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

Inibição *in vivo* das óxido nítrico sintases: efeitos sobre a expressão
de moléculas de adesão e secreção de mediadores inflamatórios

Cristina Bichels Hebeda

Tese para obtenção do grau de DOUTOR.

Orientador (a): Prof. Dr(a). Sandra Helena Poliselli Farsky

São Paulo
2008

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

Inibição *in vivo* das óxido nítrico sintases: efeitos sobre a expressão
de moléculas de adesão e secreção de mediadores inflamatórios

Cristina Bichels Hebeda

Tese para obtenção do grau de DOUTOR.

Orientador (a): Prof. Dr(a). Sandra Helena Poliselli Farsky

São Paulo
2008

Ficha Catalográfica

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

Hebeda, Cristina Bichels

H443i Inibição *in vivo* das óxido nítrico sintases: efeitos sobre a expressão de moléculas de adesão e secreção de mediadores inflamatórios / Cristina Bichels Hebeda. -- São Paulo, 2008. 189p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Farsky, Sandra Helena Poliselli

1. Farmacologia 2. Imunologia 3. Inflamação I. T. II. Farsky, Sandra Helena Poliselli, orientador.

615.1 CDD

Cristina Bichels Hebeda

**Inibição in vivo das óxido nítrico sintases: efeito
sobre a expressão de moléculas de adesão e
secreção de mediadores inflamatórios**

Comissão Julgadora para
obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky
Orientador e Presidente

Profa. Dra. Catarina de Fátima Pereira Teixeira
1º. Examinador

Prof. Dr. Edson Antunes
2º. Examinador

Profa. Dra. Tânia Marcourakis
3º. Examinador

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
4º. Examinador

São Paulo, 17 de setembro de 2008.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Relatório de Defesa

Relatório de defesa pública de Tese do(a) Senhor(a) Cristina Bichels Hebeda no Programa: Toxicologia e Análises Toxicológicas, do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos 17 dias do mês de setembro de 2008, no(a) Auditório realizou-se a Defesa da Tese do(a) Senhor(a) Cristina Bichels Hebeda, apresentada para a obtenção do título de Doutor em Toxicologia e Análises Toxicológicas, intitulada:

"Inibição in vivo das óxido nítrico sintases: efeito sobre a expressão de moléculas de adesão e secreção de mediadores inflamatórios"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Vínculo do Docente	Sigla da Unidade	Resultado
Sandra Helena Poliselli Farsky	Presidente	FCF - USP	Aprovada
Catarina de Fatima Pereira Teixeira	Titular	I. Butantã - Externo	APROVADA
Edson Antunes	Titular	UNICAMP - Externo	aprovada
Tania Marcourakis	Titular	FCF - USP	APROVADO
Wothan Tavares de Lima	Suplente	ICB - USP	Aprovada
Resultado Final:			
Parecer da Comissão Julgadora *			

Comentários da Defesa (opcional)

Eu, Maria Roseli Ramos *stefano*, Secretária, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). São Paulo, aos 17 dias do mês de setembro de 2008.

Catarina de Fatima Pereira Teixeira
Catarina de Fatima Pereira Teixeira

Edson Antunes
Edson Antunes

Tania Marcourakis
Tania Marcourakis

Wothan Tavares de Lima
Wothan Tavares de Lima

Sandra Helena Poliselli Farsky
Sandra Helena Poliselli Farsky
Orientador(a)

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

Nos termos do artigo 110, do RG-USP, encaminhe-se o presente relatório à CPG, para homologação.

Impresso em: 15/09/2008

*Aos meus pais,
Ralf Hebeda e Edla Bichels Hebeda*

*Ao meu avô,
Henrique Bichels (in memorian)*

*Aos meus pais, Ralf Hebeda e Edla Bichels Hebeda,
por ser meu exemplo de conduta moral e de vida...
pelo constante incentivo a educação e
aprimoramento profissional...
pelo amor incondicional...*

*A minha irmã, Bárbara,
pelos momentos de diversão e descontração...
pela união, apoio e carinho...
por ser minha grande amiga...*

*Ao meu marido Marcel Monterio Duarte,
pela lógica aplicada a minha vida...
pelo incentivo, apoio, PACIENCIA e amor...
pela compreensão...
pela maravilhosa presença em minha vida...*

*A Prof. Sandra H. P. Farsky,
pela orientação...
pelo grande apoio...
e por todo esforço para me propiciar tudo àquilo
que foi necessário para o desenvolvimento desta tese
e da minha formação pessoal...*

*A minha irmã do coração, Silvana Sandri,
pela sua presença em minha vida...
por ser um exemplo de profissionalismo e dedicação...
pelos momentos de discussão...*

AGRADECIMENTOS

Aos novos amigos, Alexandre Ferreira, Danielle Maia, Sandra M. D. Macedo... Kaline Waisman, Fernanda Pinedo, Leilane Barboza, Mario Pacheco, Julyana Furukawa, Rodrigo Soares e Gabriela Borracha pelos momentos agradáveis na pós-graduação...

Aos funcionários do Laboratório de Análises Toxicológicas, Ângelo, Helena, Roseli, Karla, Dalva e Luzia, pela colaboração e amizade...

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação Elaine e Jorge, pela ajuda sempre eu necessária...

A Capes pela bolsa de doutoramento.

A FAPESP, pelo financiamento do projeto (05/60329-0).

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

RESUMO	18
ABSTRACT	20
1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Óxido Nítrico.....	23
1.2 Recrutamento Leucocitário.....	26
1.3 Óxido Nítrico e Recrutamento Leucocitário	34
1.4 Óxido Nítrico e Mediadores Inflamatórios.....	37
1.5 L-NAME	38
1.6 Dados que conduziram o desenvolvimento deste trabalho	39
2 OBJETIVOS	42
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
3.1 Animais.....	44
3.2 Tratamentos Farmacológicos	44
3.3 Isolamento dos Diferentes Tecidos e Células.....	45
3.3.1 Isolamento do Tecido Cerebral	45
3.3.2 Isolamento do Músculo Cremaster.....	45
3.3.3 Obtenção de Leucócitos Circulantes	45
3.3.4 Obtenção de Neutrófilos Migrados para o Peritônio.....	46
3.3.5 Obtenção de Macrófagos Residentes do Peritônio	46
3.3.6 Obtenção de Macrófagos Migrados para o Peritônio	46
3.3.7 Cultura de Leucócitos.....	47
3.4 Determinação de NO.....	47
3.4.1 Quimioluminescência	47
3.4.2 Reação de Griess.....	48
3.5 Atividade das NOS ex-vivo	48
3.6 Determinação da Expressão de Moléculas de Adesão	49
3.6.1 Ensaios de Imunohistoquímica.....	49
3.6.2 Ensaios de Citometria de Fluxo.....	51
3.6.3 Determinação da Expressão Gênica da L-selectina e PECAM-1 nos Leucócitos Circulantes e PECAM-1 no Músculo Cremaster	52

3.7	<i>Determinação da Atividade Enzimática da VAP-1</i>	52
3.8	<i>Quantificação da Concentração de Citocinas Pró e Antiinflamatórias</i> ..	53
3.9	<i>Quantificação de Leucotrieno B₄ (LTB₄)</i>	54
3.10	<i>Análise Estatística</i>	54
4	RESULTADOS	56
4.1	<i>Efeito do Tratamento com L-NAME Sobre a Atividade Enzimática das NOS</i> ..	56
4.2	<i>Efeito do Tratamento com L-NAME Sobre as Concentrações dos Produtos do NO no Exudato Inflamatório e no Plasma</i>	59
4.3	<i>Caracterização do Efeito do Tratamento com L-NAME Sobre a Peritonite Induzida pelo LPS</i>	61
4.4	<i>Efeitos do Tratamento com L-NAME Sobre a Expressão de Moléculas de Adesão</i>	62
4.4.1	<i>Expressão de L-selectina, PECAM-1 e β_2-integrina em Leucócitos Circulantes</i>	62
4.4.2	<i>Expressão de Selectinas em Células Endoteliais do Músculo Cremaster</i>	64
4.4.3	<i>Expressão de Imunoglobulinas em Células Endoteliais do Músculo Cremaster</i>	66
4.4.4	<i>Expressão de VAP-1 em Células Endoteliais do Músculo Cremaster e nos Sinusóides Hepáticos</i>	69
4.5	<i>Efeito do Tratamento com L-NAME Sobre a Síntese de Moléculas de Adesão nos Leucócitos e no Músculo Cremaster</i>	72
4.5.1	<i>Expressão Gênica da L-selectina e da PECAM-1 nos Leucócitos</i> ..	72
4.5.2	<i>Expressão Gênica da PECAM-1 no Músculo Cremaster</i>	75
4.6	<i>Atividade da VAP-1 no Músculo Cremaster e no Fígado</i>	77
4.7	<i>Efeito do Tratamento com L-NAME Sobre as Concentrações Séricas de IL-1β, TNF-α, IL-6 e IL-10</i>	79
4.8	<i>Efeitos do Tratamento com L-NAME Sobre a Capacidade Secretora de Leucócitos</i>	81
4.8.1	<i>Leucócitos Circulantes</i>	81

4.8.2	<i>Neutrófilos Migrados para a Cavidade Peritoneal</i>	84
4.8.3	<i>Macrófagos Residentes da Cavidade Peritoneal</i>	86
4.8.4	<i>Macrófagos Migrados para a Cavidade Peritoneal</i>	88
5	DISCUSSÃO	91
6	RESUMOS DOS RESULTADOS OBTIDOS E CONCLUSÕES	102
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
	<i>Anexo A: Pareceres da Comissão de Ética em Experimentação Animal</i> <i>(Ofício CEEA n. 007/2005 – Protocolo 60)</i>	163
	<i>Anexo B: Ficha do Aluno</i>	164
	<i>Anexo C: Currículo Lattes</i>	166
	<i>Anexo D: Informações para os Membros de Banca Julgadoras de</i> <i>Mestrado/Doutorado</i>	169

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1 Biossíntese do NO. Adaptado de AKTAN, 2004.....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 2 Etapas da interação leucócito-endotélio. Adaptado de LEY et al., 2007.</i>	<i>28</i>
<i>Figura 3 Bioativação celular do L-NAME.</i>	<i>39</i>
<i>Figura 4 Efeito do tratamento com L-NAME sobre as atividades das NOS na ausência de estimulação.</i>	<i>57</i>
<i>Figura 5 Efeito do tratamento com L-NAME sobre as atividades das NOS dependentes de Ca^{+2} após estimulação com LPS.....</i>	<i>58</i>
<i>Figura 6 Efeito do tratamento com L-NAME sobre as concentrações de NO no exsudato inflamatório e no plasma.</i>	<i>60</i>
<i>Figura 7 Caracterização do efeito do tratamento com L-NAME sobre a peritonite induzida pelo LPS.</i>	<i>61</i>
<i>Figura 8 Efeito do tratamento com L-NAME sobre a expressão de E- e P- selectina em células endoteliais do músculo cremaster</i>	<i>65</i>
<i>Figura 9 Efeito do tratamento com L-NAME sobre a expressão de ICAM-1 e VCAM-1 em células endoteliais do músculo cremaster.....</i>	<i>67</i>
<i>Figura 10 Efeito do tratamento com L-NAME sobre a expressão de PECAM-1 em células endoteliais do músculo cremaster</i>	<i>68</i>
<i>Figura 11 Efeito do tratamento com L-NAME sobre a expressão de VAP-1 em células endoteliais do músculo cremaster</i>	<i>70</i>
<i>Figura 12 Efeito do tratamento com L-NAME sobre a expressão de VAP-1 em sinusóides hepáticos.....</i>	<i>71</i>
<i>Figura 13 Efeito do tratamento com L-NAME sobre a expressão gênica da L- selectina em leucócitos circulantes.....</i>	<i>73</i>
<i>Figura 14 Efeito do tratamento com L-NAME sobre a expressão gênica da PECAM-1 em leucócitos circulantes.....</i>	<i>74</i>
<i>Figura 15 Efeito do tratamento com L-NAME sobre a expressão gênica da PECAM-1 no músculo cremaster.....</i>	<i>76</i>

<i>Figura 16 Efeito do tratamento com L-NAME sobre a atividade da VAP-1 no músculo cremaster.....</i>	<i>78</i>
<i>Figura 17 Efeito do tratamento com L-NAME sobre a atividade da VAP-1 no fígado.....</i>	<i>78</i>
<i>Figura 18 Efeito do tratamento com L-NAME sobre as concentrações séricas de IL-1β, TNF-α, IL-6 e IL-10.....</i>	<i>80</i>
<i>Figura 19 Concentração de mediadores inflamatórios no sobrenadante de leucócitos circulantes.....</i>	<i>83</i>
<i>Figura 20 Concentração de mediadores inflamatórios no sobrenadante de neutrófilos migrados para o peritônio.....</i>	<i>85</i>
<i>Figura 21 Concentração de mediadores inflamatórios no sobrenadante de macrófagos residentes do peritônio.....</i>	<i>87</i>
<i>Figura 22 Concentração de mediadores inflamatórios no sobrenadante de macrófagos residentes do peritônio.....</i>	<i>89</i>

INDICE DE TABELAS

<i>Tabela 1 Efeito do tratamento com L-NAME sobre a atividade das NOS independente de Ca^{+2} após a estimulação com LPS.....</i>	<i>58</i>
<i>Tabela 2 Efeito do tratamento com L-NAME na expressão de L-selectina, PECAM-1 e β_2integrina em condições basais ou após estimulação pelo LPS (5mg/Kg; i.p.; 4hs).....</i>	<i>63</i>

RESUMO

Resultados preliminares do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a inibição da síntese de NO por período de tempo prolongado reduz o recrutamento de leucócitos para focos inflamatórios, dependente, pelo menos em parte, da inibição da interação leucócito-endotélio e da expressão de L-selectina. O presente trabalho visou complementar os estudos sobre os mecanismos envolvidos nesta ação antiinflamatória. Para tanto, ratos Wistar machos (180 a 220g) receberam L-NAME (20mg/Kg; v.o.; 14 dias) ou água pela mesma via e período de tempo. Foi avaliada a atividade das enzimas óxido nítrico sintases (NOS) no tecido cerebral por radioimunoensaio; o recrutamento leucocitário para cavidade peritoneal induzido pelo LPS (5mg/kg, 4 horas); as expressões de moléculas de adesão em leucócitos do sangue circulante, no músculo cremaster e nos sinusóides hepáticos por ensaios de citometria de fluxo ou imunohistoquímica; as expressões gênicas de moléculas de adesão, quantificadas por PCR e a secreção/produção de mediadores inflamatórios em leucócitos por ensaios imunoenzimáticos, reação de Griess ou quimiluminescência. Os resultados obtidos mostraram que: 1) o tratamento com L-NAME reduziu em torno de 90% a atividade das NOS dependentes de Ca^{+2} em condições basais ou após estimulação *in vivo* com LPS; 2) as concentrações de NO no plasma e no peritônio inflamado estavam reduzidos em animais tratados com L-NAME (30% vs. controles); 3) a migração de leucócitos polimorfonucleares (PMN) para o peritônio inflamado estava reduzida em animais tratados com L-NAME (40% vs. controles); 4) as expressões de L-selectina e PECAM-1 em leucócitos circulantes; de PECAM-1 no endotélio do músculo cremaster e de VAP-1 no endotélio dos sinusóides hepáticos e músculo cremaster de animais tratados com L-NAME estavam reduzidas; 5) a redução na expressão de L-selectina foi dependente de inibição de sua síntese; 6) a concentração de IL-10 estava maior no soro de animais tratados com L-NAME em relação aos controles; 7) a maior concentração de IL-10 circulante pode refletir a produção desta citocina por leucócitos na circulação, uma vez que a

concentração de IL-10 também estava maior no sobrenadante de leucócitos circulantes de animais tratados com L-NAME; 8) concentrações reduzidas de IL-1 β e LTB₄ foram detectadas nos sobrenadantes de neutrófilos obtidos de animais tratados com L-NAME; 9) macrófagos obtidos de animais tratados com L-NAME produziram maiores concentrações de IL-1 β , TNF- α e IL-6, e menores concentrações de IL-10 na ausência de estimulação; na vigência estimulação *in vitro* com LPS os macrófagos de animais tratados com L-NAME produziram menores concentrações de NO. Em conjunto, os resultados obtidos neste trabalho mostram que o tratamento com L-NAME por período prolongado de tempo inibe a atividade das NOS dependentes de Ca⁺² e nesta condição reduz as concentrações de NO circulante e no foco da inflamação, além de inibir a migração de leucócitos para o foco inflamatório, confirmando propriedades pró-inflamatórias do NO. Os mecanismos envolvidos na inibição da migração celular parecem compreender a modulação da expressão e/ou síntese das moléculas de adesão constitutivas expressas em leucócitos e no endotélio, além da modulação da secreção de mediadores pró ou antiinflamatórios em leucócitos circulantes e neutrófilos. Por outro lado, os efeitos do tratamento com L-NAME sobre a secreção de mediadores químicos por macrófagos induzem a secreção destes e corroboram a dualidade dos efeitos do NO no processo de recrutamento celular.

Palavras-chave: Óxido nítrico. L-NAME. Recrutamento leucocitário. Moléculas de Adesão. Mediadores Inflamatórios.

***In vivo* inhibition of nitric oxide synthases: effects on expressions of adhesion molecules and secretion of inflammatory mediators**

ABSTRACT

Our previous results have demonstrated that *in vivo* chronic inhibition of nitric oxide synthesis reduces leukocyte recruitment into inflammatory focus, dependent, at least in part, on impaired leukocyte-endothelial interactions and expression of L-selectin. This study aimed to clarify the mechanisms involved in the reduced leukocyte migration observed in L-NAME-treated rats. For this purpose, male Wistar rats (180-220g) were treated with L-NAME (20 mg/kg, oral route, 14 days, dissolved in drinking water); controls animals received water by the same route and period of time. The effectiveness of L-NAME treatment was investigated by examining the activity of nitric oxide synthases (NOS) in the brain tissue using radioimmunoassay. In addition, effects of L-NAME treatment were evaluated in LPS-induced leukocyte recruitment into peritoneal cavity (5mg/kg, 4 hours); expression of adhesion molecules was determined in circulating leukocytes, cremaster muscle and liver sinusoids by flow cytometry and immunohistochemistry assay; gene expressions of adhesion molecules were quantified by PCR and leukocyte secretion of inflammatory mediators was measured by immunoenzymatics assays, Griess reaction or chemiluminescence. Our results show that: 1) L-NAME treatment reduced, around 90%, Ca^{+2} – dependent NOS activity in the presence or not of *in vivo* inflammation; 2) concentrations of NO in the plasma and into inflamed peritoneum were reduced in L-NAME-treated animals (30% vs. control animals); 3) migration of PMN leukocytes into inflamed peritoneum was impaired in L-NAME-treated rats (40% vs. control animals); 4) expressions of L-selectin and PECAM-1 in circulating leukocytes, PECAM-1 in endothelium from cremaster muscle and VAP-1 in endothelium from liver sinusoids and cremaster muscle were reduced in L-NAME-treated rats; 5) decrease in L-selectin expression was dependent on inhibition of its synthesis; 6) concentrations of IL-10 was higher in serum from L-

NAME-treated rats in comparison to control rats; 7) these higher concentrations of circulating IL-10 can reflect the production of this cytokine by leukocytes from circulation, as IL-10 levels were greater in the supernatant of circulating leukocytes obtained from L-NAME-treated animals; 8) L-NAME treatment disturbed neutrophils' ability to secrete IL-1 β and LTB₄, since these concentrations were lower in the supernatants of neutrophils from L-NAME-treated animals; 9) in absence of stimulation, macrophages obtained from L-NAME-treated rats produced higher concentrations of IL-1 β , TNF- α and IL-6, and lower concentrations of IL-10, whereas in presence of *in vitro* LPS these cells produced lower concentrations of NO. Taken together, our results show that L-NAME treatment administered for a prolonged period of time inhibits Ca⁺²-dependent NOS activity, and in this condition, reduces concentrations of NO in plasma and into inflammatory focus and decreases leukocyte migration to the inflammatory focus thus confirming pro-inflammatory properties of NO. The mechanisms involved in impaired cellular migration seem to involve the modulation of expression and/or synthesis of constitutive adhesion molecules in leukocytes and endothelium, and to interfere in the secretion of pro or anti inflammatory mediators. On the other hand, actions of NO in secretion of chemical mediators by macrophages induces the production of inflammatory mediators and support the duality of NO in the cellular recruitment process.

Key-words: Nitric oxide. L-NAME. Leukocyte recruitment. Adhesion molecules. Inflammatory mediators.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é um radical inorgânico de meia vida curta (3 a 5 segundos) que se difunde rapidamente dentro das células. Age como mediador biológico, similar aos neurotransmissores no sistema nervoso, regula o tônus vascular e é um importante agente envolvido na defesa do hospedeiro no sistema imune (AKTAN, 2004).

O NO é biossintetizado no organismo a partir do oxigênio molecular e da L-arginina, pela ação de um grupo de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS). A reação envolve a transferência de cinco elétrons em dois passos separados de mono-oxigenação, como ilustrado abaixo.

Figura 1 Biossíntese do NO. Adaptado de AKTAN, 2004

Inicialmente a N^ω-hidroxi-L-arginina é formada pela reação entre o O₂ e o NADPH na presença de tetrahydrobiopterina (BH₄). O segundo passo da reação resulta na oxidação da N^ω-hidroxi-L-arginina e posterior formação do NO e L-citrulina. Outros cofatores envolvidos na reação são heme, FMN (mononucleotídeo flavina) e FAD (dinucleotídeo flavina adenina) (KNOWLES & MONCADA, 1994; AKTAN, 2004). Após um grande consumo de L-arginina pelas NOS ou mesmo na ausência deste substrato, todas as isoformas enzimáticas

são capazes de gerar o ânion superóxido (O_2^-) de maneira dependente de cálcio e calmodulina (CaM) (STUEHR *et al.*, 2001).

