cell Endocrinol.* v 327, p1–12, 2010.

BENAVIDES, J et al. “Peripheral type” benzodiazepine binding sites in rat adrenals: Binding studies with [3H]-PK11195 and autoradiographic localization. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* v266, p38–49, 1983..

BIANCHI, M. et al. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood.* v114, p2619–2622, 2009.

BISSONNETTE, S A et al. Phosphatidylinositol 3-phosphate-dependent and independent functions of p40phox in activation of the neutrophil NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* v283, p2108–2119, 2008.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity.* v33, p657-670, 2010.

BRAESTRUP, C; ALBRECHTSEN , R; SQUIRES, R. F. High densities of benzodiazepine receptors in human cortical areas. *Nature.* v 269, p702-704, 1997.

BRINK C, et al. International Union of Pharmacology. XXXVII: Nomenclature for leukotriene and lipoxin receptors. *Pharmacol Rev.* v55, p195–227, 2003.

BRINKMANN, V et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* v303, p1532–1535, 2004.

BRINKMANN, V; ZYCHLINSKY, A. Beneficial suicide: Why neutrophils die to make NETs. *Nat. Rev. Microbiol.* v5, p577–582, 2007.

BROCK, T. G; PETERS-GOLDEN, M. Activation and regulation of cellular eicosanoid biosynthesis. *Scientific World Journal*. v 7, p1273–1284, 2007.

BROWN, R C et al. Location-dependent role of the human glioma cell peripheral-type benzodiazepine receptor in proliferation and steroid biosynthesis. *Cancer Lett*. V. 156, p125–132, 2000.

BRUEHL, R E et al. Leukocyte activation induces surface redistribution of P-selectin glycoprotein ligand-1. *J. Leukoc. Biol*. v61, p489–499, 1997.

CANTOR, E H et al. Interaction of calcium channel blockers with non-neuronal benzodiazepine binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v 81, p1549–1552, 1984.

CARMEL, I et al. Peripheral-type benzodiazepine receptors in the regulation of proliferation of MCF-7 human breast carcinoma cell line. *Biochem Pharmacol*. v. 58, p273–278, 1999.

CARMODY, R J; CHEN, Y H. Nuclear factor-kappaB: activation and regulation during toll-like receptor signaling. *Cell Mol Immunol*. v 4, p31-41, 2007.

CASANOVA-ACEBES, M. et al. Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell*. v153, p1025–1035, 2013.

CASELLAS, P; GALIEQUE, S; BASILE, A S. Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondrial function. *Neurochem Int*. v40(6), p475-486, 2002.

CHEN, M; GUILARTE, T R. Translocator Protein 18kDa (TSPO): Molecular sensor of brain injury and repair. *Pharmacol Ther*. v. 118 (1), p1-17, 2008.

CHOI, J et al. Translocator protein (18kDa)/Peripheral Benzodiazepine Receptor specific ligands induce microglia functions consistent with an activated state. *Glia*. v59, p219-230, 2011.

COLOTTA, F et al. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood*. v80, p2012–2020, 1992.

COOLS-LARTIGUE, J et al. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J. Clin. Invest*. v123, p3446–3458, 2013.

COSENTINO, M et al. Diazepam-binding inhibitor-derived peptides induce intracellular calcium changes and modulate human neutrophil function. *J. Leuc. Biol.* v67, p637-643, 2000.

DA SILVA et al. Effects of acute and long-term diazepam administration on neutrophil activity: a flow cytometric study. *Eur. J. Pharmacol.* v478, p97-104, 2003.

DRUGAN, R C et al. Inescapable shock reduces [³H]Ro 5–4864 binding to “peripheral-type” benzodiazepine receptors in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.* v 24, p1673–1677, 1986.

EASH, K J et al. CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions. *Blood.* v113, p4711–4719, 2009.

EASH, K J et al. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J. Clin. Invest.* v120, p2433–2431, 2010.

EVERETT, H et al. The myxoma poxvirus protein, M11L, prevents apoptosis by direct interaction with the mitochondrial permeability transition pore. *J Exp Med.* v. 196, p1127–1139, 2002.

FAN, J et al. Structural and functional evolution of the translocator protein (18 kDa). *Current molecular medicine.* v. 12, p369–386, 2012.

FINNERTY et al. Benzodiazepines inhibit neutrophil chemotaxis and superoxide production in a stimulus dependent manner; PK-11195 antagonizes these effects. *Immunopharmacology.* v22, p185-194, 1991.

FRIEDRICH, E.B. et al. Mechanisms of leukotriene B₄—triggered monocyte adhesion. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* v 23, p1761–1767, 2003.

FROONINCKX, L et al. Neuropeptides GPCRs in *C. elegans*. *Frontiers in endocrinology.* V3(167), p1-18, 2012.

FUKAYA, T et al. Identification of a novel benzoxazolone derivative as a selective, orally active 18 kDa Translocator Protein (TSPO) ligand. *J. Med. Chem.* v. 56 (20), p8191-8195, 2013.

FURZE, R C e RANKIN, S M. Neutrophil mobilization and clearance I n the bone marrow. *Immunology*. V125 (3). p281-8, 2008.

GARCIA-ROMO, G S et al. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* v3(73), p1-20, 2011.

GAVISH, M. et al. Enigma of the peripheral benzodiazepine receptor. *Pharmacol. Rev.* v 51, p29–650, 1999.

GERSHEN, L P et al. Neuroinflammation in Temporal Lobe Epilepsy Measured Using Positron Emission Tomographic Imaging of Translocator Protein. *JAMA Neurol.* Manuscript. 2015.

GIRARD, C.et al. Etifoxine improves peripheral nerve regeneration and functional recovery. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* v 105, p20505–20510, 2008.

GOMEZ-GAVIRO, M V et al. Down-regulation of L-selectin expression in neutrophils by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: role of intracellular ATP concentration. *Blood*. V96(10), p3592-600, 2000

GRIFFITHS, R. J. et al. Leukotriene B4 plays a critical role in the progression of collagen-induced arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v 92, p517, 1995.

HAKKIM, A. et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* v107, p9813–9818, 2010.

Hatori, A et al. PET imaging of lung inflammation with [18F]FEDAC, a radioligand for translocator protein (18 kDa). *PlosOne*. v7(9), p1-8, 2012.

HAYASHI, F; MEANS, T K; LUSTER, A D. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*. v102(7), p2660-2669, 2003.

HEBEDA, C B et al. Effects of chlorogenic acid on neutrophil locomotion functions in response to inflammatory stimulus. *J Ethnopharmacology*. 2011. v 135, p261-269, 2011.

HEBEDA, C B et al. Intracellular mechanisms of hydroquinone toxicity on endotoxin-activated neutrophils. *Arch Toxicol*. 2012. DOI 10.1007/s00204-012-0886-3.

HÉBERT, M J. et al. Sequential morphologic events during apoptosis of human neutrophils. Modulation by lipoxygenase-derived eicosanoids. J. Immunol. v 157, p3105–3115, 1996.

HENDERSON, W. R. The role of leukotrienes in inflammation. Ann. Intern Med. v 121(9), 684-697, 1994.

HENDERSON, W. R. et al. The importance of leukotrienes in airway inflammation in a mouse model of asthma. J. Exp. Med. v 184, p1483, 1996.

HIDALGO, A et al. Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. Immunity. v26, p477–489, 2007.

HIRSCH, J. D. et al. Mitochondrial benzodiazepine receptors mediate inhibition of mitochondrial respiratory control. Mol. Pharmacol. v 35, p157–163, 1989.

HOESEL, B; SCHMID, J A. The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer. Mol Cancer. V12(86), p1-15, 2013.