Até o momento três isoformas distintas de NOS foram descritas. Duas delas são constitutivamente expressas (cNOS), a neuronal (nNOS ou NOS I) e a endotelial (eNOS ou NOS III) e a outra isoforma é induzida por estímulos inflamatórios como produtos bacterianos ou citocinas (iNOS ou NOS II). As três isoformas enzimáticas atuam como homodímeros, consistindo de dois monômeros idênticos e divididos em dois domínios maiores: um domínio C-terminal com atividade redutase e um N-terminal com atividade oxigenase. O domínio C-terminal contém sítios de ligação para FAD, FMN e NADPH e o domínio N-terminal apresenta sítios de ligação para heme, BH_4 e L-arginina. As diferentes isoformas de NOS são cataliticamente ativas apenas quando constituem um dímero, o que ocorre somente na presença de CaM e após a incorporação do heme (FLEMING & BUSSE, 1999; CIRINO *et al.*, 2003).

Apesar das três isoformas catalisarem a mesma reação, diferem na regulação, amplitude e duração da produção de NO, além da distribuição celular e tecidual. A eNOS é expressa por células endoteliais, leucócitos, plaquetas, fibroblastos, entre outros, e está localizada na membrana plasmática ligada à caveola e no aparato de Golgi. As caveolas são invaginações da membrana plasmática onde ficam ancoradas numerosas proteínas sinalizadoras, incluindo subunidades da proteína G, fosfatidil-3-inositol e proteínas tirosina quinases (FLEMING & BUSSE, 1999). A nNOS foi inicialmente purificada de células nervosas e hoje sabe-se que também é expressa em células epiteliais e endoteliais, miócitos, neutrófilos e mastócitos (STANARIUS *et al.*, 1998; FORSTERMANN *et al.*, 1998).

A eNOS e a nNOS existem nas células como proteínas pré-formadas e suas atividades dependem da elevação intracelular de cálcio em resposta a neurotransmissores e substâncias vasoativas (BOGDAN, 2001). Esta ativação ocorre de maneira rápida e transitória sendo que a cinética de ativação é dependente da biodisponibilidade do cálcio intracelular. A regulação da expressão e atividade das cNOS está relacionada a diferentes mecanismos pós-

tradução, incluindo interação das enzimas com proteínas ou fosfolípidos de membrana, fosforilação de resíduos de serina ou treonina, biodisponibilidade de cofatores e do substrato L-arginina (FLEMMING & BUSSE, 1999). Por exemplo, a fosforilação dos resíduos de serina¹¹⁷⁷ e serina⁶³³ ativa a eNOS em resposta ao *shear stress* (força paralela ou tangencial exercida pelo fluxo sanguíneo no endotélio), estrógeno ou insulina, enquanto que a fosforilação da treonina⁴⁹⁵ no domínio de ligação da CaM é inibitório (ALP & CHANNON, 2004; MOUNT *et al.*, 2007).

O NO produzido pelas enzimas constitutivas apresenta efeitos autócrino ou parácrino. O próprio NO pode realizar *feedback* negativo sobre a enzima e bloquear sua síntese de maneira irreversível (AKTAN, 2004; REYNAERT *et al.*, 2004). Entretanto, os efeitos mais comuns são aqueles produzidos nas células adjacentes, próximas ao local de produção do mediador. Neste contexto, vale ressaltar que o NO produzido pelas células endoteliais vasculares, estimula a guanilil ciclase solúvel (GCs) que converte o trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), que por sua vez, atua como um segundo mensageiro, reduzindo as concentrações de cálcio intracelular e promovendo o relaxamento e a dilatação das células do músculo liso vascular (COLEMAN, 2001).

Diferente das isoformas constitutivas, a iNOS é expressa em uma ampla variedade de tecidos e células mediante estimulação. Leucócitos, células endoteliais e epiteliais, queratinócitos, fibroblastos, condrócitos, osteócitos e neurônios, expressam a iNOS após estimulação por endotoxinas bacterianas ou citocinas, como interferon-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interleucina-1 (IL-1). Estes agentes interagem com receptores que promovem eventos sinalizadores intracelulares, com conseqüente ativação de fatores de transcrição, como NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) e AP-1 (*activation protein – 1*) para a síntese de iNOS. Deste modo, existe um intervalo de tempo entre a ativação da célula e a produção de NO pela iNOS, tendo em vista que é necessária a síntese e estabilização do RNA mensageiro (RNAm) e da proteína

iNOS. Vale ressaltar que a produção de NO por esta enzima é independente das concentrações de cálcio intracelular (BOGDAN, 2001; COLEMAN, 2001).

A geração de NO pela iNOS é regulada durante o processo de síntese protéica e pela atividade enzimática. A principal etapa de regulação da síntese da iNOS é durante a fase de transcrição do RNAm, mas também pode ocorrer durante a tradução da proteína. Após a tradução da iNOS, o controle da geração de NO pode envolver eventos como: dimerização da proteína, fosforilação de sítios da proteína, ligações de cofatores, além da biodisponibilidade de O₂ e da L-arginina (AKTAN, 2004).

O NO produzido pela ativação da iNOS é instável e em condições aeróbicas é rapidamente oxidado originando as espécies reativas do óxido de nitrogênio (ERONs). Em sistemas biológicos, a principal ERON produzida é o trióxido de nitrogênio (N₂O₃), um poderoso agente oxidante. O NO pode reagir com o ânion superóxido (O₂⁻) formando peroxinitrito (ONOO⁻), que é altamente lesivo para a célula, ou pode interagir com grupamentos tióis ou aminas presente em proteínas alterando suas conformações e/ou funções. O ONOO⁻ é um dos principais mediadores dos efeitos lesivos do NO (COLEMAN, 2001).

Diante do exposto, fica evidente a complexidade dos fenômenos envolvendo a biossíntese do NO pelas NOS constitutivas ou induzida bem como suas amplas e distintas distribuições teciduais. Vale ressaltar, que as expressões e/ou ativação das NOS desencadeiam ações autócrinas e/ou parácrinas importantes em diferentes condições fisiológicas e de doenças.

1.2 Recrutamento Leucocitário

O recrutamento de células para o foco inflamatório compreende um dos eventos primordiais e fundamentais da resposta inflamatória (Figura 2). Em condições fisiológicas, os leucócitos circulam na parte central do vaso e os eritrócitos na região periférica. Esta localização é dependente do tamanho da célula, onde células de tamanho maior se localizam no centro e células de tamanho menor na periferia do vaso. Fazem parte de poucas exceções o *pool*

periférico de leucócitos aderido à parede dos vasos da microcirculação e a recirculação de linfócitos, que interagem com células endoteliais especializadas de tecidos linfóides secundários (HARLAN, 1985; RAMPART 1994; WIEDLE *et al.*, 2001).

Após estímulo inflamatório, os eritrócitos se agregam formando estruturas maiores que os leucócitos e, como consequência, ocorre uma inversão na localização das células na luz do vaso (CHIEN, 1982). Os leucócitos passam a marginal e rolar sobre o endotélio de microvasos (comportamento *rolling*), predominantemente vênulas pós-capilares, próximas a área lesada. Neste momento, dá-se início uma série de eventos adesivos que resultará no extravasamento de leucócitos para o sítio da injúria (Figura 2). O rolamento dos leucócitos ao endotélio é mediado por um grupo de moléculas de adesão chamadas selectinas. Estas se ligam a carboidratos específicos, num processo dependente de cálcio. O comportamento *rolling* é mediado pela expressão de L-selectina (*Leukocyte Endothelial Cell Adhesion Molecule*, LECAM; CD62L) em leucócitos, E-selectina (*Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1*, ELAM-1; CD62E) no endotélio e P-selectina (CD62P) em plaquetas e no endotélio. A P-selectina encontra-se estocada nos grânulos α das plaquetas e nos corpúsculos de Weibel – Palade presentes no citoplasma das células endoteliais. Após estimulação é rapidamente mobilizada até superfície celular (SPERANDIO, 2006). A E-selectina é expressa após estimulação, no entanto necessita de indução transcricional com pico de expressão entre 3 e 4 horas (TAMARU & NARUMI, 1999). Já a L-selectina é constitutiva e sua expressão pode ser aumentada mediante indução inflamatória. Logo após exercer sua função no processo de *rolling* ela é clivada para que o leucócito, subseqüentemente, adira firmemente ao endotélio pela ação das integrinas ou retorne ao fluxo sanguíneo (JUNG & DAILEY, 1990; JUNG & LEY, 1999).

Figura 2 Etapas da interação leucócito-endotélio. Adaptado de LEY et al., 2007.

As integrinas favorecem a estabilização dos eventos mediados pelas selectinas. As integrinas pertencem a uma grande família de receptores heterodiméricos (subunidades α e β), que além de mediar a adesão entre células também emitem sinais bidirecionais para o interior da célula e para o ambiente extracelular. A associação de várias subunidades α com uma subunidade β comum subdividiu esta família. Assim, a subfamília das β_2 integrinas compreende LFA-1 (*Leukocyte Function-associated Antigen-1*, CD11a); MAC-1 (*Macrophage Associate-1*, CD11b); Gp150,95 (CD11c) e CD11d e possuem papel relevante na interação leucócito-endotélio. Estes receptores são expressos de maneira constitutiva em todos os leucócitos num estado de baixa afinidade. Durante ativação celular, quer seja por estímulos inflamatórios, quer seja por mediadores endógenos, ocorre mudança na conformação das subunidades α e β para um estado de alta afinidade pelo respectivo ligante (YANG et al., 2004; JAKUS et al., 2007). As β_2 integrinas ligam-se firmemente a diferentes ligantes no endotélio, entre as quais as moléculas da superfamília das imunoglobulinas. Monócitos e linfócitos expressam, ainda, uma molécula pertencente à subfamília da β_1 integrina, a $\alpha_4\beta_1$ integrina que se liga as imunoglobulinas do endotélio (DEJANA et al., 1994). Além da adesão entre

leucócitos e endotélio, as funções das integrinas abrangem a quimiotaxia e a fagocitose, que são reguladas pelo aumento no número de receptores na superfície celular ou por alterações morfofuncionais (SHINJI *et al.*, 2003; HEIT *et al.*, 2005).

As deficiências nos processos de adesão e quimiotaxia de leucócitos são conhecidas como síndrome da deficiência de adesão dos leucócitos (*Leukocyte Adhesion Deficiency*, LAD). Esta síndrome é classificada em LAD tipo I, II ou III, e cada um destes subtipos varia quanto à importância dos sintomas (HABBAL & STROBEL, 1993). O tipo I compreende alterações autossômicas recessivas com redução na expressão da subunidade β_2 da integrina. Os leucócitos destes indivíduos são hábeis em rolar sobre o endotélio, mas não são aptos a aderirem sobre o mesmo. Desta forma, a migração de células para o foco de lesão fica comprometida, e um aumento pronunciado do número de leucócitos circulantes é freqüentemente observado. Os pacientes com esta síndrome costumam apresentar infecções recorrentes desde o nascimento (HOGG & BATES, 2000; MATHEW *et al.*, 2000; LAKSHMAN & FINN, 2001). Na LAD tipo II os leucócitos expressam a cadeia β_2 da integrina, mas esta é funcionalmente deficiente. Tem sido descrito que este tipo de LAD consiste numa desordem metabólica generalizada que afeta o metabolismo da fucose, importante açúcar envolvido na síntese de carboidratos fucosilados, incluindo o sialil Lewis X. Este último, participa dos fenômenos de *rolling* por ser ligante das selectinas (PHILLIPS *et al.*, 1995; ETZIONI & TONETTI, 2000; SCACHTER, 2001). Recentemente, foi descrito um terceiro tipo de LAD, o tipo III (LAD-III), onde os leucócitos expressam as integrinas, mas estas apresentam deficiência na avidez da ligação com seus ligantes. Assim como a LAD-I, a LAD-III também consiste numa desordem genética (ALON & ETZIONI, 2003; PALSVOLSKY *et al.*, 2007).

No endotélio, uma importante família de moléculas de adesão com papel na interação de leucócitos à parede vascular, é a da superfamília das imunoglobulinas. Dentre as moléculas que se destacam no processo estão a ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 e PECAM-1.

A ICAM-1 é constitutivamente expressa na membrana da célula endotelial e em uma variedade de outras células como fibroblastos, macrófagos e linfócitos e sua expressão pode ser aumentada por estímulos inflamatórios (YANG *et al.*, 2005). A ICAM-1 participa das interações leucócito-endotélio como receptor para β_2 integrinas, LFA-1 e MAC-1, e determina um recrutamento seletivo de leucócitos em diferentes situações patológicas (STAUNTON *et al.*, 1990; DIAMOND *et al.*, 1991; YUSUF-MAKAGIANSAR *et al.*, 2002). Além do seu papel na aderência, nas células endoteliais, a ICAM-1 ativa uma série de sinais intracelulares, desencadeando as alterações no citoesqueleto de actina, e a conseqüente contratilidade da célula (LORENZON *et al.*, 1998). A ICAM-2 está presente na membrana de células endoteliais e sua expressão não é induzida por estímulos inflamatórios. É ligante para β_2 integrinas e LFA-1 (YUSUF-MAKAGIANSAR *et al.*, 2002).

A baixa expressão da VCAM-1 na célula endotelial pode ser induzida por estimulação, via síntese protéica, por mediadores inflamatórios (POBER & COTRAN, 1991). As interações entre VCAM-1 e VLA-4 (*Very Late Activation antigen-4*) ou $\alpha 4\beta 7$ integrina, presente nos leucócitos, estão relacionadas ao processo de transmigração celular entre as junções interendoteliais até o foco inflamatório (BOCHNER *et al.*, 1991; PETRUZZELLI *et al.*, 1999).

A PECAM-1 encontra-se concentrada nas bordas das células endoteliais não ativadas e participa na formação das junções destas células por interações homofílicas. Também é expressa em células precursoras imaturas da medula óssea, monócitos, leucócitos polimorfonucleares (PMN), plaquetas e em algumas linhagens de linfócitos e tumores (ALBELDA *et al.*, 1990; TANG *et al.*, 1993; LUTZKY *et al.*, 2006). A PECAM-1 é um receptor de superfície celular mecanoresponsivo que apresenta um domínio intracelular, e por esta razão, medeia diversos eventos dependentes de sinalização. Durante a interação leucócito-endotélio, esta molécula sinaliza para aumentar a superfície de contato da célula endotelial, modificar a conformação do citoesqueleto ou para induzir a própria expressão gênica. Quando a PECAM-1 é ativada pelo *shear stress*, é fosforilada em diferentes resíduos de tirosina, ativando uma cascata de

sinalização intracelular (COOK-MILLS & DEEM, 2005; FUJIWARA, 2006). Deste modo, esta molécula medeia diferentes funções, incluindo o recrutamento de leucócitos para o sítio da inflamação, vasculogênese, angiogênese e regulação da ativação de neutrófilos, monócitos e células T e fagocitose (DELISSER *et al.* 1997; ELIAS *et al.*, 1998). Adicionalmente, a PECAM-1 regula a integridade e a permeabilidade das junções aderentes, a organização do citoesqueleto e a disposição dos filamentos de actina durante o movimento celular (ILAN & MADRI, 2003; NEWMAN & NEWMAN, 2003).

Outra molécula envolvida no recrutamento celular, caracterizada recentemente é a ectoenzima VAP-1. Esta é uma monoamino-oxidase, sensível a semicarbazida (SSAO), que catalisa a deaminação oxidativa de aminas primárias, formando o aldeído correspondente e liberando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e amônia. A VAP-1 está presente em vesículas citosólicas de células endoteliais e após estímulo inflamatório é translocada para a membrana celular. A molécula também é encontrada em células dendríticas, pericitos, células do músculo liso, adipócitos e linfócitos (SALMI & JALKANEN, 2001). O papel da VAP-1 no recrutamento leucocitário foi demonstrado pelo emprego de anticorpos monoclonais e animais geneticamente deficientes. Em sistema de fluxo *in vitro*, alguns autores demonstraram que o bloqueio da VAP-1 prejudica os fenômenos de *rolling* e aderência de leucócitos em células endoteliais que expressavam a molécula (LALOR *et al.*, 2002). *In vivo*, o tratamento de camundongos com anticorpos anti-VAP-1 aumentou a velocidade do *rolling* e reduziu a aderência e a transmigração de granulócitos para o foco inflamatório (TOHKA *et al.*, 2001). Na inflamação hepática, a VAP-1 parece ser a principal molécula que medeia o recrutamento de linfócitos T $CD4^+$ em vênulas pós-sinusóides e em sinusóides hepáticos de camundongos (BONDER *et al.*, 2005). A participação enzimática da VAP-1 nos eventos de interação leucócito-endotélio também já foi explorada. KOSKINEN *et al.* (2004) verificaram que a atividade enzimática da VAP-1 é um pré-requisito para a adesão de granulócitos, já que houve redução na interação de leucócitos ao endotélio transfectado com VAP-1 enzimaticamente inativa, mas estruturalmente íntegra. Recentemente,

JALKANEN *et al.* (2007) sugeriram que a sinalização intracelular dependente da VAP-1 promove um estado de ativação diferenciado do endotélio vascular para uma resposta inflamatória amplificada. Estes autores demonstraram que a transcrição e translocação de P- e E-selectinas, bem como o *rolling* de linfócitos em células endoteliais foram dependentes da atividade enzimática da VAP-1. Em conjunto, os dados acima indicam que o bloqueio, tanto da atividade enzimática quanto da molécula, ocasiona alterações nos fenômenos envolvidos no recrutamento leucocitário. Entretanto, não está claro se os efeitos são decorrentes da ação enzimática *per se* ou da geração de outros compostos.

A descrição apresentada mostra que as interações leucócito-endotélio mediadas pelas moléculas de adesão constituem evento inicial e fundamental para o processo. As expressões e/ou atividades das moléculas de adesão, bem como, os mecanismos bioquímicos e as alterações morfológicas necessárias nos leucócitos durante suas migrações são dependentes da ação de uma série de substâncias químicas produzidas por diferentes tipos celulares em cada microambiente (ABBAS *et al.*, 1998; HUSSAIN *et al.*, 1998; LORENZI, 1999; WIEDLE *et al.*, 2001; LAU *et al.*, 2005; KUMAR *et al.*, 2005). Neste contexto, citocinas, quimiocinas, proteínas do sistema complemento, cininas, mediadores lipídicos são relevantes para a migração leucocitária (ALI *et al.*, 1999; FRANGOIANNIS *et al.*, 2001). Dentre estes mediadores as ações das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 e IL-6, da citocina antiinflamatória IL-10 e do eicosanóide leucotrieno B₄ (LTB₄) serão resumidamente descritos.

O TNF- α é produzido mediante estimulação de diversos tipos celulares, entre eles, os leucócitos e as células endoteliais, por produtos bacterianos, vírus, citocinas, células tumorais e pelo próprio TNF- α . É uma citocina pleiotrópica que exerce seus efeitos pela interação com receptores distintos (DARNAY & AGGARWAL, 1997; CLARK *et al.*, 2005; CIRIONI *et al.*, 2005; HATAO *et al.*, 2005). Já está bem descrito o papel do TNF- α como indutor da expressão de moléculas de adesão como P-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 (KUNKEL *et al.*, 1997; YU & LIMPER, 1997; WOO *et al.*, 2005) Adicionalmente, foi demonstrado

que muitas das respostas neutrofílicas frente ao TNF- α parecem requerer uma sinalização dependente de β_2 integrina (CHAKRABARTI *et al.*, 2006).

A IL-1 β atua sinergicamente com TNF- α como mediador da resposta inflamatória ativando fagócitos e células endoteliais (WONG *et al.*, 1989; KULDO *et al.*, 2005). Assim como o TNF- α , a IL-1 β é produzida por leucócitos, induz a expressão de moléculas de adesão como P-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 e estimula o recrutamento leucocitário (DUSTIN *et al.*, 1986; MEAGER, 1999; CHING *et al.*, 2005; CHING *et al.*, 2006).

A IL-6 é sintetizada principalmente por macrófagos, fibroblastos e células endoteliais (HELFGOTT *et al.*, 1987; VAN DAMME *et al.*, 1989). A liberação desta citocina por neutrófilos humanos é controversa (CASSATELLA *et al.*, 1995). A IL-6 apresenta propriedades pró e antiinflamatórias incluindo a estimulação da síntese de proteínas de fase aguda, inibição da síntese de IL-1 e TNF- α e indução da síntese de glicocorticóides (OPAL & DEPALO, 2000). Ainda, é capaz de modular a expressão de ICAM por células mesoteliais (ZIPRIN *et al.*, 2003).

A IL-10 é sintetizada por células Th2 CD4⁺, células B, monócitos e macrófagos ativados e suas ações biológicas resultam, em parte, pela capacidade de realizar *feedback* negativo sobre os efeitos pró-inflamatórios de macrófagos (COUPER *et al.*, 2008). Estudos com camundongos deficientes de IL-10 indicam que esta citocina atua como um regulador hemostático de parâmetros hemodinâmicos, interação leucócito-endotélio e disfunção microvascular (HICKEY, *et al.*, 1998).

O LTB₄ é um eicosanóide lipídico derivado do ácido araquidônico pela ação da 5-lipoxigenase e leucotrieno A₄ hidroxilase. É predominantemente liberado por células inflamatórias como PMN, macrófagos e mastócitos e está envolvido na geração de espécies reativas de oxigênio, aumento do recrutamento de leucócitos e modulação da expressão da β_2 integrina (FUNK, 2001; FRIEDRICH *et al.*, 2003; HELLER *et al.*, 2005). Liga-se ao receptor de alta afinidade BLT₁, presente em neutrófilos, eosinófilos e monócitos, e parece estar

envolvido na modulação da afinidade/avidez da β_2 integrina com seus ligantes na célula endotelial (FRIEDRICH *et al.*, 2003).

1.3 Óxido Nítrico e Recrutamento Leucocitário

A participação do NO no recrutamento de leucócitos para o foco inflamatório tem sido amplamente investigada e os resultados apresentados na literatura são controversos. Tem sido proposto que dependendo da fonte celular e enzimática do NO, da sua concentração no local de ação e da localização e intensidade do processo inflamatório, este mediador pode apresentar papel pró ou antiinflamatório.

O papel antiinflamatório do NO produzido pelas cNOS foi inicialmente demonstrado por KUBES *et al.* (1991), quando estudaram a participação do NO na interação leucócito-endotélio na ausência de resposta inflamatória. Estes autores demonstraram que a inibição local da produção do NO induziu aumento no número de leucócitos em comportamento *rolling* e aderidos à parede dos vasos da microcirculação de felinos. Estudos complementares demonstraram que a inibição do NO constitutivo aumentou o recrutamento de leucócitos para o foco inflamatório (SUEMATSU *et al.*, 1994; NIU *et al.*, 1994). A proposta inicial seria a ação do NO como um *scavenger* de superóxido, reduzindo sua ação pró-inflamatória (KUBES *et al.*, 1993; SPIECKER *et al.*, 1998). Mais tarde, os mecanismos estudados indicaram que o NO poderia inibir diretamente P-selectina, E-selectina, β_2 integrina, ICAM e VCAM, como já salientado moléculas de adesão que medeiam o comportamento *rolling* e aderência de leucócitos ao endotélio (DAVENPECK *et al.*, 1994; MITCHELL *et al.*, 1998; LINDEMANN *et al.*, 2000). Mais recentemente, estudos corroboraram o papel do NO na interação leucócito-endotélio, pelo emprego de animais *knockout* para eNOS ou nNOS. O NO gerado por ambas as enzimas tem sido proposto como modulador da interação leucócito-endotélio e na ausência de uma destas isoformas, a outra é capaz de suprir o NO necessário para suas ações anti-adesivas (SANZ *et al.*, 2001; VALLANCE *et al.*, 2004).

Uma série de outros estudos mostra que o NO proveniente da iNOS na vigência de estresse de diferentes origens também atua como modulador anti-inflamatório. A participação do NO como um regulador hemostático da interação leucócito-endotélio foi investigada em diferentes leitos microvasculares de camundongos *knockout* para iNOS. Nestes animais foi observado um aumento no recrutamento de leucócitos para o foco inflamatório, bem como no rolamento e aderência destas células na microcirculação pulmonar, hepática e do músculo cremaster (HICKEY *et al.*, 1997; MCCAFFERTY *et al.*, 1997). Recentemente, SECCO *et al.* (2004), usando inibição farmacológica da iNOS ou animais *knockout* para a enzima ratificaram os dados apresentados acima. A administração de dose aguda de aminoguanidina, inibidor específico da iNOS, em ratos causou aumento na migração de neutrófilos para o peritônio inflamado induzido por baixas doses de carragenina, LPS ou N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP). A inibição ou ausência da iNOS promoveu, ainda, aumento do comportamento *rolling* e aderência de leucócitos ao endotélio, os quais foram revertidos pela administração de L-arginina (SECCO *et al.*, 2004). Estudos subseqüentes mostraram que existe relação entre o NO e a ICAM-1 no controle da migração celular. Em animais *knockout* para a molécula de adesão, não ocorre o aumento de *rolling*, aderência e migração de células para o foco de lesão na vigência de tratamento com inibidores das NOS (DAL SECCO *et al.*, 2006).

Outras abordagens experimentais têm mostrado que o NO participa da ação antiinflamatória da IL-2. Em camundongos inflamados pela carragenina, a inibição da iNOS reverteu a capacidade da IL-2 sistêmica reduzir a migração de leucócitos para o foco de lesão (MORENO *et al.*, 2006).

Em conjunto, os dados apresentados acima, obtidos em diferentes modelos de inflamação, usando tratamentos farmacológicos ou modificações genéticas para inibição ou depleção das NOS, sugerem que o NO produzido tanto pela iNOS como pelas cNOS controlam negativamente a migração leucocitária, pela produção de NO que exerce papel inibitório sobre o processo.

Por outro lado, uma série de trabalhos tem sugerido o papel pró-inflamatório do NO, proveniente da ação das diferentes isoformas enzimáticas. Alguns autores têm mostrado que o tratamento agudo com inibidores não específicos das NOS reduz a infiltração de células para o foco inflamatório e a síntese de TNF- α e prostaglandina E₂ (PGE₂) no exsudato inflamatório em modelos experimentais de pleurisia e edema de pata induzidos por carragenina (SALVEMINI *et al.*, 1996; MARZOCCO *et al.* 2004).

Utilizando o modelo de isquemia e reperusão no pulmão, KAMINSKI *et al.* (2004) demonstraram o papel pró-inflamatório do NO proveniente da eNOS, uma vez que camundongos selvagens apresentaram aumento no recrutamento leucocitário e elevados níveis de RNAm para VCAM quando comparados aos deficientes de eNOS. Da mesma forma, o papel pró-inflamatório do NO proveniente da iNOS também tem sido mostrado. O tratamento agudo de camundongos com aminoguanidina, imediatamente antes da indução de endotoxemia, diminuiu o recrutamento de neutrófilos para o peritônio, mas não afetou a produção de TNF- α e IL-1 β no exsudato inflamatório (TAVARES-MURTA *et al.*, 2001). Nesta mesma linha de evidências, animais *knockout* para iNOS apresentaram migração de leucócitos reduzida para o coração de animais com septicemia (CUENCA *et al.*, 2006). Recentemente, o efeito pró-inflamatório do NO foi corroborado na inflamação pulmonar induzida por HMGB1, uma classe de proteínas com capacidade de causar dano ao DNA e com ação semelhante às citocinas pró-inflamatórias. Nestes animais, o tratamento com 1400W ou cloreto de gadolínio, ambos inibidores específicos da iNOS, reduziram significativamente a migração celular quando comparada com animais não tratados com os inibidores (REN *et al.*, 2006; PARRISH & ULLOA, 2007).

Os dados aqui apresentados evidenciam a complexidade do envolvimento do NO no recrutamento leucocitário e sugerem que o NO proveniente das NOS constitutivas ou induzida pode apresentar papéis pró ou antiinflamatório neste processo.

1.4 Óxido Nítrico e Mediadores Inflamatórios

Como já salientado anteriormente, a geração/produção/secreção de mediadores inflamatórios por células competentes ocorre durante a inflamação e a ação destes medeia especificamente etapas do processo. Desta forma como o NO modula o recrutamento celular é possível inferir suas ações sobre mediadores inflamatórios.

Neste sentido, foi demonstrado recentemente por CAVRIANI *et al.* (2007), que a inibição não específica da síntese de NO aumenta as concentrações séricas de IL-1 β em animais submetidos à injúria e reperfusão. CHU *et al.* (2006) também já haviam demonstrado que em ratos com falência hepática, o tratamento prévio com L-NAME acarretou elevação nas concentrações plasmáticas de TNF- α , sugerindo que o efeito antiinflamatório do NO possa envolver a secreção de mediadores químicos.

No entanto, os trabalhos do nosso grupo que sugerem o papel do NO como pró-inflamatório, por meio de tratamento com L-NAME por período prolongado de tempo, mostram que a concentração de PGE₂, tromboxano B₂ (TXB₂) e IL-1 está reduzida na cavidade articular de coelhos inflamada por imuno-antígenos (MELLO *et al.*, 1997; PALÁCIOS *et al.*, 1999). Da mesma forma, outros autores mostraram diminuição nas concentrações de citocinas TNF- α e IL-1 nos exsudatos inflamatórios em ratos tratados com L-NAME (SALVEMINI *et al.*, 1996; MARZOCCO *et al.* 2004). Adicionalmente, mostramos em nosso modelo de inibição não específica e por tempo prolongado das NOS, que existe uma relação entre bradicinina, NO e PGE₂. A inibição da síntese de NO, bem como o bloqueio de receptor B2 da bradicinina reduziram a concentração de PGE₂ no exsudato inflamatório de ratos (MELLO *et al.*, 2002).

Realmente, estes dados corroboram a literatura sobre a relação entre as NOS e as ciclooxigenases, bem como da modulação da iNOS por eicosanóides endógenos. PAYA *et al.* (1997), empregando o modelo de inflamação na bolsa de ar, demonstraram aumento na concentração de PGE₂ no exsudato inflamatório quando a expressão de iNOS é reduzida. Os efeitos do NO na

geração de mediadores lipídicos também foram demonstrados por BROCK *et al.* (2003), quando verificaram que doadores de NO reduzem as concentrações de LTB₄ no sobrenadante de macrófagos peritoneais de ratos expostos por período prolongado de tempo ao LPS. Este efeito foi revertido pela inibição da iNOS.

De acordo com a literatura exposta, não faltam indícios da inter-relação entre o NO e mediadores químicos na resposta inflamatória. No entanto, os dados são controversos.

1.5 L-NAME

Inibidores e/ou doadores de NO e animais geneticamente modificados são ferramentas amplamente empregadas em estudos experimentais para verificar a influência do NO na resposta inflamatória. O N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) tem sido empregado em nossos estudos que verificam o papel do NO na resposta inflamatória.

O L-NAME é um cristal branco, solúvel em água, com peso molecular de 269,688g/L que apresenta baixa constante de ionização em meios aquosos (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/N5751>). É um análogo da L-arginina que inibe, de maneira competitiva e não específica, as diferentes isoformas de NOS (MOORE *et al.*, 1990; KLATT *et al.*, 1994; HOBBS, HIGGS e MONCADA, 1999). Sua ação é parcialmente dependente da hidrólise por esterases celulares, que resulta na formação do metabólito ativo L-nitro-arginina (L-NA), como descrito na Figura 3 (HOBBS, HIGGS e MONCADA, 1999). Ambos, L-NAME e L-NA são efetivos na inibição das NOS, diferindo na capacidade de associação e dissociação às mesmas (KLATT *et al.*, 1994).

Figura 3 Bioativação celular do L-NAME.

Devido à presença de esterases nos leucócitos circulantes, o metabolismo do L-NAME no sangue total de humanos é acelerado e o tempo de meia vida é de aproximadamente 30 minutos. A meia vida do L-NAME no plasma é de aproximadamente 4 horas (PFEIFFER *et al.*, 1996). Em ratos as concentrações de L-NA são semelhantes no plasma e sangue total e pequenas quantidades de L-NA podem estar ligadas a proteínas. O L-NAME é bem distribuído nos tecidos extravasculares (TABRIZI-FARD & FUNG, 1994). Em decorrência da hidrólise, a medida que o tempo passa as concentrações de L-NAME decrescem e as concentrações do seu metabólito ativo, o L-NA, aumentam. A meia vida do L-NA é de aproximadamente 20 horas (TABRIZI-FARD & FUNG, 1994).

1.6 Dados que conduziram o desenvolvimento deste trabalho

Nosso grupo de pesquisa vem demonstrando que a inibição não específica da síntese de NO por período prolongado de tempo (L-NAME; 20mg/kg/dia; v.o.; 14 dias) reduz o aumento de permeabilidade vascular e a migração de neutrófilos para o foco de lesão em diferentes modelos de inflamação em ratos e coelhos, conferindo um papel pró-inflamatório para este mediador (MELLO *et al.*, 1997; PALÁCIOS *et al.*, 1999; GUZZO *et al.*, 2000; MELLO *et al.*, 2002; FARSKY *et al.*, 2004). Os efeitos parecem não ser dependentes de alterações pressóricas sistêmica e microvascular, uma vez que

as inibições sobre a permeabilidade vascular e o recrutamento leucocitário não foram completamente revertidos pela administração de losartan, um agente anti-hipertensivo, e o fluxo sanguíneo na microcirculação não foi modificada pelo tratamento com L-NAME (PALÀCIOS *et al.*, 1999; FARSKY *et al.*, 2004). Adicionalmente, verificamos que a inibição do recrutamento leucocitário em ratos é dependente, pelo menos em parte, da redução dos fenômenos de interação leucócito-endotélio, pela observação da diminuição no número de leucócitos *rollers* e aderidos no leito microvascular mesentérico de animais tratados com L-NAME (FARSKY *et al.*, 2004). A investigação dos mecanismos envolvidos mostrou, até o momento, que este tratamento inibe a expressão de L-selectina em leucócitos circulantes e da medula óssea, mas não interfere na expressão da β_2 integrina (FARSKY *et al.*, 2004). Ainda, dados do grupo sugeriam que modificações na secreção de mediadores inflamatórios possam estar envolvidas no efeito pró-inflamatório do NO. O tratamento com L-NAME reduziu as concentrações dos mediadores pró-inflamatórios IL-1, TXB₂ e PGE₂ no líquido sinovial de coelhos com artrite induzida por albumina bovina ou por veneno de serpentes *Bothrops jararaca* (MELLO *et al.*, 1997; 2002). Aparentemente, o tratamento com L-NAME por nós preconizado não bloqueia completamente as NOS, uma vez que as concentrações de metabólitos do NO estavam 50% reduzidos no exsudato inflamatório e na circulação (GUZZO *et al.*, 2000).

Este trabalho visou complementar os mecanismos envolvidos nos efeitos antiinflamatórios desencadeados pela inibição crônica da síntese de NO.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho foi investigar os efeitos do tratamento com L-NAME por período prolongado de tempo (14 dias) sobre a migração de células para o foco inflamatório, evocado pelo LPS, bem como os mecanismos envolvidos nestes processos.

Usando ratos Wistar machos como modelo experimental, caracterizamos a eficácia do tratamento com L-NAME sobre a atividade das NOS; as concentrações de NO no sangue circulante e nos exsudatos inflamatórios; as expressões de moléculas de adesão envolvidas na interação leucócito-endotélio e as habilidades de leucócitos secretarem mediadores inflamatórios.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Ratos Wistar machos, com peso entre 180-220g, foram obtidos no Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em condições normais de biotério até o início dos experimentos. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Antes dos experimentos relatados a seguir, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (65mg/kg; i.p.; Cristália).

3.2 Tratamentos Farmacológicos

Grupos de animais foram tratados com L-NAME durante 14 dias antes dos procedimentos experimentais, na dose de aproximadamente 20mg/kg de peso, que foi administrado na água dos bebedouros. Grupos de animais controle, que receberam pela mesma via, água, foram mantidos em iguais condições de biotério. Foram mantidos 3 animais por caixa e o L-NAME foi dissolvido diariamente em volume de 150 a 200 mL de água. Esta quantidade de solução é suficiente para manter os animais por 24 horas em nossas condições de biotério.

Todos os ensaios, com exceção da obtenção de macrófagos após injeção de tioglicolato, foram realizados no 14^o dia de tratamento, sempre às 9 horas da manhã. No ensaio onde o recrutamento de macrófagos foi induzido pelo tioglicolato, este agente foi injetado no décimo dia de tratamento e a coleta das células realizada no 14^o dia (ver item 3.3.6).

Nos ensaios que induzimos resposta inflamatória *in vivo* ou *in vitro*, o agente empregado foi o LPS de *Escherichia coli*, sorotipo 026:B6 (Sigma).

3.3 Isolamento dos Diferentes Tecidos e Células

3.3.1 Isolamento do Tecido Encefálico

O encéfalo foi isolado de animais controles e tratados com L-NAME para determinar a atividade das NOS totais, dependentes e independente de Ca^{+2} e verificar a efetividade do tratamento com L-NAME. De maneira simplificada, os animais foram anestesiados e após manipulação cirúrgica o encéfalo foi removido. As amostras encefálicas foram imediatamente processadas como descrito no item 3.5.

3.3.2 Isolamento do Músculo Cremaster

O músculo cremaster foi empregado para verificar os efeitos do tratamento com L-NAME sobre a expressão de moléculas de adesão. Animais controles ou tratados com L-NAME foram anestesiados e após incisão cirúrgica na bolsa escrotal, o músculo cremaster foi removido. O tecido foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e mantido a -80°C até o momento do ensaio. O músculo cremaster foi removido de ambos os grupos na vigência ou não de resposta inflamatória induzida pelo LPS. Este agente foi injetado via i.p. (5mg/kg) e o músculo cremaster foi coletado 4 horas após.

3.3.3 Obtenção de Leucócitos Circulantes

Os animais foram anestesiados e 5mL de sangue heparinizado (Liquemine[®], Roche, 50UI) foram obtidos da aorta abdominal. Em seguida, os eritrócitos foram lisados com solução de NH_4Cl (0,13M) e os leucócitos circulantes foram isolados por centrifugação (600G, 10 minutos, 4°C). A quantificação total e diferencial foi realizada em câmara de Neubauer e em esfregaços corados com May-Grunwald Giemsa, respectivamente.

3.3.4 Obtenção de Neutrófilos Migrados para o Peritônio

Os animais foram anestesiados e 10mL de solução de glicogênio de ostra 1% foram injetados na cavidade peritoneal para estimular o recrutamento de neutrófilos. Após 4 horas, os animais foram novamente anestesiados e exsanguinados pela secção da artéria carótida. 10mL de solução tampão fosfato (PBS: NaCl 125 mM, KCl 5 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, NaH₂PO₄ 2mM) foram injetados na cavidade abdominal. Após suave massagem, a cavidade abdominal foi aberta cirurgicamente, e as células presentes foram removidas com auxílio de pipeta *Pasteur*. A quantificação total e diferencial foi realizada em câmara de Neubauer e em esfregaços corados com May-Grunvald Giemsa, respectivamente.

3.3.5 Obtenção de Macrófagos Residentes do Peritônio

Os animais foram anestesiados e exsanguinados pela secção da artéria carótida. 10mL de solução de PBS foram injetados na cavidade abdominal. Após uma suave massagem a cavidade abdominal foi aberta cirurgicamente e as células residentes foram removidas com auxílio de pipeta *Pasteur*.

A quantificação total e diferencial foi realizada em câmara de Neubauer e em esfregaços corados com May-Grunvald Giemsa, respectivamente.

3.3.6 Obtenção de Macrófagos Migrados para o Peritônio

No décimo dia de tratamento, os animais receberam 3mL de tioglicolato (4%; i.p.) para estimular o recrutamento dos macrófagos. No décimo quarto dia de tratamento, os animais foram anestesiados e exsanguinados pela secção da artéria carótida. 10mL de solução de PBS foram injetados na cavidade abdominal. Após uma suave massagem a cavidade abdominal foi aberta cirurgicamente e as células residentes foram removidas com auxílio de pipeta *Pasteur*.

A quantificação total e diferencial foi realizada em câmara de Neubauer e em esfregaços corados com May-Grunvald Giemsa, respectivamente.

3.3.7 Cultura de Leucócitos

Leucócitos totais (1×10^6 células) isolados do sangue circulante, neutrófilos migrados para o peritônio (1×10^6 células) foram cultivados em 500µL de meio RPMI com 10% de soro fetal bovino (SFB), na presença ou ausência de LPS (5µg/mL) por 18 horas (37°C, 5% CO₂ em atmosfera úmida). Após o período de incubação, as culturas de células foram centrifugadas (500g, 10 minutos, 4 °C) e os sobrenadantes foram armazenados a -20 °C até o momento do ensaio.

Macrófagos (1×10^5 células) residentes ou migrados (1×10^6 células) para o peritônio foram inicialmente isolados dos demais leucócitos mononucleares presentes na cavidade. Inicialmente, para a aderência dos macrófagos, as células obtidas do peritônio foram transferidas para tubos de vidro contendo 500µL de meio RPMI com 10% de SFB, e mantidas a 37°C, 5% CO₂ em atmosfera úmida, durante 3 horas. Após este período, o meio de cultura foi removido e as células aderidas foram lavadas com PBS estéril. Em seguida, os macrófagos foram cultivados em 500µL de meio RPMI com 10% de soro fetal bovino, na presença ou ausência de LPS (5µg/mL) por 18 horas (37°C, 5% CO₂ em atmosfera úmida). Após o período de incubação, os sobrenadantes foram armazenados a -20 °C até o momento do ensaio.

A viabilidade celular foi avaliada pelo corante *Trypan blue* antes e após os tratamentos *in vitro*.

3.4 Determinação de NO

3.4.1 Quimioluminescência

A concentração de NO foi determinada em amostras de plasma utilizando NO· Analyzer (NOA™ 280, Sievers'Inc, USA). As amostras foram previamente desproteinizadas em etanol gelado (1:2 v/v), mantidas em gelo por 30 minutos e centrifugadas a 100g por 10 minutos. Uma alíquota de 10 µL da amostra desproteinizada foi injetada no equipamento. Basicamente, o nitrito (NO₂⁻) e o nitrato (NO₃⁻) presente nas amostras foram reduzidos a NO com cloreto de

vanádio a 90°C e o NO gerado foi detectado por quimiluminescência em fase gasosa após reação com ozônio. A curva de calibração foi construída com soluções padrão de nitrato de sódio (NaNO_3).

3.4.2 Reação de Griess

A concentração de NO_2^- foi determinada no sobrenadante das culturas celulares utilizando a reação de Griess. Em resumo, 100µL dos sobrenadantes das culturas celulares foram adicionados a 100µL do reagente de Griess (1% de sulfanilamida com 0,1% de α -naftil etilenodiamina, preparado no momento do uso). Após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente, a absorbância de cada amostra foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 550nm. A concentração de NO_2^- das amostras foi determinada a partir de uma curva padrão de NaNO_2 .

3.5 Atividade das NOS ex-vivo

Amostras de cérebro total foram pesadas e homogeneizadas em 5 volumes de tampão de incubação (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4) contendo 1 mM de PMSF (*phenylmethylsulphonyl fluoride*) e 1 mM de L-citrulina. 50 µL do homogenato foram incubados na presença de NADPH (1 mM), CaCl_2 (2 mM) e 10 µM de L-arginina contendo 100.000 cpm de $[2,3,4,5\text{-}^3\text{H}]$ L-arginina mono hidrocloreto em um volume final de 100 µL a temperatura ambiente (25 - 27°C) durante 30 minutos, em duplicata. Todos os reagentes foram preparados em tampão de incubação (sem PMSF e L-citrulina). Após este período, a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de tampão HEPES 20 mM, pH 5.4, contendo 1mM de EGTA e 1 mM de EDTA. Os tubos foram centrifugados (5 minutos, 10.000 rpm) e os sobrenadantes aplicados em colunas contendo 0,6 mL de resina de troca iônica (tipo aniônica forte, Dowex AG 50X-8). Os eluatos foram recolhidos em viais de cintilação. As colunas foram lavadas com 1 mL adicional de tampão HEPES e os eluatos foram misturados aos anteriores. Após a adição de 10 mL de líquido de cintilação a radioatividade foi medida durante 1 min em

espectrômetro de cintilação. As contagens foram corrigidas por subtração do “branco” (onde o homogenato de tecido foi adicionado após o tampão HEPES). Para o cálculo das atividades enzimáticas, as contagens (dpm) foram relacionadas à atividade total (os conteúdos destes tubos receberam [2,3,4,5-³H]L-arginina mono hidrocloreto diretamente nos vials de cintilação) pela fórmula:

$$\text{pmol L-cit/min} = 1000 \times (\text{dpm amostra} - \text{dpm branco}) / \text{cpm totais} / 30$$

onde 1000 é a quantidade de L-arginina adicionada à mistura de incubação (em pmols) e 30 é o tempo de incubação (em minutos).