JAYAKUMAR, A R; PANICKAR, K S; NOREMBERG, M D. Effects on free radical generation by ligands of the peripheral benzodiazepine receptor in cultured neural cells. J Neurochemistry. v83, p1226-1234, 2002.

JORDÀ, E G et al. Evidence in favour of a role for peripheral-type benzodiazepine receptor ligands in amplification of neuronal apoptosis. Apoptosis. V10 (1), p91-104, 2005.

JUKNAT, A et al. Microarray and pathway analysis reveal distinct mechanism underlying cannabinoid-mediated modulation of LPS-induced activation of BV-2 microglial cell. PLOS ONE. v 8 (4), p1-17, 2013.

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. v143(10), p3318-3324, 1989.

KAISHO, T; AKIRA S. Toll-like receptor function and signaling. J Allergy Clin Immunol. v117, 979–987, 2006.

KANG, T et al. Subcellular distribution and cytokine and chemokine-regulated secretion of leukolysin/MT6-MMP/MMP-25 in neutrophils. *J. Biol. Chem.* v276, p21960–21968, 2001.

KARIMA, R. et al. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Mol Med Today.* v 5, p123-132, 1999.

KARLSTETTER, M et al. Translocator protein (18 kDa) (TSPO) is expressed in reactive retinal microglia and modulates microglial inflammation and phagocytosis. *J Inflammation.* v1(3), p1-12, 2014.

KAVELAARS, A et al. Increased acute inflammation, leucotriene B4-induced chemotaxis, and signaling in mice deficient for G protein-coupled receptor kinase 6. *J Immunol.* v.171, p6128-6134, 2003.

KAWAI, T; AKIRA, S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol.* v 21, p317–337, 2009.

KESSENBROCK, K. et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat. Med.* v15, p623–625, 2009.

KOKOSZKA, J E et al. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature.* v. 427, p461–465, 2004.

KOLACZKOWSKA, E; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* v13, p159-175, 2013.

KOPP, E; MEDZHITOV, R. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol.* v15, p396–401, 2003.

LANDE, R et al. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* V3 (73), p1-20, 2011.

LAZZARINI, R et al. Diazepam effects on carrageenan-induced inflammatory paw edema in rats: Role of nitric oxide. *Life Sciences.* v78, p3027-3034, 2006.

LAZZARINI, R et al. Diazepam decreases leukocyte-endothelium interactions in situ. *Immunopharmacol and Immunotoxicol.* v32, p402-409, 2010.

LE, F G et al. Peripheral benzodiazepine binding sites: effect of PK 11195, 1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide. I. In vitro studies. *Life Sci.* v.32, p1839–1847, 1983.

LE, Y; MURPHY, P M; WANG, J M. Formyl-peptide receptors revisited. *Trends Immunol.* V23(11), p541-8, 2002.

LEE, S. et al. Urinary trypsin inhibitors attenuates lipopolysaccharide-induced neutrophils activation. *Korean J Anesthesiol.* v 63 (6), p540-546, 2012.

LE FUR, G et al. Differentiation between two ligands for peripheral benzodiazepine binding sites, [³H]R05-4864 and [³H]PK 11195, by thermodynamic studies. *Life Sciences.* V33(5), p449-457, 1983.

LENFANT, M; HAUMONT, J; ZAVALA, F. In vivo immunomodulating activity of PK 11195, a structurally unrelated ligand for “peripheral” benzodiazepine binding sites—I. Potentiation in mice of the humoral response to sheep red blood cells. *Int J Immunopharmacol.* v 8, p825–828, 1986.

LEY, K; SMITH, E; STARK, M A. IL-17A-producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes. *Immunol. Res.* v34, p229–242, 2006.

LEY, K. et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* v 7 (9), p678-689, 2007.

LI, H; PAPADOPOULOS, V. Peripheral-type benzodiazepine receptor function in cholesterol transport: Identification of a putative cholesterol recognition/ interaction amino acid sequence and consensus pattern. *Endocrinology.* v 139, p4991–4997, 1998.