Em cada ensaio foram realizados, em paralelo, controles farmacológicos da atividade enzimática que consistem na omissão do CaCl₂ e na adição de 1 mM de EGTA no meio de incubação (a fim de caracterizar o tipo de NOS) e na adição de 1 mM de L-NAME.

O conteúdo de proteínas foi determinado pelo método de Bradford (1976) utilizando-se kit comercial (Bio Rad, EUA). A atividade da NOS foi expressa como pmols de L-citrulina produzidos por minuto e por mg de proteína.

Os reagentes empregados nestes ensaios foram obtidos da Sigma-Aldrich.

3.6 Determinação da Expressão de Moléculas de Adesão

3.6.1 Ensaios de Imunohistoquímica

A técnica de imunohistoquímica foi escolhida para avaliar as expressões de E- e P-selectina, VAP-1, ICAM-1, VCAM-1 e PECAM-1, presentes nas células endoteliais do músculo cremaster ou de VAP-1 nos sinusóides hepáticos.

Após anestesia, os testículos envolvidos pelo músculo cremaster e um fragmento do fígado dos animais, foram removidos e imediatamente inseridos em hexano imerso em gelo seco para congelamento gradativo. Após o congelamento os testículos ou os fragmentos dos fígados foram cortados em criostato a -25°C (Leika Microsystem). Os cortes foram realizados na espessura de 8 µm e depositados em lâminas silanizadas. Em seguida, as lâminas foram

colocadas em acetona gelada para fixação durante 10 minutos a -25°C. Os cortes foram armazenados a -20°C até o momento do ensaio.

Técnicas distintas de imunohistoquímica foram empregadas de acordo com os anticorpos utilizados. Para as moléculas de adesão PECAM-1, ICAM-1 e VCAM-1 foram realizadas marcações fluorescentes, uma vez que o anticorpo anti-PECAM-1 estava marcado com ficoeritrina (PE; BD PharMingen; 5550027) e os anticorpos anti-ICAM-1 e anti-VCAM-1 estavam marcados com isotiocianato de fluorsceína (FITC; BD PharMingen; 1700-02 e 559229, respectivamente). Para tanto, os cortes histológicos de testículos foram lavados em PBS (3 vezes, 10 minutos) e em seguida os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução de bloqueio (SuperBlock[®] Blocking Buffer in TBS; PIERCE; 37535) *overnight* em câmara úmida a 4°C. No dia seguinte, a solução de bloqueio foi removida e os cortes histológicos foram incubados com os anticorpos para PECAM-PE (1:500), ICAM-1-FITC (1:50) ou VCAM-1-FITC (1:100), em câmara úmida, 4°C, *overnight*. As lâminas foram novamente lavadas em PBS (3 vezes, 10 minutos) para remoção dos anticorpos. A leitura das lâminas foi realizada imediatamente após o término da reação em microscopia de fluorescência. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de acordo com a intensidade de fluorescência.

Para avaliar a expressão das moléculas de adesão P-selectina, E-selectina e VAP-1 foram realizadas ensaios colorimétricos com marcações com dietilaminobenzidina (DAB). Os cortes histológicos (testículos ou fígados) foram lavados em PBS (3 vezes; 10 minutos). Em seguida, as lâminas foram incubadas com peróxido de hidrogênio a 3% e solução de bloqueio para bloquear a atividade da peroxidase e biotina endógenas, respectivamente. Um bloqueio adicional de sítios não-específicos foi realizado com soro de cabra a 50%. Posteriormente, as lâminas foram incubadas *overnight* a 4°C com os anticorpos primários para P-selectina (1:100; BD PharMingen; 553716), E-selectina (1:100; RD Systems; AF 977) ou VAP (50µg/mL; gentilmente doado pelo laboratório de pesquisa da Prof. Dra. Sirpa Jalkanen, Turku, Finlândia), respectivamente. Em seguida, as lâminas foram incubadas por 60 minutos com

anticorpo secundário conjugado com biotina e estreptavidina conjugada a peroxidase na diluição de 1:1000. A coloração correspondente à marcação foi revelada pela adição DAB. Após a reação, as lâminas foram coradas com hematoxilina e desidratadas com álcool e xilol. A análise comparativa e a quantificação das moléculas de adesão foram realizadas em microscópio (Carl-Zeiss ; Axioplan II, equipado com objetivas Plan-Neofluar/aberturas numéricas x 5.0/0.30 ou x 10/0.25 e optovar de 1.0, 1.25 ou 1.60). As imagens foram capturadas por uma câmera de vídeo (Carl-Zeiss; ZVS, 3C75DE) associada a computador com programa de análise de imagem (KS300, Carl-Zeiss). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de acordo com a intensidade de cor.

As amostras teciduais foram coletadas na ausência ou 4 horas após a administração i.p. de 5mg/kg de LPS.

3.6.2 Ensaios de Citometria de Fluxo

Os leucócitos foram isolados do sangue coletado do plexo ocular para quantificar a expressão de L-selectina e β_2 -integrina por citometria de fluxo. O sangue foi coletado usando solução de EDTA 2%. Os eritrócitos foram lisados com solução de cloreto de amônio (0,13M) e os leucócitos foram lavados com solução balanceada de Hank's (HBSS). Em seguida, leucócitos (1×10^6) foram incubados com 10 μ L de anticorpo anti-L-selectina (BD PharMingen; 554963) ou anti- β_2 -integrina (BD PharMingen; 557949), ambos conjugados ao FITC, a 4°C durante 20 minutos. Após este período, foram adicionados a cada tubo 100 μ L de solução de paraformaldeído 0,1%. A leitura foi realizada em FACScalibur (Becton and Dickinson). Os dados de 10.000 células foram obtidos e somente os leucócitos morfolologicamente viáveis foram considerados para análise.

As amostras de sangue foram coletadas na ausência ou 4 horas após a administração i.p. de 5mg/kg de LPS.

3.6.3 Determinação da Expressão Gênica da L-selectina e PECAM-1 nos Leucócitos Circulantes e PECAM-1 no Músculo Cremaster

As expressões do RNAm para L-selectina e PECAM-1 foram determinadas por reação de polimerização em cadeia (PCR) em leucócitos circulantes e no músculo cremaster. O RNA total foi isolado com o reagente TRizol[®] (Invitrogen, USA), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Em resumo, a transcrição reversa foi realizada utilizando 2µg de RNA e uma mistura dos seguintes reagentes: 20µg/mL de oligo(dT)₁₅, 200 U de transcriptase reversa de M-MLV (20mM de Tris-HCl, pH 7.5, 200mM NaCl, 0,1mM EDTA, 1mMDTT, 0,01% Nonidet[®] P-40 e 50% de glicerol), tampão de reação 5× (50mM Tris-HCl, pH 8.3, 75mM KCl, 3mM MgCl₂ e 2mM de DDT), 2mM dNTP em um volume final de 25µL. A reação foi incubada por 5 minutos a 70°C, seguido por aquecimento a 42°C por 60 minutos. O cDNA foi armazenado a -20°C até a realização da reação de PCR.

Para a realização do PCR, 2,5µL de cDNA foram incubados com 2,5 U de Taq DNA Polimerase, 0,4 µM de 3'- e 5'- *primers* específicos e 200 µM de mistura de dNTP em tampão termofílico 5x (pH 8.5) para DNA polimerase contendo 1,5 mM de MgCl₂. As seguintes seqüências de *primers* foram utilizadas: GAPDH, 5'-TATGATGACATCAAGAAGGTGG-3'(sense) and 5'-CACCACCCTGTTGCTGTA-3' (antisense), L-selectina, 5'-AACGAGACTCTGGGAAGT-3' (sense) and 5'-CAAAGGCTCACATTGGAT-3' (antisense), e PECAM-1, 5'-TCTCCATCCTGTCTGGGTAACG-3' (sense) and 5'-CTTGGGTGTCATTACGGTTTC-3' (antisense).

Os reagentes empregados na síntese do cDNA e na reação de PCR foram obtidos da Promega Corporation, Madison, WI, USA.

3.7 Determinação da Atividade Enzimática da VAP-1

A atividade enzimática da VAP-1 foi determinada nos mesmos tecidos onde estudamos a expressão da molécula, ou seja, fígado e músculo cremaster. A atividade da VAP-1 foi determinada nos tecidos obtidos de animais controles e

tratados com L-NAME na ausência ou 4 horas após a injeção de LPS (5mg/kg; i.p.). Em resumo, no décimo quarto dia de tratamento os animais foram anestesiados e exsanguinados pela secção da artéria carótida. Em seguida, foram removidos parte do fígado e parte do músculo cremaster. Os tecidos foram homogeneizados em solução de 1mM KH_2PO_4 contendo 250mM de sucrose, pH 7.2. Os homogenatos foram centrifugados durante 10 minutos, 3.500G, 4° C. Os sobrenadantes foram armazenados a -80° C e uma alíquota foi utilizada para quantificar proteínas segundo método de Bradford (1976). 10µg de proteínas foram incubadas por 30 minutos a 37°C na ausência ou presença de 500µM de semicarbazida (inibidor SSAO). Após este período, todas as amostras foram incubadas com 10mM benzilamina, 10mM pargilina, 1mM Amplex Red, 1000UI/mL *horseradish peroxidase* (HRP), num volume final de reação de 200µL. As amostras foram novamente incubadas por 30 minutos a 37°C. A curva padrão foi construída com diferentes concentrações de H_2O_2 . A leitura da fluorescência foi determinada em espectrofotômetro com excitação de 545nm e emissão de 590nm. Os resultados foram expressos em nmol de H_2O_2 /h/mg de proteína e, posteriormente, convertidos para porcentagem de atividade da VAP-1 em relação a atividade total das monoamino-oxidases.

Os reagentes empregados nestes ensaios foram obtidos da Sigma-Aldrich.

3.8 Quantificação da Concentração de Citocinas Pró e Antiinflamatórias

As citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α e antiinflamatória IL-10 foram quantificadas no soro de animais controle ou tratados com L-NAME que receberam ou não a injeção i.p. de LPS (5mg/kg; i.p.; 4hs). Adicionalmente, as mesmas citocinas foram também quantificadas nos sobrenadantes de culturas de leucócitos totais, neutrófilos migrados para o peritônio, macrófagos residentes ou migrados pela ação do tioglicolato na ausência ou presença de LPS (5µg/mL; 18h). A quantificação da concentração destas citocinas foi realizada por ELISA, utilizando kits comerciais e de acordo com a metodologia fornecida pelo fabricante destes kits. Os protocolos de ensaios podem ser checados no *site* da BD Biosciences, www.bdbiosciences.com, pelos respectivos números de

catálogo para TNF- α (558870), IL-6 (550319) e IL-10 (555134) e para IL-1 β (DY501) no *site* da RD Systems, www.rndsystems.com.

3.9 Quantificação de Leucotrieno B₄ (LTB₄)

LTB₄ foi determinado no sobrenadante de leucócitos ou neutrófilos migrados para o peritônio em cultura, na ausência ou presença de LPS (5 μ g/mL). O eicosanóide foi quantificado por ELISA, de acordo com a metodologia fornecida pelo fabricante do kit. O protocolo de ensaio pode ser conferido no *site* do fabricante GE Life Sciences, www.gelifesciences.com, pelo respectivo número de catálogo RPN 22310.

3.10 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram apresentados como média $\pm$ e.p.m. e foram analisados estatisticamente pelo Teste “t” de student ou pela Análise de Variância com comparações múltiplas (ANOVA), seguido do teste de Tukey-Kramer, quando necessário.

Foram empregados os programas de análise estatística *GraphPrism* e *Origin*. Este último foi empregado para construção das curvas de calibração e cálculo da equação da reta nos ensaios em que esta era requerida.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Efeito do Tratamento com L-NAME Sobre a Atividade Enzimática das NOS

A eficácia do tratamento com L-NAME foi avaliada pelas determinações das atividades das NOS totais, dependentes e independente de Ca^{+2} (Figura 4). O cérebro dos animais foi removido e o homogenato deste tecido foi empregado na determinação das atividades das NOS, pela quantificação da concentração de L-citrulina gerada por mg de proteína, empregando a técnica de radioimunoensaio. Os resultados mostraram que a atividade das NOS totais estava reduzida no tecido obtido de animais tratados com L-NAME (Figura 4A). Este valor refletiu a redução da atividade das NOS dependentes de Ca^{+2} , uma vez que suas atividades foram menores em animais tratados com L-NAME (Figura 4B). A atividade da NOS independente de Ca^{+2} não diferiu entre os animais controles e tratados com L-NAME (Figura 4C).

Para avaliar a eficácia do tratamento com L-NAME na vigência de uma resposta inflamatória, a atividade das NOS foi determinada em homogenato de cérebro obtidos 4hs após a injeção de LPS (5mg/kg; i.p.). Como observado em animais não inflamados, os resultados obtidos mostraram que a atividade das NOS totais estavam inibidas nos tecidos obtidos de animais tratados com L-NAME e inflamados com LPS (Figura 5A). O mesmo efeito foi observado na atividade das NOS dependentes de Ca^{+2} (Figura 5B). Surpreendentemente, não foram detectadas alterações na atividade da NOS independente de Ca^{+2} (Tabela 1).

Figura 4 Efeito do tratamento com L-NAME sobre as atividades das NOS na ausência de estimulação.

O cérebro foi coletado de animais controles ou tratados com L-NAME (20mg/kg; v.o.; 14 dias) e os respectivos homogenatos foram empregados nas determinações da atividade enzimática das NOS, por radioimunoensaio. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m dos valores obtidos para a atividade das NOS totais **(A)**, das NOS dependentes de Ca^{+2} **(B)** e da NOS independente de Ca^{+2} **(C)** nas amostras de cérebro obtidas de 3 a 5 animais por grupo. *** $P < 0,001$ vs. respectivos controles.

Figura 5 Efeito do tratamento com L-NAME sobre as atividades das NOS dependentes de Ca^{+2} após estimulação com LPS.

O cérebro foi coletado de animais controles ou tratados com L-NAME (20mg/kg; v.o.; 14 dias) e os respectivos homogenatos foram empregados nas determinações da atividade enzimática das NOS, por radioimunoensaio. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m dos valores obtidos para a atividade das NOS totais (**A**), das NOS dependentes de Ca^{+2} (**B**) nas amostras de cérebro obtidas de 3 a 5 animais por grupo. ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ vs. respectivos controles.

	Controle	L-NAME
Atividade da NOS independente de Ca^{+2}	0.25 ± 0.24 (N=3)	Indetectável

Tabela 1 Efeito do tratamento com L-NAME sobre a atividade da NOS independente de Ca^{+2} após a estimulação com LPS.

O cérebro foi coletado de animais controles ou tratados com L-NAME (20mg/kg; v.o.; 14 dias) e os respectivos homogenatos foram empregados nas determinações da atividade enzimática das NOS, por radioimunoensaio. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m dos valores obtidos para a atividade da NOS independente de Ca^{+2} nas amostras de cérebro obtidas de 3 a 5 animais por grupo.

4.2 Efeito do Tratamento com L-NAME Sobre as Concentrações dos Produtos do NO no Exsudato Inflamatório e no Plasma

Para avaliar os efeitos do tratamento com L-NAME na produção de NO, as concentrações dos seus produtos, nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), foram determinadas no exsudato inflamatório e no plasma de animais controles ou tratados com L-NAME, por reação de Griess e quimiluminescência, respectivamente. Os resultados obtidos mostraram que animais tratados com L-NAME apresentaram menores concentrações de NO_2^- no exsudato inflamatório coletado 4 horas após a administração de LPS (5mg/Kg; i.p.; Figura 6A). O tratamento com L-NAME reduziu as concentrações plasmáticas de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ na ausência de indução de resposta inflamatória (50%). Após estimulação pelo LPS (5mg/Kg; 4 horas; i.p.) foi detectado um aumento significativo nas concentrações de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ no plasma obtido de animais controles, o que não foi observado em animais tratados com L-NAME (Figura 6B).

Figura 6 Efeito do tratamento com L-NAME sobre as concentrações de NO no exsudato inflamatório e no plasma.

O exsudato inflamatório foi coletado da cavidade peritoneal de animais controles e tratados com L-NAME (20mg/kg; v.o.; 14 dias) 4 horas após a injeção de LPS (5mg/kg). O plasma foi coletado de ambos os grupos na ausência (LPS (-)) ou na presença de LPS (5mg/kg; 4h; (LPS (+))). O exsudato inflamatório e o plasma foram empregados nas determinações de NO, por reação de Griess e quimiluminescência, respectivamente. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m dos valores obtidos nas determinações de NO₂⁻, no exsudato inflamatório **(A)**, e NO₂⁻/NO₃⁻, no plasma **(B)**, obtidos de 5 animais em cada grupo. * $P < 0,05$ e # $P < 0,001$ em relação ao respectivo controle e *** $P < 0,001$ em relação ao respectivo valor no grupo LPS (-).

4.3 Caracterização do Efeito do Tratamento com L-NAME Sobre a Peritonite Induzida pelo LPS

Ensaio de migração celular foram realizados para caracterizar os efeitos do tratamento com L-NAME na mobilização leucocitária induzida pelo LPS (5mg/kg; i.p.; Figura 7). O tratamento com L-NAME reduziu significativamente a migração de leucócitos para o peritônio (Figura 7A). Este efeito foi causado pela redução de leucócitos PMN e de leucócitos mononucleares (MN; Figura 7B). É importante ressaltar que em na ausência de inflamação, os números de leucócitos residentes do peritônio são equivalentes (Animais controles: $7,98 \times 10^6 \pm 2,09$ (n=5), onde PMN compreendem $14.20\% \pm 1.56$ (n=5) e MN $85.80\% \pm 1.92$ (n=5), e Animais tratados com L-NAME: $9,05 \times 10^6 \pm 1,65$ (n=6) onde PMN compreendem $13.83\% \pm 1.20$ (n=6) e MN $86.17\% \pm 1.37$ (n=6).

Figura 7 Caracterização do efeito do tratamento com L-NAME sobre a peritonite induzida pelo LPS.

Os leucócitos foram coletados do peritônio de animais controles ou tratados com L-NAME (20mg/kg; v.o.; 14 dias) 4 horas após a injeção de LPS (5mg/kg). A quantificação foi realizada em câmara de Neubauer e em esfregaços corados com May-Grunwald Giemsa. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m do número total (A) ou diferencial (B) de leucócitos migrados para o peritônio inflamado, obtidos de 6 animais em cada grupo. * $P < 0,05$ em relação ao respectivo controle.

4.4 Efeitos do Tratamento com L-NAME Sobre a Expressão de Moléculas de Adesão

4.4.1 Expressão de L-selectina, PECAM-1 e β_2 -integrina em Leucócitos Circulantes

A expressão de L-selectina, de β_2 -integrina e de PECAM-1 foi quantificada em leucócitos circulantes por citometria de fluxo. Na tabela 2A está descrita a expressão de L-selectina de animais tratados com L-NAME em comparação com animais controles na presença ou não de LPS (5mg/kg; i.p. 4hs). Os resultados mostraram que em leucócitos totais, PMN e MN obtidos de animais tratados com L-NAME a expressão de L-selectina estava reduzida apenas na ausência de estimulação pelo LPS. Após estimulação pelo LPS não foram observadas alterações na expressão de L-selectina.

Da mesma forma que os dados encontrados para a expressão da L-selectina, a expressão da PECAM-1 estava reduzida células de animais tratados com L-NAME, que não receberam LPS. Após estimulação com LPS, a expressão de PECAM-1 em células de animais tratados com L-NAME foi equivalente à detectada em células de animais controles, mas aumentada em relação às células de animais tratados com L-NAME na ausência de LPS (Tabela 2B).

A expressão de β_2 integrina não foi alterada pelo tratamento com L-NAME, na ausência ou após estimulação pelo LPS (Tabela 2C).

A

	Expressão de L-selectina			
Tipo Celular	LPS (-)		LPS (+)	
	Controle	L-NAME	Controle	L-NAME
Leucócito Total	35,02 ± 3,55	27,24 ± 3,21*	35,33 ± 1,31	32,46 ± 1,23
MN	29,98 ± 1,34	23,84 ± 2,62*	30,81 ± 2,39	28,31 ± 0,21
PMN	78,98 ± 10,70	51,46 ± 10,86*	61,67 ± 6,31	56,05 ± 5,67

B

	Expressão de PECAM-1			
Tipo Celular	LPS (-)		LPS (+)	
	Controle	L-NAME	Controle	L-NAME
Leucócito Total	10.87 ± 0.73	6.42 ± 1.02*	14.14 ± 2.09	12.98 ± 2.64**
MN	8.25 ± 0.617	3.62 ± 1.42*	10.30 ± 1.04	10.59 ± 1.65**
PMN	15.46 ± 1.88	5.74 ± 0.82*	11.24 ± 2.05	9.74 ± 1.49**

C

	Expressão de β_2 integrina			
Tipo Celular	LPS (-)		LPS (+)	
	Controle	L-NAME	Controle	L-NAME
Leucócito Total	38,88 ± 4,28	39,63 ± 1,55	54,8 ± 4,34*	54,16 ± 1,56*
MN	31,12 ± 4,14	35,02 ± 1,46	40,59 ± 2,09*	42,77 ± 1,25*
PMN	126,5 ± 13,41	134,7 ± 10,09	160,0 ± 9,59*	156,0 ± 9,54*

Tabela 2 Efeito do tratamento com L-NAME sobre a expressão de L-selectina, PECAM-1 e β_2 integrina

Os leucócitos circulantes foram coletados da aorta abdominal de animais controles ou tratados com L-NAME (20mg/kg; v.o.; 14 dias) na ausência (LPS (-)) ou 4 horas após a estimulação pelo LPS (5mg/Kg; i.p.; LPS (+)) e empregados na determinação da expressão de L-selectina, PECAM-1 e β_2 integrina por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média ± e.p.m dos valores referentes à expressão de L-selectina **(A)**, PECAM-1 **(B)** e β_2 integrina **(C)** em leucócitos obtidos de 6 animais de cada grupo. * $P < 0,05$ vs. respectivos controles ou vs. respectivos valores no grupo LPS (-) e ** $P < 0,01$ vs. respectivos valores no grupo LPS (-).