LIESCHKE, G J et al. Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood.* v84, p1737–1746, 1994.

LIMA, CB et al. Actions of translocator protein ligands on neutrophil adhesion and motility induced by G-protein coupled receptor signaling. *Biochem And Biophys Res Comm.* v417, p918-923, 2012.

LIU, Y et al. Voltage-dependent anion channel involved in the mitochondrial calcium cycle of cell lines carrying the mitochondrial DNA A4263G mutation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v 404, p364–369, 2011.

LOURES, F. V. et al. MyD88 signaling is required for efficient innate and adaptive immune responses to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Infection and Immunity*. v 79 (6), p2470-2480, 2011.

LUO, H R; LOISON, F. constitutive neutrophil apoptosis: mechanism and regulation. *Am J Hematol*. V83, p288-95, 2008.

LUNDEEN, K A et al. Leukotriene B4 receptors BLT1 and BLT2: expression and function in human and murine mast cells. *J. Immunol*. v 177, p3439–3447, 2006.

MAASER, K et al. Specific ligands of the peripheral benzodiazepine receptor induce apoptosis and cell cycle arrest in human colorectal cancer cells. *Br J Cancer*. v. 85, p1771–1780, 2001.

MANTOVANI, A et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol*. v11, p519-531, 2011.

MANZ, M G; BOETTCHER, S. Emergency granulopoiesis. *Nat. Rev. Immunol*. v14, p302-314, 2014.

MARIANI, F; SENA, P; RONOCUCCI, L. Inflammatory pathways in the early steps of colorectal cancer development. *World J Gastroenterol*. V20(29), p9716-31, 2014.

MARINO, F et al. Diazepam stimulates migration and phagocytosis of human neutrophils: Possible contribution of peripheral-type benzodiazepine receptor and intracellular calcium. *Pharmacology*. v63, p42-49, 2001.

MARWICK, J A et al. Oxygen levels determine the ability of glucocorticoids to influence neutrophil survival in inflammatory environments. *Journal of Leukocyte Biology*. v. 94, p1-8, 2013.

MENA, J et al. Linoleic acid increases adhesion, chemotaxis, granule release, intracellular calcium mobilisation, MAPK phosphorylation and gene expression in bovine neutrophils. *Vet. Immunol. Immunopath*. v 151, p275-284, 2013.

MEURICE, N; MAGGIORA, G M; VERCAUTEREN, D P. Evaluating molecular similarity using reduced representations of the electron density. *J Mol Model.* V11, p237-247, 2005.

MEYLAN, E et al. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF- κ B activation. *Nat Immunol.* v5, p503–507, 2004.

MITCHELL, M J; KING, M R. Shear induced resistance to neutrophil activation via the Formyl Peptide receptor. *Biophys J.* v 102, p1804-1814, 2012.

MOGENSEN, T H. Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clin Microb Rev.* v22(2), p240-273, 2009.

MONTEIRO, D A; CARLOS, I Z; PINTO, F G. Diazepam, em dose única, inibe a migração celular, a estimulação macrófágica e a atividade de TNF- α na reação inflamatória aguda induzida por LPS em camundongos. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* v44, p613-620, 2008.

MUELLER, H et al. Tyrosine kinase Btk regulates E-selectin-mediated integrin activation and neutrophil recruitment by controlling phospholipase C (PLC) γ 2 and PI3K γ pathways. *Blood.* v115, p3118–3127, 2010.

MULLER, W A. Getting leukocytes to the site of inflammation. *Vet Pathol.* v50(1), p7-22, 2013.

MURRAY, J. et al. Role of leukotrienes in the regulation of human granulocyte behaviour: dissociation between agonist-induced activation and retardation of apoptosis. *Br. J. Pharmacol.* v139, p388–398, 2003.