4.4.2 Expressão de Selectinas em Células Endoteliais do Músculo Cremaster

A expressão de E- e P-selectina foi avaliada por reação de imunohistoquímica nas células endoteliais do músculo cremaster na ausência ou após estimulação pelo LPS (5mg/kg; i.p. ou *in situ*; 4 horas ou 15 minutos).

A Figura 8A mostra que a expressão da E-selectina foi similar em animais tratados com L-NAME e em controles na vigência ou ausência de LPS. Após administração de LPS, houve aumento significativo da expressão desta molécula nos dois grupos de animais estudados.

Da mesma forma, a expressão de P-selectina não foi alterada pelo tratamento com L-NAME. Valores semelhantes entre os dois grupos de animais em ambas as condições, de inflamação ou não, foram encontrados (Figura 8B).

Figura 8 Efeito do tratamento com L-NAME sobre a expressão de E- e P-selectina em células endoteliais do músculo cremaster

O músculo cremaster foi coletado de animais controles ou tratados com L-NAME (20mg/kg; v.o.; 14 dias) na ausência (LPS (-)) ou, para E-selectina, 4 horas após a estimulação pelo LPS (5mg/kg; i.p. LPS (+)) e, para P-selectina, 15 minutos após a estimulação pelo LPS (5mg/Kg; *in situ*; LPS (+)). Os tecidos foram empregados nas quantificações de E- e P-selectina por ensaios de imunohistoquímica. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m dos valores obtidos referentes à expressão de E-selectina **(A)** e de P-selectina **(B)**, na ausência ou após estimulação pelo LPS. De 3 a 6 tecidos foram coletados de cada grupo de animal. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ em relação aos respectivos valores nos grupos de animais LPS (-).

4.4.3 Expressão de Imunoglobulinas em Células Endoteliais do Músculo Cremaster

A expressão de ICAM-1, VCAM-1 e PECAM-1 foi avaliada por reação de imunohistoquímica em células endoteliais do músculo cremaster na ausência ou após estimulação pelo LPS (5mg/kg; i.p.; 4 ou 12 horas).

Os dados apresentados na Figura 9A mostram que a expressão de ICAM-1 foi semelhante nos dois grupos de animais, na ausência ou na vigência da ação do LPS. Interessantemente, não houve aumento da expressão de ICAM-1 após ação do LPS em ambos os grupos de animais estudados.

A expressão de VCAM-1 também foi equivalente em animais controles e tratados com L-NAME. Aqui, vale ressaltar, que houve aumento da expressão da molécula, de mesma magnitude, nos dois grupos de animais estudados nos tecidos obtidos 12 horas após a injeção de LPS (Figura 9B).

A Figura 10 mostra a expressão da PECAM-1 em condições basais ou 4 horas após estimulação pelo LPS (5mg/kg; i.p.). Em condições basais a expressão de PECAM-1 foi diminuída no tecido obtido de animais tratados com L-NAME em relação aos tecidos de animais controles. Ainda, em animais controles, foi observado redução da expressão de PECAM-1 4 horas após a injeção de LPS. Da mesma forma que o observado na ausência de LPS, os animais tratados com L-NAME apresentaram expressão reduzida de PECAM-1 após estimulação pelo LPS em relação à expressão em animais controles.

Figura 9 Efeito do tratamento com L-NAME sobre a expressão de ICAM-1 e VCAM-1 em células endoteliais do músculo cremaster

O músculo cremaster foi coletado de animais controles ou tratados com L-NAME (20mg/kg; v.o.; 14 dias) na ausência (LPS (-)), 4 ou 12 horas após a estimulação pelo LPS (5mg/Kg; i.p.; LPS (+)). Os tecidos foram empregados nas quantificações de ICAM-1 e VCAM-1 por ensaios de imunohistoquímica. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m dos valores obtidos referentes à expressão de ICAM-1 **(A)** e de VCAM-1 **(B)**, na ausência ou após estimulação pelo LPS. De de 3 a 6 tecidos foram coletados de cada grupo de animal. * $P < 0,05$ em relação aos respectivos valores nos grupos LPS (-).

Figura 10 Efeito do tratamento com L-NAME sobre a expressão de PECAM-1 em células endoteliais do músculo cremaster

O músculo cremaster foi coletado de animais controles ou tratados com L-NAME (20mg/kg; v.o.; 14 dias) na ausência (LPS (-)) ou 4 horas após a estimulação pelo LPS (5mg/Kg; i.p.; LPS (+)). Os tecidos foram empregados nas quantificações de PECAM-1 por ensaios de imunohistoquímica. **(A)** representa a média $\pm$ e.p.m referente à expressão de PECAM-1 nos tecidos obtidos de 3 a 6 animais por grupo; **(B)** e **(C)** representam as imagens das expressões de PECAM-1 nos vasos de tecidos obtidos de animais controles e tratados com L-NAME, respectivamente, na ausência de estímulo inflamatório; **(D)** e **(E)** representam as imagens das expressões de PECAM-1 nos vasos de tecidos obtidos de animais controles e tratados com L-NAME, respectivamente, 4 horas após estimulação pelo LPS. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ em relação aos respectivos controles; *** $P < 0,001$ em relação aos respectivos valores dos grupos LPS(-) e em relação ao respectivo controle.

4.4.4 Expressão de VAP-1 em Células Endoteliais do Músculo Cremaster e nos Sinusóides Hepáticos

A expressão de VAP-1 foi quantificada nas células endoteliais do músculo cremaster e no tecido hepático. No músculo cremaster, a expressão desta molécula foi similar em animais controles e tratados com L-NAME na ausência de estimulação com LPS. No entanto, após estimulação inflamatória (LPS; 5mg/kg; i.p.; 4 horas), o aumento de expressão induzido pelo LPS foi significativamente menor em tecido proveniente de animais tratados com L-NAME em relação aos tecidos de animais controles (Figura 11). Em animais tratados com L-NAME, não houve aumento significativo da expressão de VAP-1 após o LPS como ocorreu em animais controles.

Na Figura 12 são apresentadas as expressões da VAP-1 no tecido hepático. Os valores encontrados mostram que a expressão da molécula, na ausência de LPS, é equivalente em animais controles ou tratados com L-NAME (Figura 12A). No entanto, após estimulação com LPS, houve aumento da expressão desta molécula em relação aos animais não estimulados. O tratamento com L-NAME reduziu significativamente o efeito do LPS na expressão da VAP-1.

A

Figura 11 Efeito do tratamento com L-NAME sobre a expressão de VAP-1 em células endoteliais do músculo cremaster

O músculo cremaster foi coletado de animais controles ou tratados com L-NAME (20mg/kg; v.o.; 14 dias) na ausência (LPS (-)) ou 4 horas após a estimulação pelo LPS (5mg/Kg; i.p.; LPS (+)). Os tecidos foram empregados nas quantificações da VAP-1 por ensaios de imunohistoquímica. **(A)** representa a média $\pm$ e.p.m referente à expressão da VAP-1 nos tecidos obtidos de 3 a 6 animais por grupo; **(B)** e **(C)** representam as imagens das expressões de VAP-1 nos vasos de tecidos obtidos de animais controles e tratados com L-NAME, respectivamente, na ausência de estímulo inflamatório; **(D)** e **(E)** representam as imagens das expressões de VAP-1 nos vasos de tecidos obtidos de animais controles e tratados com L-NAME, respectivamente, 4 horas após estimulação pelo LPS. *** $P < 0,001$ em relação aos respectivo valor no grupo LPS (-); ** $P < 0,01$ em relação ao respectivo controle.

A

Figura 12 Efeito do tratamento com L-NAME sobre a expressão de VAP-1 em sinusóides hepáticos

Fragments do fígado foram coletados de animais controles ou tratados com L-NAME (20mg/kg; v.o.; 14 dias) na ausência (LPS (-)) ou 4 horas após a estimulação pelo LPS (5mg/Kg; i.p.; LPS (+)). Os tecidos foram empregados nas quantificações da VAP-1 por ensaios de imunohistoquímica. **(A)** representa a média $\pm$ e.p.m referente à expressão da VAP-1 nos tecidos obtidos de 3 a 6 animais por grupo; **(B)** e **(D)** representam as imagens da expressão de VAP-1 nos sinusóides de tecidos obtidos de animais controles e tratados com L-NAME, respectivamente, na ausência de estímulo inflamatório; **(C)** e **(E)** representam as imagens das expressões de VAP-1 nos vasos de tecidos obtidos de animais controles e tratados com L-NAME, respectivamente, 4 horas após estimulação pelo LPS. * $P < 0,05$ em relação ao respectivo valor no grupo LPS (-); ** $P < 0,01$ em relação ao respectivo controle.

4.5 Efeito do Tratamento com L-NAME Sobre a Síntese de Moléculas de Adesão nos Leucócitos e no Músculo Cremaster

4.5.1 Expressão Gênica da L-selectina e da PECAM-1 nos Leucócitos

Para investigar se a redução detectada na expressão da L-selectina e da PECAM-1 nos leucócitos circulantes eram decorrentes de alterações na síntese destas moléculas, a expressão gênica das mesmas foram determinadas por reação de PCR.

Os dados obtidos mostram que a expressão gênica da L-selectina, na ausência de LPS, estava reduzida nos leucócitos circulantes obtidos de animais tratados com L-NAME. Não foram observadas alterações no RNAm da L-selectina em leucócitos obtidos 4 horas após a inflamação com LPS em ambos os grupos de animais (Figura 13A). A Figura 13B mostra uma imagem representativa da eletroforese em gel de agarose para RNAm da L-selectina.

A Figura 14A mostra expressões similares do RNAm da PECAM-1 em células obtidas dos dois grupos de animais na ausência de estimulação com LPS. Após injeção de LPS foi verificado aumento na expressão gênica da molécula de maneira equivalente nos leucócitos obtidos de animais controles ou tratados com L-NAME. A Figura 14B mostra uma imagem representativa da eletroforese em gel de agarose para RNAm da PECAM-1.

A

B

Figura 13 Efeito do tratamento com L-NAME sobre a expressão gênica da L-selectina em leucócitos circulantes.

Os leucócitos circulantes foram coletados da aorta abdominal de animais controles ou tratados com L-NAME (20mg/kg; v.o.; 14 dias) na ausência (LPS(-)) ou 4 horas após a injeção de LPS (5mg/kg; i.p.; LPS (+)). Os leucócitos foram isolados e o RNAm foi extraído com reagente Trizol[®]. A reação de PCR foi realizada com *primer* específico para L-selectina. **(A)** expressa a média $\pm$ e.p.m de RNAm obtido de 3 animais por grupo. ****** $P < 0,01$ versus respectivo controle. **(B)** é uma imagem representativa da eletroforese em gel de agarose.

A

B

Figura 14 Efeito do tratamento com L-NAME sobre a expressão gênica da PECAM-1 em leucócitos circulantes.

Os leucócitos circulantes foram coletados da aorta abdominal de animais controles ou tratados com L-NAME (20mg/kg; v.o.; 14 dias) na ausência (LPS(-)) ou 4 horas após a injeção de LPS (5mg/kg; i.p.; LPS (+)). Os leucócitos foram isolados e o RNAm foi extraído com reagente Trizol®. A reação de PCR foi realizada com *primer* específico para PECAM-1. **(A)** expressa a média $\pm$ e.p.m de RNAm obtido de 3 animais por grupo. * $P < 0,05$ em relação aos respectivos controles. **(B)** é uma imagem representativa da eletroforese em gel de agarose.

4.5.2 Expressão Gênica da PECAM-1 no Músculo Cremaster

Para avaliar se a redução da expressão da PECAM-1 no endotélio dos vasos do músculo cremaster era dependente de alterações na síntese da molécula, ensaios de PCR foram realizados. A quantificação da expressão gênica da PECAM-1 foi determinada no músculo cremaster obtido de animais controles e tratados com L-NAME na ausência ou 4 horas após a estimulação pelo LPS (5mg/kg; i.p.).

Expressão similar foi detectada para o RNAm da PECAM-1 do músculo cremaster na ausência e após a injeção com LPS (Figura 15A). A Figura 15B mostra uma imagem representativa da eletroforese em gel de agarose para RNAm da PECAM-1.

A

B

Figura 15 Efeito do tratamento com L-NAME sobre a expressão gênica da PECAM-1 no músculo cremaster.

O músculo cremaster foi coletado de animais controles ou tratados com L-NAME (20mg/kg; v.o.; 14 dias) na ausência (LPS(-)) ou 4 horas após a injeção de LPS (5mg/kg; i.p.; LPS (+)) e empregado na extração do RNAm com reagente Trizol®. A reação de PCR foi realizada com *primer* específico para PECAM-1. **(A)** expressa a média $\pm$ e.p.m de RNAm obtido de 3 animais por grupo. **(B)** é uma imagem representativa da eletroforese em gel de agarose.

4.6 Atividade da VAP-1 no Músculo Cremaster e no Fígado

A atividade enzimática da VAP-1 foi quantificada no músculo cremaster e no fígado obtido de animais controles e tratados com L-NAME na ausência ou 4 horas após injeção de LPS (5mg/kg; i.p.).

A atividade da VAP-1 no músculo cremaster foi similar em animais controles e tratados com L-NAME na ausência e na presença de estimulação pelo LPS. Em ambos os grupos de animais, a atividade da VAP-1 reduziu após estimulação inflamatória em comparação com a atividade em condições basais (Figura 16).

No tecido hepático não foram observadas diferenças na atividade da VAP-1 entre animais controles e tratados com L-NAME em condições basais ou após a injeção com LPS. Também não foram detectadas alterações na atividade da VAP-1 nos tecidos obtidos de animais inflamados em comparação àqueles obtidos de animais não inflamados (Figura 17).

Figura 16 Efeito do tratamento com L-NAME sobre a atividade da VAP-1 no músculo cremaster

O músculo cremaster foi coletado de animais controles ou tratados com L-NAME (20mg/kg; v.o.; 14 dias) na ausência (LPS(-)) ou 4 horas após a injeção de LPS (5mg/kg; i.p.; LPS (+)) e empregado na determinação da atividade da VAP-1. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m de 4 a 5 tecidos de cada grupo de animal. * $P < 0,05$ em relação aos respectivos valores do grupo LPS (-).

Figura 17 Efeito do tratamento com L-NAME sobre a atividade da VAP-1 no fígado

Fragments do fígado foram coletados de animais controles ou tratados com L-NAME (20mg/kg; v.o.; 14 dias) na ausência (LPS(-)) ou 4 horas após a injeção de LPS (5mg/kg; i.p.; LPS (+)) e empregados na determinação da atividade da VAP-1. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m de 4 a 5 tecidos de cada grupo de animal.

4.7 Efeito do Tratamento com L-NAME Sobre as Concentrações Séricas de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10

As concentrações de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10 foram determinadas no soro de animais controles ou tratados com L-NAME na presença ou ausência de estimulação pelo LPS (5mg/kg; i.p.; 4h). As determinações foram realizadas pelo emprego de kits comerciais baseados na técnica de ELISA.

As concentrações séricas das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IL-6 não diferiram entre animais controles e tratados com L-NAME na ausência de LPS (Figuras 18A, B e C, respectivamente). As concentrações de IL-1 β e TNF- α aumentaram significativamente em amostras de soro coletadas 4 horas após a injeção de LPS em ambos os grupos de animais (controles e L-NAME) em relação aos valores obtidos na ausência de estímulo inflamatório. Após a injeção de LPS, as concentrações de IL-6 não aumentaram em relação às concentrações encontradas na ausência de LPS. Por outro lado, a concentração da citocina antiinflamatória IL-10 estava aumentada em animais tratados com L-NAME em condições basais (figura 17D). Após a estimulação com LPS foi detectado aumento nas concentrações de IL-10 no soro obtido de animais controles. Animais tratados com L-NAME apresentaram concentrações significativamente maiores que animais controles após injeção de LPS.

Figura 18 Efeito do tratamento com L-NAME sobre as concentrações séricas de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10

O soro foi obtido de animais controles ou tratados com L-NAME (20mg/kg; v.o.; 14 dias) na ausência (LPS(-)) ou 4 horas após a injeção de LPS (5mg/kg; i.p.; LPS (+)) e empregado nas determinações de citocinas, por ensaio imunoenzimático. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m dos valores referentes às concentrações de IL-1 β (**A**), TNF- α (**B**), IL-6 (**C**) e IL-10 (**D**) em amostras obtidas de 3 a 6 animais de cada grupo. * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$ em relação aos respectivos valores no grupo LPS (-) ou controles; ** $P < 0,01$ em relação ao respectivo controle.

4.8 Efeitos do Tratamento com L-NAME Sobre a Capacidade Secretora de Leucócitos

4.8.1 Leucócitos Circulantes

Os leucócitos circulantes foram obtidos do sangue circulante de animais tratados com L-NAME (20mg/kg; 14 dias; v.o.) e de animais controles pela punção da aorta abdominal. As células foram cultivadas em meio RPMI com 10% de SBF, por 18 h, na presença ou ausência de LPS (5µg/mL). Os sobrenadantes foram utilizados para quantificação de NO, IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-10 e LTB₄.

Os dados apresentados na Figura 19A mostram que as concentrações de NO₂⁻ foram equivalentes nos sobrenadantes de leucócitos obtidos de animais controles ou tratados com L-NAME. Após estimulação com LPS não houve modificação significativa nas concentrações de NO₂⁻ dos sobrenadantes provenientes de células de ambos os grupos de animais. É importante salientar que nesta população de células, os linfócitos são predominantes (80 a 90%), enquanto monócitos e polimorfonucleares são minoria (cerca de 10% cada).

As Figuras 19B, C, D e E mostram as concentrações de IL-1β, TNF-α, IL-6 e IL-10, respectivamente. As concentrações das citocinas pró-inflamatórias, IL-1β e IL-6 foram similares nos sobrenadantes das células obtidas dos dois grupos de animais na ausência ou na presença de LPS. Vale ressaltar que não houve aumento na concentração destas citocinas após estimulação pelo LPS (Figuras 19B e D). As concentrações de TNF-α foram equivalentes nos sobrenadantes de células obtidas dos dois grupos de animais em ambas as condições estudadas (Figura 19C).

As concentrações da citocina antiinflamatória IL-10 não diferiram nos sobrenadantes das células de animais controles ou tratados com L-NAME na ausência de LPS. Entretanto, após estimulação pelo LPS, sua concentração foi significativamente maior em células de animais tratados com L-NAME quando

comparados com o aumento observado em sobrenadantes de células provenientes de animais controles (Figura 19E).

A determinação das concentrações de LTB₄, apresentada na Figura 19F, mostra que o tratamento com L-NAME não afetou a secreção deste eicosanóide nos diferentes tempos estudados.

Figura 19 Concentração de mediadores inflamatórios no sobrenadante de leucócitos circulantes

Os leucócitos foram isolados do sangue circulante de animais controles e tratados com L-NAME (20mg/kg; v.o.; 14 dias) e cultivados em meio RPMI contendo 10% de SFB na ausência (LPS(-)) ou na presença de LPS (5μg/mL;18h; LPS (+)). Os sobrenadantes foram empregados na reação de Griess, para determinação de NO₂⁻, ou nos ensaios imunoenzimáticos para quantificações de citocinas e do eicosanóide. Os resultados expressam a média ± e.p.m dos valores obtidos nas determinações de NO₂⁻ (**A**), IL-1β (**B**), TNF-α (**C**), IL-6 (**D**), IL-10 (**E**) e LTB₄ (**F**) nos sobrenadantes de células coletadas de 3 a 6 animais em cada grupo. **P*<0,05 em relação ao respectivo valor no grupo LPS (-) e no respectivo controle; ****P*<0,001 e ***P*<0,01 vs. respectivos valores nos grupos LPS (-).

4.8.2 Neutrófilos Migrados para a Cavidade Peritoneal

Neutrófilos foram obtidos da cavidade peritoneal de animais tratados com L-NAME (20mg/kg; 14 dias; v.o.) e de animais controles 4 horas após a injeção de 10mL de solução de glicogênio de ostra 1%. Os neutrófilos foram incubados em meio RPMI com 10% de SFB, por 18 horas, na ausência ou presença de LPS (5µg/mL). Os sobrenadantes das culturas foram utilizados para determinações de NO, IL-1β, TNF-α, IL-6 e LTB₄.

Os resultados obtidos mostraram que não houve diferença significativa entre as concentrações de NO₂⁻ no sobrenadante de células provenientes de animais tratados com L-NAME ou controles em condição basal. Da mesma forma, o aumento na produção de NO₂⁻ após estimulação com LPS foi equivalente em ambos os grupos de animais e significativamente maior que a observada na ausência de estimulação pelo LPS (Figura 20A).

A produção de IL-1β na ausência de estímulo inflamatório não é afetada pelo tratamento com L-NAME. Porém, após estimulação com LPS, a concentração da citocina foi menor no sobrenadante de neutrófilos obtidos de animais tratados com L-NAME. Não houve diferença significativa na concentração desta citocina em animais tratados com L-NAME, na presença ou ausência de LPS (Figura 20B).

As concentrações de TNF-α e IL-6 nos sobrenadantes de células de animais controles ou tratados com L-NAME foram equivalentes na ausência ou sob estimulação com LPS. As magnitudes de aumentos nas concentrações das citocinas, após estimulação com LPS, foram similares em células de animais controles e tratadas com L-NAME (Figuras 20C e D).

As concentrações de LTB₄ não estavam alteradas na ausência de estimulação pelo LPS. No entanto, 8 horas após estimulação, concentrações reduzidas de LTB₄ foram detectadas no sobrenadante de células obtidas de animais tratados com L-NAME (Figura 20E).