NAHAS, N et al. Tyrosine phosphorylation and activation of a new mitogen-activated protein (MAP)- kinase cascade in human neutrophils stimulated with various agonists. *Biochem J.* v 318, p247-53, 1996.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunol.* v. 6, p173-182, 2006.

NOVAS, M L et al. Increase of peripheral type benzodiazepine binding sites in kidney and olfactory bulb in acutely stressed rats. *Eur J Pharmacol.* v 135, p243–246, 1987.

NIMITVILAI, S et al. Phorbol ester reduces ethanol excitation of dopaminergic neurons of the ventral tegmental area: involvement of protein kinase C θ . Front Integr Neurosc. V7(96), p1-11, 2013.

O'NEILL L. A, BOWIE A. G . The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol. V 7, 353–364, 2007.

OSTUNI, M A et al. Translocator protein (18 kDa) ligand PK 11195 induces transient mitochondrial Ca^{2+} release leading to transepithelial Cl^- secretion in HT-29 human colon cancer cells. Biologie Cellulaire. v 99, p639–647, 2007.

PAPADOPOULOS, V. et al. Peripheral benzodiazepine receptor in cholesterol transport and steroidogenesis. Steroids. v 62, p21–28, 1997.

PAPADOPOULOS, V. et al. The peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. Trends Pharmacol. Sci. v 27, p402-409, 2006.

PAPADOPOULOS, V; LECANU, L. Translocator protein (18 kDa) TSPO: an emerging therapeutic target in neurotrauma. Exp. Neurol. v 217, p53–57, 2009.

PARKER, L C et al. The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. J. Leukoc. Biol. v77, p886–892, 2005.

PETRUZZELLI, L; TAKAMI, M; HUMES, D. Structure and function of cell adhesion molecules. Am J Med. v 106, p467-476, 1999.

PORTER, K. J. et al. Regulation of lipopolysaccharide-induced inflammatory response and endotoxemia by β -arrestins. J Cell Physiol. v 225 (2), p406-416, 2010.

RAETZ, C R H; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. Annu. Rev. Biochem. v71, p635-700, 2002.

RAMPON, C et al. Translocator protein (18 kDa) is involved in primitive erythropoiesis in zebrafish. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. v 23, p4181–4192, 2009.

RAO, H L et al. Increased Intratumoral Neutrophil in Colorectal Carcinomas Correlates Closely with Malignant Phenotype and Predicts Patients' Adverse Prognosis. PLoS ONE. v7(1), e30806. doi:10.1371/journal.pone.0030806, 2012.

RAZA, K. et al. Synovial fluid leukocyte apoptosis is inhibited in patients with very early rheumatoid arthritis. Arthritis Res. Ther. v8(4), p1-7, 2006.

REPALLI, J. Translocator protein (TSPO) role in aging and Alzheimer's disease. Curr Aging Sci. v7(3), p168-75, 2014.

RONE, M B; FAN, J; PAPADOPOULOS, V. Cholesterol transport in steroid biosynthesis: Role of protein-protein interactions and implications in disease states. Biochim Biophys Acta. v1791(7), p646-658, 2009.

ROTZIUS, P et al. Distinct infiltration of neutrophils in lesion shoulders in ApoE-/- mice. Am. J. Pathol. v177, p493–500, 2010.

RUFF, M R et al. Benzodiazepine receptor-mediated chemotaxis of human monocytes. Science. v229, p1281-1283, 1985.

RUPPRECHT, R. et al. Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders. Drug discovery. v 9, 971-988, 2010.

RYU, J. K; CHOI, H. B; MCLARNON, J. G. Peripheral benzodiazepine receptor ligand PK11195 reduces microglial activation and neuronal death in quinolinic acid-injected rat striatum. Neurobiol. Dis. v 20, p550–561, 2005.

SAANO, V; RAGO, L; RATY, M. Peripheral benzodiazepine binding sites. Pharmac. Ther. v14, p503-514, 1989.

SABROE, I; DOWER, S K; WHYTE, M K. The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis. Clin. Infect. Dis. v41(7), p421–426, 2005.