Figura 20 Concentração de mediadores inflamatórios no sobrenadante de neutrófilos migrados para o peritônio

Os neutrófilos foram coletados do peritônio de animais controles e tratados com L-NAME (20mg/kg; v.o.; 14 dias), 4 horas após a indução da migração pelo glicogênio de ostra, e cultivados em meio RPMI contendo 10% de SFB na ausência (LPS(-)) ou na presença de LPS (5μg/mL; 18h; LPS (+)). Os sobrenadantes foram empregados na reação de Griess, para determinação de NO₂⁻, ou nos ensaios imunoenzimáticos para quantificações de citocinas e do eicosanóide. Os resultados expressam a média ± e.p.m dos valores obtidos nas determinações de NO₂⁻ (A), IL-1β (B), TNF-α (C), IL-6 (D) e LTB₄ (E) nos sobrenadantes de células coletadas de 3 a 6 animais em cada grupo. Em (A) *P<0,05 em relação aos respectivos valores nos grupos LPS (-); em (B) ***P<0,001 vs. respectivo valor no grupo LPS (-) e **P<0,01 vs. respectivo controle; em (C) **P<0,01 vs. respectivo valor no grupo LPS (-); em (D) **P<0,01 e *P<0,05 vs. respectivo valor no grupo LPS (-); em (E) *P<0,05 vs. respectivo valor controle.

4.8.3 Macrófagos Residentes da Cavidade Peritoneal

Macrófagos residentes foram obtidos da cavidade peritoneal de animais tratados com L-NAME (20mg/kg; 14 dias; v.o.) e de animais controles. Os macrófagos foram incubados em meio RPMI com 10% de SFB, por 18 horas, na ausência ou na presença de LPS (5µg/mL). Os sobrenadantes das culturas foram utilizados para determinações de NO₂⁻, IL-1β, TNF-α, IL-6 e IL-10.

As concentrações de NO₂⁻, na ausência de estimulação pelo LPS, detectadas no sobrenadante de macrófagos residentes foram similares em células obtidas de animais controles e tratados com L-NAME. Após a estimulação com LPS, as concentrações de NO₂⁻ aumentaram significativamente no sobrenadante de células de animais controles, o que não foi detectado no sobrenadante de macrófagos de animais tratados (Figura 21A).

Na ausência de LPS foram detectadas concentrações aumentadas de IL-1β, TNF-α e IL-6 (Figura 21B, C e D) e concentrações reduzidas de IL-10 (Figura 21E) nos sobrenadantes de macrófagos obtidos de animais tratados com L-NAME em relação às células obtidas de animais controles. Concentrações aumentadas de IL-1β, TNF-α e IL-6 e IL-10 (Figura 21B, C, D e E, respectivamente) foram observadas após a estimulação com LPS. Estes incrementos foram equivalentes em macrófagos obtidos de animais controles e tratados com L-NAME.

Figura 21 Concentração de mediadores inflamatórios no sobrenadante de macrófagos residentes do peritônio

Os macrófagos residentes foram coletados do peritônio de animais controles e tratados com L-NAME (20mg/kg; v.o.; 14 dias), e cultivados em meio RPMI contendo 10% de SFB na ausência (LPS(-)) ou na presença de LPS (5μg/mL; 18h; LPS (+)). Os sobrenadantes foram empregados na reação de Griess, para determinação de NO₂⁻, ou nos ensaios imunoenzimáticos para quantificações de citocinas. Os resultados expressam a média ± e.p.m dos valores obtidos nas determinações de NO₂⁻ **(A)**, IL-1β **(B)**, TNF-α **(C)**, IL-6 **(D)** e IL-10 **(E)** nos sobrenadantes de células coletadas de 3 a 6 animais em cada grupo. Em (A) e (B) **P*<0,05 e ***P*<0,01 em relação aos respectivos valores dos grupos LPS (-) e #*P*<0,05 e ****P*<0,001 em relação ao respectivo controle; em (C) **P*<0,05 e #*P*<0,01 em relação ao respectivo controle, ****P*<0,001 e ***P*<0,01 vs. respectivos valores dos grupos LPS (-); em (D) **P*<0,05 em relação ao respectivo valor do grupo LPS (-) e controle e ***P*<0,01 em relação ao respectivo valor do grupo LPS (-); em (E) **P*<0,05 vs. respectivo controle, ****P*<0,001 em relação aos respectivos valores dos grupos LPS (-).

4.8.4 Macrófagos Migrados para a Cavidade Peritoneal

Macrófagos foram obtidos da cavidade peritoneal de animais tratados com L-NAME (20mg/kg; 14 dias; v.o.) e de animais controles 96 horas após a injeção de 3mL de tioglicolato 4%. A injeção de tioglicolato foi realizada 96 horas antes do término do tratamento, como descrito no item 2.3.6 dos Materiais e Métodos. Os macrófagos foram incubados em meio RPMI com 10% de SFB, por 18h, na ausência ou na presença de LPS (5µg/mL). Os sobrenadantes das culturas foram utilizados para determinações de NO_2^- , IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10.

Na Figura 22A estão representados os dados que mostram que na ausência de estímulo inflamatório o tratamento com L-NAME não modificou as concentrações de NO_2^- . Após a estimulação com LPS, as concentrações de NO_2^- aumentaram de maneira semelhante no sobrenadante de células de animais controles e tratados.

As determinações de IL-1 β , IL-6 e IL-10 no sobrenadante de macrófagos migrados para o peritônio pela ação do tioglicolato são mostradas na Figura 22B, D e E, respectivamente. Concentrações similares de IL-1 β , IL-6 e IL-10 foram detectadas no sobrenadante de células obtidas de animais controles e de animais tratados com L-NAME na ausência de LPS. Após estimulação com LPS, aumento equivalente na síntese destas citocinas pôde ser observado nos sobrenadantes das células obtidas de ambos os grupos de animais.

As concentrações de TNF- α foram similares na ausência ou após estimulação com LPS no sobrenadante de células de animais controles e tratados com L-NAME. O aumento esperado da produção desta citocina após a estimulação com LPS não foi observado tanto em células obtidas de animais controles como tratados com L-NAME (Figura 22C).

Figura 22 Concentração de mediadores inflamatórios no sobrenadante de macrófagos residentes do peritônio

Os macrófagos foram coletados do peritônio de animais controles e tratados com L-NAME (20mg/kg; v.o.; 14 dias) 96 horas após a indução da migração pela injeção de tioglicolato (3mL, 4%), e cultivados em meio RPMI contendo 10% de SFB na ausência (LPS(-)) ou na presença de LPS (5 $\mu\text{g/mL}$; 18h; LPS (+)). Os sobrenadantes foram empregados na reação de Griess, para determinação de NO_2^- , ou nos ensaios imunoenzimáticos para quantificações de citocinas. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m dos valores obtidos nas determinações de NO_2^- (**A**), $\text{IL-1}\beta$ (**B**), $\text{TNF-}\alpha$ (**C**), IL-6 (**D**) e IL-10 (**E**) nos sobrenadantes de células coletadas de 3 a 6 animais em cada grupo. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ em relação aos respectivos valores dos grupos LPS (-).

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho foram caracterizados os efeitos do tratamento por período prolongado de tempo com L-NAME sobre a atividade das NOS, as concentrações dos metabólitos do NO no sangue circulante e no exsudato inflamatório e sobre parâmetros da resposta inflamatória, como a peritonite induzida pelo LPS, a expressão de moléculas de adesão nos leucócitos e na célula endotelial, além da secreção de mediadores inflamatórios por diferentes células envolvidas no recrutamento leucocitário.

Inicialmente caracterizamos os efeitos do tratamento com L-NAME sobre a atividade das NOS. Esta pode ser avaliada pela capacidade das NOS, presentes num determinado tipo celular, converter L-arginina marcada com radioativo, em L-citrulina, mediante incubação com substratos específicos (TEIXEIRA *et al.*, 2002; 2005; VAN EIJK *et al.*, 2007). Como esperado, os dados obtidos neste trabalho mostraram que na ausência de estímulo inflamatório, o tratamento com L-NAME inibiu a atividade das NOS no tecido cerebral. Este dado reflete a inibição na atividade das NOS dependentes de Ca^{+2} e mostra a efetividade do tratamento por nós preconizado. O tecido cerebral foi empregado pelas características farmacocinéticas, uma vez que concentrações efetivas de L-NAME devem ter atravessado a barreira hematoencefálica para exercer seus efeitos. Com esta premissa, acreditamos que as atividades das NOS nos demais tecidos estejam inibidas, uma vez que as concentrações de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ estavam reduzidas no plasma de animais tratados com L-NAME na ausência de resposta inflamatória. Esta hipótese também é reforçada pela meia vida do L-NAME. Este inibidor inespecífico das NOS possui meia-vida de 4 horas (PFEIFER *et al.*, 1996), mas seu metabólito ativo, L-NA, possui meia-vida de cerca de 20 horas (TABRIZI-FARD & FUNG, 1994). Ainda, considerando que o L-NAME foi dissolvido na água de beber, deve-se ter mantido concentrações constantes do inibidor das NOS durante todo o tratamento.

Com o intuito de se aquilatar o efeito do tratamento com L-NAME sobre a atividade da iNOS, o tecido cerebral foi coletado 4 horas após a injeção

sistêmica de LPS. Este delineamento experimental foi o mesmo utilizado para quantificar o efeito do tratamento com L-NAME sobre a migração leucocitária *in vivo*. Os dados obtidos mostraram redução na atividade das cNOS, mas não evidenciou alteração na atividade da iNOS. Este dado foi surpreendente porque o tratamento com L-NAME, neste mesmo período de tempo, reduziu a migração leucocitária para o foco de lesão inflamatória e a concentração de NO no exsudato. Uma explicação para esta discrepância de resultados pode ser que o tempo de coleta do tecido cerebral após estimulação não tenha sido adequado para quantificação da iNOS. Recentemente, CZAPSKI *et al.* (2007) mostraram que 3 horas após a injeção de LPS (1mg/kg de peso; i.p.) ocorre o pico máximo de síntese de RNAm para iNOS e que são necessárias 6 horas para haver aumento na atividade da iNOS somente no cérebro médio (mesencéfalo) de camundongos. Neste estudo não foram detectadas atividade da iNOS no córtex ou no cerebelo. Ainda, outros pesquisadores mostraram que o tempo de 6 horas não foi suficiente para induzir a atividade da iNOS no homogenato total do cérebro (HAYASHI *et al.*, 2005). É possível que a quantificação da atividade da iNOS tenha sido diluída, uma vez que utilizamos o homogenato de todo cérebro. Outro ponto importante a se considerar, é que a endotoxina precisa atravessar a barreira hematoencefálica, para no cérebro, estimular fatores de transcrição, síntese e estabilização do RNAm e da proteína. Em conjunto, estas características teciduais e farmacocinéticas podem ter contribuído para o resultado encontrado. No entanto, a redução dos metabólitos de NO no exsudato inflamatório e no plasma dos animais tratados com L-NAME sugere que a iNOS deve estar inibida em células competentes no processo. Dados semelhantes foram encontrados nos trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa, empregando o mesmo protocolo de tratamento com L-NAME em outros modelos experimentais de inflamação (MELLO *et al.*, 1997; GUZZO *et al.*, 2000; MELLO *et al.*, 2002; FARSKY *et al.*, 2004). Todavia, a interpretação dos dados obtidos nas determinações dos metabólitos de NO requerem cuidado, uma vez que NO_2^- e NO_3^- provenientes da dieta são interferentes potenciais nas determinações de NO por quimiluminescência e reação de Griess (DUSSE *et al.*, 2005;

NAGABABU & RIFKIND, 2007). Ademais, os meios de cultura para manutenção destas células possuem nutrientes, entre os quais L-arginina, que é substrato para as NOS (KNOWLES & MONCADA, 1994; AKTAN, 2004; CUTILAB, Campinas, SP). Estas interferências podem ser a causa de não ter sido encontrado concentrações reduzidas dos metabólitos de NO no sobrenadante de leucócitos e neutrófilos obtidos de animais tratados com L-NAME. Somente em condições de alta atividade das NOS, este artefato poderia ser minimizado. Se for verdade esta hipótese, é o que possivelmente aconteceu em cultura de macrófagos. Nestas culturas, detectamos inibição da síntese de NO em animais tratados com L-NAME, quando a síntese dos metabólitos do NO observado em macrófagos de animais controles foi cerca de 20 vezes maior que a detectada em neutrófilos do mesmo grupo de animal. Desta forma, o ensaio da atividade das NOS, empregado neste estudo, oferece vantagens sobre as determinações dos metabólitos do NO, uma vez que avalia diretamente a via metabólica da L-arginina/NO, e assim sugere qual a isoforma responsável pela geração do NO (VAN EIJK *et al.*, 2007).

Como já salientado, o protocolo de tratamento com L-NAME aqui empregado vem sendo utilizado por nosso grupo de pesquisa em diferentes modelos de inflamação, onde foi mostrado redução na migração leucocitária e na permeabilidade vascular (PALACIOS *et al.*, 1999; GUZZO *et al.*, 2000; FARSKY *et al.*, 2004). No presente trabalho investigamos o bloqueio da síntese de NO na septicemia, pela injeção intraperitoneal de LPS de *E.coli*, uma vez que a literatura tem mostrado o papel importante deste mediador no quadro séptico (LAMONTAGNE *et al.*, 2008). Os resultados mostraram, a exemplo dos demais modelos de inflamação, que o bloqueio da síntese de NO por tempo prolongado inibe o recrutamento de leucócitos, predominantemente PMN, para o foco de lesão. Este resultado corrobora ou é contrário aos observados na literatura, onde a inibição aguda da iNOS por aminoguanidina ou em animais geneticamente deficientes da enzima, inibe ou induz a migração de leucócitos para o foco de lesão (HICKEY *et al.*, 1997; TAVARES-MURTA *et al.*, 2001; MESTRINER *et al.*, 2007; TORRES-DUEÑAS *et al.*, 2007; RIOS-SANTOS *et al.*, 2007). O

mecanismo proposto parece ser dependente da ação do NO na indução de proteínas de fase aguda que inibe a migração celular, da geração de peroxinitrito e superóxido além da modulação negativa de receptores para quimiocinas (HICKEY *et al.*, 1997; TAVARES-MURTA *et al.*, 2001; RAZAVI *et al.*, 2004; MESTRINER *et al.*, 2007; TORRES-DUEÑAS *et al.*, 2007; RIOS-SANTOS *et al.*, 2007). As diferenças entre estes resultados podem ser decorrentes dos protocolos utilizados de tratamentos de inibição das NOS. Vale ressaltar que os animais em tratamentos agudos com altas doses de inibidores de NOS apresentam alterações de pressão arterial (MEDEIROS *et al.*, 1995; SALVEMINI *et al.*, 1996, CHEN *et al.*, 2000), o que não foi demonstrado em nossos ensaios (PALÁCIOS *et al.*, 1999; FARSKY *et al.* 2004). Ademais, há evidências que o papel pró ou antiinflamatório depende de variáveis como a concentração do NO no local da inflamação, fonte enzimática e características do tecido inflamado (COLEMAN, 2001).

Na tentativa de elucidar os mecanismos envolvidos nesta atividade antiinflamatória, os ensaios subseqüentes visaram avaliar as expressões de moléculas de adesão responsáveis pelas interações leucócito-endotélio, etapas iniciais e fundamentais do recrutamento celular. Nossos dados anteriores já mostraram que em animais tratados com L-NAME a expressão de L-selectina em neutrófilos na sua última etapa de maturação na medula e circulantes está diminuída, o que favorece a manutenção celular no centro da corrente sangüínea e menor interação com a parede vascular (FARSKY *et al.*, 2004). Esta observação foi ratificada no presente trabalho e, ainda mostramos, que em condições não inflamatórias, as células de animais tratados com L-NAME também apresentam redução de PECAM-1 tanto no leucócito circulante como no endotélio vascular. É interessante salientar, que ambas as moléculas são constitutivas e exercem papéis importantes na manutenção do sistema imune e na integridade vascular. Tanto a L-selectina, quanto a PECAM-1, expressas em leucócitos circulantes exercem ações importantes na recirculação de linfócitos e na regulação da meia vida de leucócitos na circulação; a PECAM-1 ainda é uma das moléculas responsáveis pela manutenção da integridade das junções

interendoteliais (NEWMAN & NEWMAN, 2003; PETRI & BIXEL, 2006; WOODFIN *et al.*, 2007; GARCIA *et al.*, 2007). Em conjunto, estes dados sugerem o papel do NO como um modulador da expressão destas moléculas constitutivas.

Interessantemente, o controle do NO sobre a expressão destas moléculas é diferente. Enquanto a síntese de L-selectina em leucócitos de animais tratados com L-NAME está reduzida, o mesmo não acontece para PECAM-1. A L-selectina é constantemente sintetizada pelos leucócitos e após sua expressão e ativação, é clivada da membrana pela ação de proteinases (SMALLEY & LEY, 2005; SPERANDIO, 2006). Esta clivagem é o mecanismo de diferentes agentes com papel no processo inflamatório, como os glicocorticóides endógenos e sintéticos (STRAUSBAUGH & ROSEN, 2001; CAVALCANTI *et al.*, 2006; 2007). Os dados na literatura quanto ao papel do NO na expressão de L-selectina são escassos e não conclusivos (ROMAN & MCGAHREN, 2006; NOLAN *et al.*, 2008) e pela primeira vez mostramos que o NO controla a síntese desta molécula.

Quanto à regulação da expressão de PECAM-1, o NO pode estar interferindo na clivagem ou reinternalização desta molécula. Tem sido descrito que a PECAM-1 pode ser clivada das superfícies celulares, originando suas formas solúveis ou pode sofrer internalização frente a diferentes estímulos (WANG *et al.*, 1998; EUGENIN *et al.*, 2006; MICHAŁOWSKA-WENDER *et al.*, 2006; ZAJKOWSKA *et al.* 2006; GARNACHO *et al.*, 2008). Reforçando esta hipótese, é bem demonstrado que a PECAM-1 e a eNOS co-localizam na célula endotelial e, de fato, existe uma forte correlação entre estas moléculas (GOVERS *et al.*, 2002). Modificações na velocidade do fluxo sanguíneo (*shear stress*) ativam a PECAM-1 e esta induz a fosforilação da eNOS e a conseqüente geração de NO e vasodilatação (DUSSERRE *et al.*, 2004; BAGI *et al.*, 2005; FLEMING *et al.*, 2005). Outros autores ainda têm demonstrado que a CaM citoplasmática, conhecido cofator para a atividade das cNOS, pode interagir com a PECAM-1 controlando a sua clivagem (WONG *et al.*, 2004).

Por outro lado, as expressões de L-selectina e de PECAM-1 no leucócito após estimulação *in vivo* pelo LPS não foram alteradas em animais tratados com L-NAME. É possível que o tempo de análise após a resposta inflamatória não tenha sido o adequado para se apreciar o aumento de expressão após estimulação. Outra hipótese, é que o controle exercido pelo NO em condições de não inflamação, não seja evidente na vigência de septicemia, uma vez que inúmeras outras alterações ocorrem neste estado inflamatório, mascarando ou sobrepondo o efeito do NO. Diferentemente, a expressão de PECAM-1 no endotélio foi menor em animais tratados com L-NAME em relação à expressão em animais controles após a indução da inflamação. É sabido que na vigência de estímulo inflamatório, a expressão de PECAM-1 aumenta, via ativação de NF- κ B (BOTELLA *et al.*, 2000). Este pode não ser o controle exercido pelo NO, uma vez que a expressão gênica de PECAM-1 também não foi alterada após estimulação pelo LPS. Mas, como já evidenciado anteriormente, os mecanismos que controlam a expressão da PECAM-1 são clivagem e reinternalização. Desta forma, é possível sugerir, que a exemplo do que pode ocorrer em condições de não estimulação, o NO possa controlar estes mecanismos.

Adicionalmente, mostramos que o tratamento com L-NAME não altera a expressão de β_2 integrina em leucócitos circulantes, de P e E-selectina, ICAM-1 ou VCAM-1 no endotélio. Como citado anteriormente para L-selectina e PECAM-1, o controle exercido pelo NO na expressão e/ou ativação destas moléculas é controverso e parece depender dos protocolos experimentais utilizados (KAMINSKI *et al.*, 2004; DAL SECCO *et al.*, 2006; ROY *et al.*, 2008).

Como salientado na Introdução, a VAP-1 é uma monoamino-oxidase sensível a semicarbazida que catalisa a deaminação oxidativa de aminas primárias, expressa em células endoteliais que possui papel na interação leucócito-endotélio, tanto pela sua propriedade adesiva *per se*, como pela sua atividade enzimática (SALMI & JALKANEN, 2006; JALKANEN & SALMI, 2008). Por estas características, investigamos sua expressão e atividade no endotélio dos sinusóides hepáticos, tecido que reconhecidamente expressa a VAP-1, e do músculo cremaster de animais tratados com L-NAME. Nossos dados mostraram

que o NO controla negativamente somente a expressão da molécula após indução da resposta inflamatória nos dois tecidos estudados. A literatura é extremamente escassa no que diz respeito à relação entre VAP-1 e NO. Entretanto, um grupo de pesquisadores descreveu recentemente que o H₂O₂ endógeno proveniente da ação de monoamino-oxidases de macrófagos inibem a síntese protéica da iNOS (VEGA *et al.*, 2004).

Para que o processo de recrutamento celular e a expressão de moléculas de adesão sejam efetivos, é necessário que uma série de mediadores seja liberada, de maneira coordenada. Verificamos que leucócitos circulantes obtidos de animais tratados com L-NAME apresentam maior habilidade de secretar IL-10, uma citocina com propriedades antiinflamatórias. Tem sido mostrado que a IL-10 interfere com a habilidade de monócitos, células dendríticas e macrófagos, secretar citocinas com propriedades pró-inflamatórias, como por exemplo, IL-1 β , TNF- α , IL-6, inibe a liberação de quimiocinas como IL-8, MCP-1, MIP-3 α , RANTES e a expressão de moléculas de adesão como a ICAM-1 (MOORE *et al.*, 2001; GROUX & COTREZ, 2003; COMMINS *et al.*, 2008). Confirmando nosso achado, dados da literatura mostram que animais geneticamente modificados que super expressam eNOS apresentam redução na síntese de IL-10 por células do linfonodo (TEN BROEKE *et al.*, 2006). A IL-10 é principalmente secretada por linfócitos B e T, células NK e macrófagos ativados (COUPER *et al.*, 2008). É importante salientar que a composição de leucócitos, no sangue periférico de ratos, apresenta predomínio de linfócitos (80%), seguido de neutrófilos (10%) e monócitos (10%) e que, portanto, a maior secreção desta citocina possa refletir um efeito do NO sobre linfócitos.