SANTIN, JR et al. Chemical synthesis, docking studies and biological effects of a pan peroxisome proliferator-activated receptor agonist and cyclooxygenase inhibitor. Eur. J. Pharm. Sci. v48, p689-697, 2013.

SARNOWSKA, A et al. Diazepam neuroprotection in excitotoxic and oxidative stress involves a mitochondrial mechanism additional to the GABAAR and hypothermic effects. Neurochem Int. v55 (1-3), p164-73, 2009.

SEREZANI, C H et al. Leukotriene B4 amplifies NF-kB activation in mouse macrophages by reducing SOCS1inhibition of MyD88 expression. J. Clin. Invest. v121, p671-682, 2011.

SNELGROVE, R J et al. A critical role for LTA4H in limiting chronic pulmonary neutrophilic inflammation. Science. v330, p90–94, 2010.

SOEHNLEIN, O; LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. Nat. Rev. Immunol. v10, p427–439, 2010.

STARK, M A et al. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. Immunity. v22, p285-294, 2005.

STEFANI, H A et al. Synthesis, anti-inflammatory activity and molecular docking studies of 2,5-diarylfuran amino acid derivatives. Eur J of Med Chem. v47, p52-58, 2012.

SURIDJAN, I et al. Quantitative imaging of neuroinflammation in human white matter: a positron emission tomography study with translocator protein 18 kDa radioligand, [18F]-FEPPA. Synapse. V61 (11), p536-47, 2014.

TAGER, A.M; LUSTER, A.D. BLT1 and BLT2: the leukotrieneB4 receptors. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. v 69, p123-134, 2003.

TAKETANI, et al. Involvement of peripheral-type benzodiazepine receptors in the intracellular transport of heme and porphyrins. J Biochem. v 117, p875–880, 1995.

TARPEY, M M; FRIDOVICH, I. Methods of detection of vascular reactive species: Nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. Circ Res. v89, p224-236, 2001.

THAMMAVONGSA, V; MISSIAKAS, D M; SCHNEEWIND, O. Staphylococcus aureus degrades neutrophil extracellular traps to promote immune cell death. Science. v342, p863–866, 2013.

TOGBE, D; SCHNYDER-CANDRIAN,S; SCHNYDER, B. Toll-like receptor and tumour necrosis factor dependent endotoxininduced acute lung injury. International Journal of Experimental Pathology. v 88, (6), p387–391, 2007.

TOKAY, T. et al. Beta-amyloid peptide stimulates endozepine release in cultured rat astrocytes through activation of N-formyl peptide receptors. *Glia*. v 56, p1380–1389, 2008.

TSUJI, F., K. et al. Involvement of leukotriene B4 in arthritis models. *Life Sci*. v 64, p51, 1999.

TSUSHIMA, K et al. Acute lung injury review. *Internal Medicine*. v 48, (9), p621–630, 2009.

TU, L N et al. Peripheral Benzodiazepine Receptor/ Translocator Protein global knockout mice are viable with no effects on steroid hormone biosynthesis. *J Biol Chem. Manuscrit*, p1-25, 2014.

TU, L N et al. PK11195 Effect on Steroidogenesis Is Not Mediated Through the Translocator Protein (TSPO). *Endocrinology*. V156(3), pxx, 2015.

URBAN, C F et al. Neutrophil extra-cellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog*. v5(10), e1000639, 2009.

VAN KEYMEULEN, A et al. To stabilize neutrophil polarity, PIP3 and Cdc42 augment RhoA activity at the back as well as signals at the front. *J. Cell Biol*. v174, p437–445, 2006.

VEENMAN, L; GAVISH, M. The peripheral-type benzodiazepine receptor and the cardiovascular system: Implications for drugs development. *Pharmacology and Therapeutics*. v110, p503-524, 2006.