Confirmando a ação do NO sobre a secreção de IL-10 por leucócitos, a concentração sérica desta citocina em animais tratados com L-NAME, na ausência ou presença de estímulo inflamatório, é maior que a encontrada em soro de animais controles nas mesmas condições. Em conjunto, nossos dados sugerem que, a IL-10 pode estar participando da inibição do recrutamento leucocitário verificada em animais tratados com L-NAME, direta ou indiretamente.

Adicionalmente, neutrófilos obtidos de animais tratados com L-NAME secretam menores concentrações de IL-1 β e LTB₄. A redução na concentração de IL-1 β corrobora nossos dados prévios que mostraram redução na concentração deste mediador no exsudato inflamatório de animais submetidos ao mesmo protocolo de tratamento (MELLO *et al.*, 1997; PALÁCIOS *et al.*, 1999). Portanto, a inibição da síntese de IL-1 β por células competentes, entre os quais neutrófilos, é um mecanismo importante no controle da migração leucocitária induzida pelo NO em nosso modelo experimental. Além disso, a literatura tem mostrado uma importante relação entre a iNOS e a 5-lipoxigenase, apesar dos resultados obtidos serem controversos (COFFEY *et al.*, 2004; GILCHRIST *et al.*, 2004). Há relatos de que a inibição das NOS ou o emprego de doadores de NO, aumenta ou inibe a liberação de LTB₄. O mecanismo proposto sugere que o NO atue diretamente sobre a 5-LO e, desta maneira, reduz ou aumenta a geração de LTB₄ (BROCK *et al.*, 2003; BROCK e PETERS-GOLDEN, 2007).

Macrófagos são fagócitos encontrados nos tecidos que se originam de monócitos circulantes. Desempenham importantes papéis nas respostas imune inata, adaptativa e na transição entre elas (ABBAS, 2007). Os macrófagos são produtores de NO por excelência, secretando concentrações exacerbadas na vigência de estimulação por endotoxinas ou citocinas (STUHER & MARLETTA, 1985; MILES *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 2005; LIN *et al.*, 2008). Por estas características, o macrófago foi a primeira célula a ser escolhida para se avaliar os possíveis efeitos pró-inflamatórios exercidos pelo NO em nosso modelo experimental. Surpreendentemente, e corroborando a grande diversidade de resultados que mostram a dualidade do NO como anti ou pró-inflamatório na literatura, macrófagos residentes obtidos de animais tratados com L-NAME apresentaram funções pró-inflamatórias. Foram observados aumento na secreção de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e redução na secreção de IL-10. Na vigência de estimulação pelo LPS *in vitro*, os perfis de secreção foram semelhantes aos controles. Da mesma forma, macrófagos recrutados para o peritônio pela ação de tioglicolato, tanto de animais controles como tratados com L-NAME

apresentaram um perfil de secreção de citocinas que caracteriza estado pró-inflamatório.

As citocinas descritas acima são reguladas durante a transcrição pela ativação de NF- κ B (HANADA *et al.*, 2002; CONTI *et al.*, 2003). A literatura mostra que em macrófagos, o NO apresenta um perfil bifásico, ou seja, num primeiro momento o NO induz/ativa NF- κ B e em seguida, após a ativação da iNOS e geração de elevadas concentrações de NO, este mediador exerce um efeito autólogo e inibe NF- κ B (CONNELLY *et al.*, 2001). Os mecanismos sugeridos consistem na inativação do NF- κ B, pela capacidade do NO de estabilizar I κ B e, conseqüentemente, inibir a translocação nuclear das subunidades p65 e p50 do NF- κ B (PENG *et al.*, 1995; KATSUYAMA *et al.*, 1998; ACQUISTO *et al.*, 2001). O protocolo de tratamento por nós preconizado consiste na inibição crônica da síntese de NO, assim, é possível que a ausência do mediador possa interferir com a regulação da indução/inibição de NF- κ B.

Em conjunto, os dados obtidos neste trabalho mostram que a inibição da síntese de NO promovida pelo tratamento prolongado com L-NAME interfere nas diferentes etapas do recrutamento leucocitário. O NO parece interferir de maneira seletiva sobre as moléculas de adesão constitutivas envolvidas nos fenômenos de *rolling* e aderência. Ainda, o tratamento com L-NAME altera a capacidade de leucócitos secretar mediadores químicos envolvidos no processo e reforça o papel dual do NO neste contexto.

É importante ressaltar que o tratamento com L-NAME, que praticamente aboliu a atividade enzimática das cNOS, gerando, conseqüentemente, deficiência de NO por um período prolongado de tempo possa ter induzido adaptações em diferentes tecidos, na tentativa de manter a hemostasia. Acharmos esta hipótese plausível porque nos animais tratados com L-NAME não há alterações de pressão arterial ou na hemodinâmica microcirculatória (FARSKY *et al.*, 2004), fenômenos evidentes na ausência de NO (KUBES *et al.*, 1997; ALVAREZ *et al.*, 2001). É possível que os efeitos observados em macrófagos residentes possam ser decorrentes de adaptações destas células no

seu microambiente, uma vez que permanecem nos tecidos por longos períodos de tempo.

CONCLUSÕES

6 RESUMOS DOS RESULTADOS OBTIDOS E CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que o tratamento com L-NAME:

- 1) Inibe a atividade das NOS dependentes de Ca^{+2} no tecido cerebral;
- 2) Reduz as concentrações dos metabólitos do NO na circulação e no exsudato inflamatório;
- 3) Inibe a migração de leucócitos para o peritônio após a estimulação com LPS;
- 4) Inibe a expressão de L-selectina nos leucócitos circulantes, bem como sua síntese;
- 5) Inibe a expressão de PECAM-1 nos leucócitos circulantes e no endotélio de vasos do músculo cremaster;
- 6) Inibe a expressão da VAP-1 no endotélio dos sinusóides hepáticos e dos vasos do músculo cremaster;
- 7) Aumenta as concentrações de IL-10 no soro;
- 8) Aumenta a síntese de IL-10 por leucócitos circulantes;
- 9) Inibe a síntese de IL-1 β e LTB₄ por neutrófilos;
- 10) Estimula a síntese de IL-1 β , TNF- α e IL-6 e reduz a produção de IL-10 por macrófagos residentes do peritônio;

o que permite concluir que o NO exerce papel pró-inflamatório sobre o recrutamento leucocitário demonstrado pela inibição da migração de células para o foco de lesão inflamatória. O mecanismo parece envolver alterações nas expressões de moléculas de adesão constitutivas, expressas pelos leucócitos e pelo endotélio, dependentes ou não de síntese. Ainda, a dualidade da ação do NO pode ser claramente observada na produção de mediadores inflamatórios pelos diferentes tipos celulares estudados.

***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. *Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico*. 2.ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, 2007.

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. *Imunologia celular e molecular*. 2.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1998.

ACQUISTO F, MAIURI MC, DE CRISTOFARO F, CARNUCCIO R. Nitric oxide prevents inducible cyclooxygenase expression by inhibiting nuclear factor-kappa B and nuclear factor-interleukin-6 activation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 364(2):157-65, 2001.

AKTAN F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci*. 25;75(6):639-53, 2004.

ALBELDA SM, OLIVER PD, ROMER LH, BUCK CA. EndoCAM: a novel endothelial cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol*. 110(4):1227-37, 1990.

ALI H; RICHARDSON RM; HARIBABU B; SNYDERMAN R. Chemoattractant receptor cross-desensitization. *J Biol Chem*. 274(10):6027-30, 1999.

ALON R, ETZIONI A. LAD-III, a novel group of leukocyte integrin activation deficiencies. *Trends Immunol*. 24(10):561-6, 2003.

ALP NJ & CHANNON KM. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 24(3):413-20, 2004.

ALVAREZ A, PIQUERAS L, BELLO R, CANET A, MORENO L, KUBES P, SANZ MJ. Angiotensin II is involved in nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase inhibition-induced leukocyte-endothelial cell interactions in vivo. *Br J Pharmacol*. 132(3):677-84, 2001.

BAGI Z, FRANGOS JA, YEH JC, WHITE CR, KALEY G, KOLLER A. PECAM-1 mediates NO-dependent dilation of arterioles to high temporal gradients of shear stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 25(8):1590-5, 2005.

BOCHNER BS, LUSCINSKAS FW, GIMBRONE MA JR, NEWMAN W, STERBINSKY SA, DERSE-ANTHONY CP, KLUNK D, SCHLEIMER RP. Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin 1-activated human vascular endothelial cells: contributions of endothelial cell adhesion molecules. *J Exp Med*. 1;173(6):1553-7, 1991.

BOGDAN C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*. 2(10):907-16, 2001.

BONDER CS, NORMAN MU, SWAIN MG, ZBYTNUK LD, YAMANOUCHI J, SANTAMARÍA P, AJUEBOR M, SALMI M, JALKANEN S, KUBES P. Rules of recruitment for Th1 and Th2 lymphocytes in inflamed liver: a role for alpha-4 integrin and vascular adhesion protein-1. *Immunity*. 23(2):153-63, 2005.

BOTELLA LM, PUIG-KRÖGER A, ALMENDRO N, SÁNCHEZ-ELSNER T, MUÑOZ E, CORBÍ A, BERNABÉU C. Identification of a functional NF-kappa B site in the platelet endothelial cell adhesion molecule-1 promoter. *J Immunol.* 1;164(3):1372-8, 2000.

BROCK TG, MCNISH RW, MANCUSO P, COFFEY MJ, PETERS-GOLDEN M. Prolonged lipopolysaccharide inhibits leukotriene synthesis in peritoneal macrophages: mediation by nitric oxide and prostaglandins. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 71(3-4):131-45, 2003.

BROCK TG, PETERS-GOLDEN M. Activation and regulation of cellular eicosanoid biosynthesis. *Scientific World Journal.* 1;7:1273-84, 2007.

CASSATELLA MA. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today.* 16(1):21-6, 1995.

CAVALCANTI DM, LOTUFO CM, BORELLI P, FERREIRA ZS, MARKUS RP, FARSKY SH. Endogenous glucocorticoids control neutrophil mobilization from bone marrow to blood and tissues in non-inflammatory conditions. *Br J Pharmacol.* 152(8):1291-300, 2007.

CAVALCANTI DM, LOTUFO CM, BORELLI P, TAVASSI AM, PEREIRA AL, MARKUS RP, FARSKY SH. Adrenal deficiency alters mechanisms of neutrophil mobilization. *Mol Cell Endocrinol.* 25;249(1-2):32-9, 2006.

CAVRIANI G, DOMINGOS HV, OLIVEIRA-FILHO RM, SUDO-HAYASHI LS, VARGAFTIG BB, DE LIMA WT. Lymphatic thoracic duct ligation modulates the serum levels of IL-1beta and IL-10 after intestinal ischemia/reperfusion in rats with the involvement of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide. *Shock.* 27(2):209-13, 2007.

CHAKRABARTI S, ZEE JM, PATEL KD. Regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in TNF-stimulated neutrophils: novel pathways for tertiary granule release. *J Leukoc Biol.* 79(1):214-22, 2006.

CHEN JC, CHEN HM, SHYR MH, FAN LL, CHI TY, CHI CP, CHEN MF. Selective inhibition of inducible nitric oxide in ischemia-reperfusion of rat small intestine. *J Formos Med Assoc.* 99(3):213-8, 2000.

CHIEN S. Rheology in the microcirculation in normal and low flow states. *Adv. Shock Res.* 8:71, 1982.

CHING S, HE L, LAI W, QUAN N. IL-1 type I receptor plays a key role in mediating the recruitment of leukocytes into the central nervous system. *Brain Behav Immun.* 19(2):127-37, 2005.

CHING S, ZHANG H, LAI W, QUAN N. Peripheral injection of lipopolysaccharide prevents brain recruitment of leukocytes induced by central injection of interleukin-1. *Neuroscience.* 137(2):717-26, 2006.

CHU CJ, CHANG CC, WANG TF, LEE FY, CHANG FY, CHEN YC, CHAN CC, HUANG HC, WANG SS, LEE SD. Detrimental effects of nitric oxide inhibition on hepatic

encephalopathy in rats with thioacetamide-induced fulminant hepatic failure: role of nitric oxide synthase isoforms. *J Gastroenterol Hepatol*. 21(7):1194-9, 2006.

CIRINO G, FIORUCCI S, SESSA WC. Endothelial nitric oxide synthase: the Cinderella of inflammation? *Trends Pharmacol Sci*. 24(2):91-5, 2003.

CIRIONI O, GIACOMETTI A, GHISELLI R, KAMYSZ W, ORLANDO F, MOCCHEGIANI F, SILVESTRI C, LICCI A, LUKASIAK J, SABA V, SCALISE G. Temporin a alone and in combination with imipenem reduces lethality in a mouse model of staphylococcal sepsis. *J Infect Dis*. 1;192 (9):1613-20, 2005.

CLARK J, VAGENAS P, PANESAR M, COPE AP. What does tumour necrosis factor excess do to the immune system long term? *Ann Rheum Dis*. 64 Suppl 4:iv70-6, 2005.

COFFEY M, PHARE S, PETERS-GOLDEN M. Induction of inducible nitric oxide synthase by lipopolysaccharide/interferon gamma and sepsis down-regulates 5-lipoxygenase metabolism in murine alveolar macrophages. *Exp Lung Res*. 30(7):615-33, 2004.

COLEMAN JW. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol*. 1(8):1397-406, 2001.

COMMINS S, STEINKE JW, BORISH L. The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. *J Allergy Clin Immunol*. 121(5):1108-11, 2008.

CONNELLY L, PALACIOS-CALLENDER M, AMEIXA C, MONCADA S, HOBBS AJ. Biphasic regulation of NF-kappa B activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide. *J Immunol*. 15;166(6):3873-81, 2001.

CONTI P, KEMPURAJ D, FRYDAS S, KANDERE K, BOUCHER W, LETOURNEAU R, MADHAPPAN B, SAGIMOTO K, CHRISTODOULOU S, THEOHARIDES TC. IL-10 subfamily members: IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 and IL-26. *Immunol Lett*. 8;88(3):171-4, 2003.

COOK-MILLS JM, DEEM TL. Active participation of endothelial cells in inflammation. *J Leukoc Biol*. 77(4):487-95, 2005.

COUPER KN, BLOUNT DG, RILEY EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol*. 1;180(9):5771-7, 2008.

CUENCA J, MARTIN-SANZ P, ALVAREZ-BARRIENTOS AM, BOSCA L, GOREN N. Infiltration of inflammatory cells plays an important role in matrix metalloproteinase expression and activation in the heart during sepsis. *Am J Pathol*. 169(5):1567-76, 2006.

CZAPSKI GA, CAKALA M, CHALIMONIUK M, GAJKOWSKA B, STROSZNAJDER JB. Role of nitric oxide in the brain during lipopolysaccharide-evoked systemic inflammation. *J Neurosci Res*. 85(8):1694-703, 2007.

DAL SECCO D, MOREIRA AP, FREITAS A, SILVA JS, ROSSI MA, FERREIRA SH, CUNHA FQ. Nitric oxide inhibits neutrophil migration by a mechanism dependent on ICAM-1: role of soluble guanylate cyclase. *Nitric Oxide*. 15(1):77-86, 2006.

DARNAY BG, AGGARWAL BB. Early events in TNF signaling: a story of associations and dissociations. *J Leukoc Biol*. 61(5):559-66, 1997.

DAVENPECK KL, GAUTHIER TW, LEFER AM. Inhibition of endothelial-derived nitric oxide promotes P-selectin expression and actions in the rat microcirculation. *Gastroenterology*. 107(4):1050-8, 1994.

DEJANA E, BREVIARIO F, CAVEDA L. Leukocyte-endothelial cell adhesive receptors. *Clin Exp Rheumatol*. 12 Suppl 10:S25-8, 1994.

DELISSER HM, CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU M, STRIETER RM, BURDICK MD, ROBINSON CS, WEXLER RS, KERR JS, GARLANDA C, MERWIN JR, MADRI JA, ALBELDA SM. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol*. 151(3):671-7, 1997.

DIAMOND MS, STAUNTON DE, MARLIN SD, SPRINGER TA. Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell*. 14;65(6):961-71, 1991.

DUSSE LM, SILVA RM, VIEIRA LM, DAS GRAÇAS CARVALHO M. Does plasma nitrite determination by the Griess reaction reflect nitric oxide synthesis? *Clin Chim Acta*. 62(1-2):195-7, 2005.

DUSSERRE N, L'HEUREUX N, BELL KS, STEVENS HY, YEH J, OTTE LA, LOUFRANI L, FRANGOS JA. PECAM-1 interacts with nitric oxide synthase in human endothelial cells: implication for flow-induced nitric oxide synthase activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 24(10):1796-802, 2004.

DUSTIN ML, ROTHLEIN R, BHAN AK, DINARELLO CA, SPRINGER TA. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol*. 1;137(1):245-54, 1986.

ELIAS CG 3RD, SPELLBERG JP, KARAN-TAMIR B, LIN CH, WANG YJ, MCKENNA PJ, MULLER WA, ZUKOWSKI MM, ANDREW DP. Ligation of CD31/PECAM-1 modulates the function of lymphocytes, monocytes and neutrophils. *Eur J Immunol*. 28(6):1948-58, 1998.

ETZIONI A, TONETTI M. Fucose supplementation in leukocyte adhesion deficiency type II. *Blood*. 1;95(11):3641-3, 2000.

EUGENIN EA, GAMSS R, BUCKNER C, BUONO D, KLEIN RS, SCHOENBAUM EE, CALDERON TM, BERMAN JW. Shedding of PECAM-1 during HIV infection: a potential role for soluble PECAM-1 in the pathogenesis of NeuroAIDS. *J Leukoc Biol*. 79(3):444-52, 2006.

FARSKY SH, BORELLI P, FOCK RA, PROTO SZ, FERREIRA JM JR, MELLO SB. Chronic blockade of nitric oxide biosynthesis in rats: effect on leukocyte endothelial interaction and on leukocyte recruitment. *Inflamm Res*. 53(9):442-52, 2004.

FLEMING I, BUSSE R. Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc Res*. 15;43(3):532-41, 1999.

FLEMING I, FISSALTHALER B, DIXIT M, BUSSE R. Role of PECAM-1 in the shear-stress-induced activation of Akt and the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in endothelial cells. *J Cell Sci*. 15;118(Pt 18):4103-11, 2005.

FÖRSTERMANN U, BOISSEL JP, KLEINERT H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J*. 12(10):773-90, 1998.

FRANGOIANNIS, N.G.; MENDOZA, L.H.; LEWALLEN, M.; MICHAEL, L.H.; SMITH, C.W.; ENTMAN, M.L. Induction and suppression of interferon-inducible protein 10 in reperfused myocardial infarcts may regulate angiogenesis. *FASEB J*. (15)1428-1430, 2001.

FRIEDRICH EB, TAGER AM, LIU E, PETTERSSON A, OWMAN C, MUNN L, LUSTER AD, GERSZTEN RE. Mechanisms of leukotriene B₄-triggered monocyte adhesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1;23(10):1761-7, 2003.

FUJIWARA K. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and mechanotransduction in vascular endothelial cells. *J Intern Med*. 259(4):373-80, 2006.

FUNK CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*. 30;294(5548):1871-5, 2001.

GARCÍA VE, CHULUYAN HE. SLAM and CD31: signaling molecules involved in cytokine secretion during the development of innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev*. 18(1-2):85-96, 2007.

GARNACHO C, ALBELDA SM, MUZYKANTOV VR, MURO S. Differential intra-endothelial delivery of polymer nanocarriers targeted to distinct PECAM-1 epitopes. *J Control Release*. NO PRESS, 2008.

GILCHRIST M, MCCAULEY SD, BEFUS AD. Expression, localization, and regulation of NOS in human mast cell lines: effects on leukotriene production. *Blood*. 15;104(2):462-9, 2004.

GOVERS R, BEVERS L, DE BREE P, RABELINK TJ. Endothelial nitric oxide synthase activity is linked to its presence at cell-cell contacts. *Biochem J*. 15;361(Pt 2):193-201, 2002.

GROUX H, COTTREZ F. The complex role of interleukin-10 in autoimmunity. *J Autoimmun*. 20(4):281-5, 2003.

- GUZZO ML, FARSKY SH, DE NUCCI G, ANTUNES E, SILVA MA, MELLO SB. Role of kinins and nitric oxide on the rabbit arthritis induced by *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*. 38(11):1535-46, 2000.
- HABBAL MH, STROBEL S. Leucocyte adhesion deficiency. *Arch Dis Child*. 69(4):463-6, 1993.
- HANADA T, YOSHIMURA A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev*. 13(4-5):413-21, 2002.
- HARLAN, J.M. Leukocyte-endothelial interactions. *Blood*. 65(3):513-25, 1985.
- HATAO F, HIKI N, MIMURA Y, OGAWA T, KOJIMA J, MAFUNE K, HAWKINS LD, MUROI M, TANAMOTO K, KAMINISHI M. The induction of super-resistance using synthetic lipopolysaccharide receptor agonist rescues fatal endotoxemia in rats without excessive immunosuppression. *Shock*. 23(4):365-70, 2005.
- HAYASHI Y, ABE M, MURAI A, SHIMIZU N, OKAMOTO I, KATSURAGI T, TANAKA K. Comparison of effects of nitric oxide synthase (NOS) inhibitors on plasma nitrite/nitrate levels and tissue NOS activity in septic organs. *Microbiol Immunol*. 49(2):139-47, 2005.
- HEIT B, COLARUSSO P, KUBES P. Fundamentally different roles for LFA-1, Mac-1 and alpha4-integrin in neutrophil chemotaxis. *J Cell Sci*. 15;118(Pt 22):5205-20, 2005.
- HELFGOTT DC, MAY LT, STHOEGER Z, TAMM I, SEHGAL PB. Bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) enhances expression and secretion of beta 2 interferon by human fibroblasts. *J Exp Med*. 1;166(5):1300-9, 1987.
- HELLER EA, LIU E, TAGER AM, SINHA S, ROBERTS JD, KOEHN SL, LIBBY P, AIKAWA ER, CHEN JQ, HUANG P, FREEMAN MW, MOORE KJ, LUSTER AD, GERSZTEN RE. Inhibition of atherogenesis in BLT1-deficient mice reveals a role for LTB4 and BLT1 in smooth muscle cell recruitment. *Circulation*. 26;112(4):578-86, 2005.
- HICKEY MJ, ISSEKUTZ AC, REINHARDT PH, FEDORAK RN, KUBES P. Endogenous Interleukin-10 regulates hemodynamic parameters, leukocyte-endothelial cell interactions, and microvascular permeability during endotoxemia. *Circ Res*. 83: 1124 – 1131, 1998.
- HICKEY MJ, SHARKEY KA, SIHOTA EG, REINHARDT PH, MACMICKING JD, NATHAN C, KUBES P. Inducible nitric oxide synthase-deficient mice have enhanced leukocyte-endothelium interactions in endotoxemia. *FASEB J*. 11(12):955-64, 1997.
- HOBBS AJ, HIGGS A, MONCADA S. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 39:191-220, 1999.
- HOGG N, BATES PA. Genetic analysis of integrin function in man: LAD-1 and other syndromes. *Matrix Biol*. 19(3):211-22, 2000.
- HUSSAIN, N.; WU, F.; ZHU, L.; THRALL, R.S.; KRESCH, M.J. Neutrophil apoptosis during the development and resolution of acid-induced acute lung injury in the rat. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 19(6): 867-74, 1998.