VERMA, A., NYE, J. S. e SNYDER, S. H. Porphyrins are endogenous ligands for the mitochondrial (peripheraltype) benzodiazepine receptor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. v 84, p2256–2260, 1987.

VIEIRA, O V et al. Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. *J. Cell Biol*. v155, p19–25, 2001.

VON BRUHL, M L et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J. Exp. Med*. v209, p819–835, 2012.

VON VIETINGHOFF, S; LEY, K. IL-17A controls IL-17F production and maintains blood neutrophil counts in mice. *J. Immunol.* v183, p865–873, 2009.

WANG, J; ARASE, H. Regulation of immune response by neutrophils. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* v1319, p66-81, 2014.

WEBER, C; ZERNECKE, A; LIBBY, P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nat. Rev. Immunol.* v8, p802–815, 2008.

WEI, M et al. Suppressive effects of diazepam on IFN- γ production by human T cells. *Int Immunopharmacol.* vXXX, pXXX-XXX, 2009.

WONG, C H Y; HEIT, B; KUBES, P. Molecular regulators of leucocyte chemotaxis during inflammation. *Cardiovascular Research.* v 86, p183-191, 2010.

WOODS, M J; ZISTERER, D M, WILLIAMS , D C. Two cellular and subcellular locations for the peripheral-type benzodiazepine receptor in rat liver. *Biochem. Pharmacol.* v.51, p1283–1292, 1996.

WOODFIN, A; VOISIN, M B; NOURSHARGH, S. Recent developments and complexities in neutrophil transmigration. *Curr. Opin. Hematol.* v17, p9–17, 2010.

XU, J et al. Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils. *Cell.* v114, p201–214, 2003.

YADAV, U C; RAMANA, K V. Regulation of NF- κ B-induced inflammatory signaling by lipid peroxidation-derived aldehydes. *Oxid Med Cell Longev.* Epub 690545. doi: 10.1155/2013/690545. 2013.

YAGO, T et al. E-selectin engages PSGL-1 and CD44 through a common signaling pathway to induce integrin α L β 2-mediated slow leukocyte rolling. *Blood.* v116, p485–494, 2010.

YAMAMOTO, M et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signaling pathway. *Science.* v301, p640–643, 2003.

YELISEEV, A A; KRUEGER, K E; KAPLAN, S. A mammalian mitochondrial drug receptor functions as a bacterial “oxygen” sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* v. 94, p5101–5106, 1997

YOKOMIZO, T et al. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B₄ that mediates chemotaxis. *Nature*. v 387, p620-624, 1997.

YOKOMIZO, T. et al. A second leukotriene B₄ receptor, BLT₂. A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. *J. Exp. Med.* v 192, p421-432, 2000.

YOKOMIZO, T. et al. Hydroxyeicosanoids bind to and activate the low affinity leukotriene B₄ receptor, BLT₂. *J. Biol. Chem.* v 276, p12454-12459, 2001a.

YOKOMIZO, T; IZUMI, T; SHIMIZU, T. Leukotriene B₄: Metabolism and signal transduction. *Arch. Biochem. Biophys.* V385(2), p231-241, 2001b.

YOUSEFI, O S et al. The 1,4-benzodiazepine Ro5-4864 (4-chlorodiazepam) suppresses multiple pro-inflammatory mast cell effector functions. *Cell Comm and Signaling*. V11(13), p1-15, 2013.

ZHANG, W. et al. Leukotriene B₄ receptor inhibitor LY293111 induces cell cycle arrest and apoptosis in human anaplastic large-cell lymphoma cells via JNK phosphorylation. *Leukemia*. v 19, p1977-1984, 2005.

ZHANG, H. et al. The STIM1 calcium sensor is required for activation of the phagocyte oxidase during inflammation and host defense. *Blood*. v123, p2238–2249, 2014.

ZHAO, Y et al. TSPO-specific ligand Vinpocetine exerts a neuroprotective effect by suppressing microglial inflammation. *Neuron Glia Biol.* v7(2-4), p187-197, 2011.