ILAN N, MADRI JA. PECAM-1: old friend, new partners. *Curr Opin Cell Biol.* 15(5):515-24, 2003.

JAKUS Z, FODOR S, ABRAM CL, LOWELL CA, MÓCSAI A. Immunoreceptor-like signaling by beta 2 and beta 3 integrins. *Trends Cell Biol.* 17(10):493-501, 2007.

JALKANEN S, KARIKOSKI M, MERCIER N, KOSKINEN K, HENTTINEN T, ELIMA K, SALMIVIRTA K, SALMI M. The oxidase activity of vascular adhesion protein-1 (VAP-1) induces endothelial E- and P-selectins and leukocyte binding. *Blood.* 15;110(6):1864-70, 2007.

JALKANEN S, SALMI M. VAP-1 and CD73, endothelial cell surface enzymes in leukocyte extravasation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28(1):18-26, 2008.

JUNG TM, DAILEY MO. Rapid modulation of homing receptors (gp90MEL-14) induced by activators of protein kinase C. Receptor shedding due to accelerated proteolytic cleavage at the cell surface. *J Immunol.* 15;144(8):3130-6, 1990.

JUNG U, LEY K. Mice lacking two or all three selectins demonstrate overlapping and distinct functions for each selectin. *J Immunol.* 1;162(11):6755-62, 1999.

KAMINSKI A, POHL CB, SPONHOLZ C, MA N, STAMM C, VOLLMAR B, STEINHOFF G. Up-regulation of endothelial nitric oxide synthase inhibits pulmonary leukocyte migration following lung ischemia-reperfusion in mice. *Am J Pathol.* 164(6):2241-9, 2004.

KATSUYAMA K, SHICHIRI M, MARUMO F, HIRATA Y. NO inhibits cytokine-induced iNOS expression and NF-kappaB activation by interfering with phosphorylation and degradation of IkappaB-alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18(11):1796-802, 1998.

KLATT P, SCHMIDT K, BRUNNER F, MAYER B. Inhibitors of brain nitric oxide synthase. Binding kinetics, metabolism, and enzyme inactivation. *J Biol Chem.* 21;269(3):1674-80, 1994.

KNOWLES RG, MONCADA S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 1;298 (Pt 2):249-58, 1994.

KOSKINEN K, VAINIO PJ, SMITH DJ, PIHLAVISTO M, YLÄ-HERTTUALA S, JALKANEN S, SALMI M. Granulocyte transmigration through the endothelium is regulated by the oxidase activity of vascular adhesion protein-1 (VAP-1). *Blood.* 1;103(9):3388-95, 2004.

KUBES P, GRISHAM MB, BARROWMAN JA, GAGINELLA T, GRANGER DN. Leukocyte-induced vascular protein leakage in cat mesentery. *Am J Physiol.* 261(6 Pt 2):H1872-9, 1991.

KUBES P, KANWAR S, NIU XF, GABOURY JP. Nitric oxide synthesis inhibition induces leukocyte adhesion via superoxide and mast cells. *FASEB J.* 7(13):1293-9, 1993.

KUBES P, SIHOTA E, HICKEY MJ. Endogenous but not exogenous nitric oxide decreases TNF-alpha-induced leukocyte rolling. *Am J Physiol.* 273(3 Pt 1):G628-35, 1997.

KULDO JM, WESTRA J, ASGEIRSDOTTIR SA, KOK RJ, OOSTERHUIS K, ROTS MG, SCHOUTEN JP, LIMBURG PC, MOLEMA G. Differential effects of NF- κ B and p38 MAPK inhibitors and combinations thereof on TNF- α - and IL-1 β -induced proinflammatory status of endothelial cells in vitro. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005 289(5):C1229-39.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. *Acute and chronic inflammation*. In: Kumar, V.; Abbas, A.K.; Fausto, N. (ed.) *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 7th. Elsevier. 47-86, 2005.

KUNKEL EJ, JUNG U, LEY K. TNF- α induces selectin-mediated leukocyte rolling in mouse cremaster muscle arterioles. *Am J Physiol*. 272(3 Pt 2):H1391-400, 1997.

LAKSHMAN R, FINN A. Neutrophil disorders and their management. *J Clin Pathol*. 54(1):7-19, 2001.

LALOR PF, EDWARDS S, MCNAB G, SALMI M, JALKANEN S, ADAMS DH. Vascular adhesion protein-1 mediates adhesion and transmigration of lymphocytes on human hepatic endothelial cells. *J Immunol*. 15;169(2):983-92, 2002.

LAMONTAGNE F, MEADE M, ONDIVEERAN HK, LESUR O, ROBICHAUD AE. Nitric oxide donors in sepsis: a systematic review of clinical and in vivo preclinical data. *Shock*, 2008.

LAU, D.; MOLINAU, H.; EISERICH, J.P.; FREEMAN, B.A.; DAIBER, A.; GEHLING, U.M.; BRÜMER, J.; RUDOLPH, V.; MÜNZEL, T.; HEITZER, T.; BALDUS, S. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. *PNAS*. 102 (5), 431-436, 2005.

LEE JY, LOWELL CA, LEMAY DG, YOUN HS, RHEE SH, SOHN KH, JANG B, YE J, CHUNG JH, HWANG DH. The regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase by Src-family tyrosine kinases mediated through MyD88-independent signaling pathways of Toll-like receptor 4. *Biochem Pharmacol*. 15;70(8):1231-40, 2005.

LEY K, LAUDANNA C, CYBULSKY MI, NOURSHARGH S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 7(9):678-89, 2007.

LIN CF, TSAI CC, HUANG WC, WANG CY, TSENG HC, WANG Y, KAI JI, WANG SW, CHENG YL. IFN- γ synergizes with LPS to induce nitric oxide biosynthesis through glycogen synthase kinase-3-inhibited IL-10. *J Cell Biochem*. 2008.

LINDEMANN S, SHARAFI M, SPIECKER M, BUERKE M, FISCH A, GROSSER T, VEIT K, GIERER C, IBE W, MEYER J, DARIUS H. NO reduces PMN adhesion to human vascular endothelial cells due to downregulation of ICAM-1 mRNA and surface expression. *Thromb Res*. 1;97(3):113-23, 2000.

LORENZI, T. *Manual de hematologia – propedêutica e clínica*. 2.ed. São Paulo: MEDSI, 1999.

LORENZON P, VECILE E, NARDON E, FERRERO E, HARLAN JM, TEDESCO F, DOBRINA A. Endothelial cell E- and P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 function as signaling receptors. *J Cell Biol.* 7;142(5):1381-91, 1998.

LUTZKY VP, CARNEVALE RP, ALVAREZ MJ, MAFFIA PC, ZITTERMANN SI, PODHAJECER OL, ISSEKUTZ AC, CHULUYAN HE. Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) recycles and induces cell growth inhibition on human tumor cell lines. *J Cell Biochem.* 1;98(5):1334-50, 2006.

MARZOCCO S, DI PAOLA R, SERRAINO I, SORRENTINO R, MELI R, MATTACERASO G, CUZZOCREA S, PINTO A, AUTORE G. Effect of methylguanidine in carrageenan-induced acute inflammation in the rats. *Eur J Pharmacol.* 26;484(2-3):341-50, 2004.

MATHEW EC, SHAW JM, BONILLA FA, LAW SK, WRIGHT DA. A novel point mutation in CD18 causing the expression of dysfunctional CD11/CD18 leucocyte integrins in a patient with leucocyte adhesion deficiency (LAD). *Clin Exp Immunol.* 121(1):133-8, 2000.

MCCAFFERTY DM, MUDGETT JS, SWAIN MG, KUBES P. Inducible nitric oxide synthase plays a critical role in resolving intestinal inflammation. *Gastroenterology.* 112(3):1022-7, 1997.

MEAGER A. Cytokine regulation of cellular adhesion molecule expression in inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 10(1):27-39, 1999.

MEDEIROS MV, BINHARA IM, MORENO JUNIOR H, ZATZ R, DE NUCCI G, ANTUNES E. Effect of chronic nitric oxide synthesis inhibition on the inflammatory responses induced by carrageenin in rats. *Eur J Pharmacol.* 16;285(2):109-14, 1995.

MELLO SB, GUZZO ML, LISBOA LF, FARSKY SH. Pharmacological characterisation of arthritis induced by Bothrops jararaca venom in rabbits: a positive cross talk between bradykinin, nitric oxide and prostaglandin E2. *Mediators Inflamm.* 11(1):13-6, 2002.

MELLO SB, NOVAES GS, LAURINDO IM, MUSCARA MN, MACIEL FM, COSSERMELLI W. Nitric oxide synthase inhibitor influences prostaglandin and interleukin-1 production in experimental arthritic joints. *Inflamm Res.* 46(2):72-7, 1997.

MESTRINER FL, SPILLER F, LAURE HJ, SOUTO FO, TAVARES-MURTA BM, ROSA JC, BASILE-FILHO A, FERREIRA SH, GREENE LJ, CUNHA FQ. Acute-phase protein alpha-1-acid glycoprotein mediates neutrophil migration failure in sepsis by a nitric oxide-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 4;104(49):19595-600, 2007.

MICHAŁOWSKA-WENDER G, LOSY J, SZCZUCIŃSKI A, BIERNACKA-ŁUKANTY J, WENDER M. Effect of methylprednisolone treatment on expression of sPECAM-1 and CXCL10 chemokine in serum of MS patients. *Pharmacol Rep.* 58(6):920-3, 2006.

MILES PR, BOWMAN L, RENGASAMY A, HUFFMAN L. Constitutive nitric oxide production by rat alveolar macrophages. *Am J Physiol.* 274(3 Pt 1):L360-8, 1998.

MITCHELL DJ, YU J, TYML K. Local L-NAME decreases blood flow and increases leukocyte adhesion via CD18. *Am J Physiol.* 274(4 Pt 2):H1264-8, 1998.

MOORE KW, DE WAAL MALEFYT R, COFFMAN RL, O'GARRA A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.*19:683-765, 2001.

MOORE PK, AL-SWAYEH OA, CHONG NWS, EVANS RA, GIBSON A. L-N^G-nitro arginine (L-NOARG), a novel L-arginine reversible inhibitor of endothelium dependent vasodilation *in vitro*. *Br J Pharmacol.* 99:408-12, 1990.

MORENO SE, ALVES-FILHO JC, BERTOZI G, ALFAYA TM, THEZE J, FERREIRA SH, VARGAFTIG BB. Systemic administration of interleukin-2 inhibits inflammatory neutrophil migration: role of nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 148(8):1060-6, 2006.

MOUNT PF, KEMP BE, POWER DA. Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol.* 42(2):271-9, 2007.

NAGABABU E, RIFKIND JM. Measurement of plasma nitrite by chemiluminescence without interference of S-, N-nitroso and nitrated species. *Free Radic Biol Med.* 15;42(8):1146-54, 2007.

NEWMAN PJ, NEWMAN DK. Signal transduction pathways mediated by PECAM-1: new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1;23(6):953-64, 2003.

NIU XF, SMITH CW, KUBES P. Intracellular oxidative stress induced by nitric oxide synthesis inhibition increases endothelial cell adhesion to neutrophils. *Circ Res.* 74(6):1133-40, 1994.

NOLAN S, DIXON R, NORMAN K, HELLEWELL P, RIDGER V. Nitric oxide regulates neutrophil migration through microparticle formation. *Am J Pathol.* 172(1):265-73, 2008.

OPAL SM & DEPALO VA. Anti-inflammatory cytokines. *CHEST.* 117: 1162 – 1172, 2000.

PALACIOS FA, NOVAES GS, GUZZO ML, LAURINDO IM, DE MELLO SB. Interrelationship of the kinin system, nitric oxide and eicosanoids in the antigen-induced arthritis in rabbits. *Mediators Inflamm.* 8(4-5):245-51, 1999.

PARRISH W, ULLOA L. High-mobility group box-1 isoforms as potential therapeutic targets in sepsis. *Methods Mol Biol.* 361:145-62, 2007.

PASVOLSKY R, FEIGELSON SW, KILIC SS, SIMON AJ, TAL-LAPIDOT G, GRABOVSKY V, CRITTENDEN JR, AMARIGLIO N, SAFRAN M, GRAYBIEL AM, RECHAVI G, BEN-DOR S, ETZIONI A, ALON R. A LAD-III syndrome is associated with defective expression of the Rap-1 activator CalDAG-GEFI in lymphocytes, neutrophils, and platelets. *J Exp Med.* 9;204(7):1571-82, 2007.

PAYA M, GARCIA PASTOR P, COLOMA J, ALCARAZ MJ. Nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase pathways in the inflammatory response induced by zymosan in the rat air pouch. *Br J Pharmacol.* 120(8):1445-52, 1997.

PENG HB, LIBBY P, LIAO JK. Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. *J Biol Chem.* 9;270(23):14214-9, 1995.

PETRI B, BIXEL MG. Molecular events during leukocyte diapedesis. *FEBS J.* 273(19):4399-407, 2006.

PETRUZZELLI L, TAKAMI M, HUMES HD. Structure and function of cell adhesion molecules. *Am J Med.* 106(4):467-76, 1999.

PFEIFFER S, LEOPOLD E, SCHMIDT K, BRUNNER F, MAYER B. Inhibition of nitric oxide synthesis by NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, NG-nitro-L-arginine. *Br J Pharmacol.* 118(6):1433-40, 1996.

PHILLIPS ML, SCHWARTZ BR, ETZIONI A, BAYER R, OCHS HD, PAULSON JC, HARLAN JM. Neutrophil adhesion in leukocyte adhesion deficiency syndrome type 2. *J Clin Invest.* 96(6):2898-906, 1995.

POBER J, COTRAN RS. What can be learned from the expression of endothelial adhesion molecules in tissues? *Lab Invest.* 64(3):301-5, 1991.

RAMPART, M. Neutrophil-endothelial cell interactions. In: Brain, S.D. (ed) *The Handbook of Immunopharmacology. Immunopharmacology of Microcirculation.* Ed., San Diego, Academic Press: 77-107, 1994.

RAZAVI HM, WANG LF, WEICKER S, ROHAN M, LAW C, MCCORMACK DG, MEHTA S. Pulmonary neutrophil infiltration in murine sepsis: role of inducible nitric oxide synthase. *Am J Respir Crit Care Med.*,170:227-233, 2004.

REN D, SUN R, WANG S. Role of inducible nitric oxide synthase expressed by alveolar macrophages in high mobility group box 1--induced acute lung injury. *Inflamm Res.* 55(5):207-15, 2006.

REYNAERT NL, CKLESS K, KORN SH, VOS N, GUALA AS, WOUTERS EF, VAN DER VLIET A, JANSSEN-HEININGER YM. Nitric oxide represses inhibitory kappa B kinase through S nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15;101(24):8945-50, 2004.

RIOS-SANTOS F, ALVES-FILHO JC, SOUTO FO, SPILLER F, FREITAS A, LOTUFO CM, SOARES MB, DOS SANTOS RR, TEIXEIRA MM, CUNHA FQ. Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med.* 1;175(5):490-7, 2007.

ROMAN A, MCGAHREN ED. L-NAME-induced neutrophil accumulation in rat lung is not entirely because of interactions with L- and P-selectins or CD18. *J Pediatr Surg.* 41(10):1743-9, 2006.

ROY A, JANA A, YATISH K, FREIDT MB, FUNG YK, MARTINSON JA, PAHAN K. Reactive oxygen species up-regulate CD11b in microglia via nitric oxide: Implications for neurodegenerative diseases. *Free Radic Biol Med.* 1;45(5):686-99, 2008.

SALMI M, JALKANEN S. Developmental regulation of the adhesive and enzymatic activity of vascular adhesion protein-1 (VAP-1) in humans. *Blood.*1;108(5):1555-61, 2006.

SALMI M, JALKANEN S. VAP-1: an adhesin and an enzyme. *Trends Immunol.* 22(4):211-6, 2001.

SALVEMINI D, WANG ZQ, WYATT PS, BOURDON DM, MARINO MH, MANNING PT, CURRIE MG. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *Br J Pharmacol.* 118(4):829-38, 1996.

SANZ MJ, HICKEY MJ, JOHNSTON B, MCCAFFERTY DM, RAHARJO E, HUANG PL, KUBES P. Neuronal nitric oxide synthase (NOS) regulates leukocyte-endothelial cell interactions in endothelial NOS deficient mice. *Br J Pharmacol.* 134(2):305-12, 2001.

SCHACHTER H. Congenital disorders involving defective N-glycosylation of proteins. *Cell Mol Life Sci.* 58(8):1085-104, 2001.

SECCO DD, PARON JA, DE OLIVEIRA SH, FERREIRA SH, SILVA JS, CUNHA FDE Q. Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. *Nitric Oxide.* 9(3):153-64, 2004.

SHINJI H, SEKI K, TAJIMA A, UCHIDA A, MASUDA S. Fibronectin bound to the surface of *Staphylococcus aureus* induces association of very late antigen 5 and intracellular signaling factors with macrophage cytoskeleton. *Infect Immun.* 71(1):140-6, 2003.

SMALLEY DM, LEY K. L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *J Cell Mol Med.* 9(2):255-66, 2005.

SPERANDIO M. Selectins and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo. *FEBS J.* 273(19):4377-89, 2006.

SPIECKER M, DARIUS H, KABOTH K, HUBNER F, LIAO JK. Differential regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by nitric oxide donors and antioxidants. *J Leukoc Biol.* 63(6):732-9, 1998.

STANARIUS A, SEIDEL B, WOLF G. Neuronal nitric oxide synthase in the vasculature of the rat brain: an immunocytochemical study using the tyramide signal amplification technique. *J Neurocytol.* 27(10):731-6, 1998.

STAUNTON DE, DUSTIN ML, ERICKSON HP, SPRINGER TA. The arrangement of the immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus. *Cell.* 20;61(2):243-54, 1990.

STRAUSBAUGH HJ, ROSEN SD. A potential role for annexin 1 as a physiologic mediator of glucocorticoid-induced L-selectin shedding from myeloid cells. *J Immunol.* 15;166(10):6294-300, 2001.

STUEHR D, POU S, ROSEN GM. Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. *J Biol Chem.* 4;276(18):14533-6, 2001.

STUEHR DJ & MARLETTA MA. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82(22):7738-42, 1985.

SUEMATSU M, TAMATANI T, DELANO FA, MIYASAKA M, FORREST M, SUZUKI H, SCHMID-SCHONBEIN GW. Microvascular oxidative stress preceding leukocyte activation elicited by in vivo nitric oxide suppression. *Am J Physiol.* 266(6 Pt 2):H2410-5, 1994.

TABRIZI-FARD MA, FUNG HL. Pharmacokinetics, plasma protein binding and urinary excretion of N omega-nitro-L-arginine in rats. *Br J Pharmacol.* 111(2):394-6, 1994.

TAMARU M, NARUMI S. E-selectin gene expression is induced synergistically with the coexistence of activated classic protein kinase C and signals elicited by interleukin-1beta but not tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem.* 274(6):3753-63, 1999.

TANG DG, CHEN YQ, NEWMAN PJ, SHI L, GAO X, DIGLIO CA, HONN KV. Identification of PECAM-1 in solid tumor cells and its potential involvement in tumor cell adhesion to endothelium. *J Biol Chem.* 268(30):22883-94, 1993.

TAVARES-MURTA BM, MACHADO JS, FERREIRA SH, CUNHA FQ. Nitric oxide mediates the inhibition of neutrophil migration induced by systemic administration of LPS. *Inflammation.* 25(4):247-53, 2001.

TEIXEIRA SA, CASTRO GM, PAPES F, MARTINS ML, ROGÉRIO F, LANGONE F, SANTOS LM, ARRUDA P, DE NUCCI G, MUSCARÁ MN. Expression and activity of nitric oxide synthase isoforms in rat brain during the development of experimental allergic encephalomyelitis. *Brain Res Mol Brain Res.* 28;99(1):17-25, 2002.

TEIXEIRA SA, VARRIANO AA, DIAS AA, MARTINS PORTO R, MUSCARÁ MN. Nitric oxide synthase activity and endogenous inhibitors in rats recovered from allergic encephalomyelitis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 100 Suppl 1:25-7, 2005.

TEN BROEKE R, DE CROM R, VAN HAPEREN R, VERWEIJ V, LEUSINK-MUIS T, VAN ARK I, DE CLERCK F, NIJKAMP FP, FOLKERTS G. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase suppresses features of allergic asthma in mice. *Respir Res.* 5;7:58, 2006.

TOHKA S, LAUKKANEN M, JALKANEN S, SALMI M. Vascular adhesion protein 1 (VAP-1) functions as a molecular brake during granulocyte rolling and mediates recruitment in vivo. *FASEB J.* 15(2):373-82, 2001. Erratum in: *FASEB J.* Apr;15(6):1115, 2001.

TORRES-DUEÑAS D, CELES MR, FREITAS A, ALVES-FILHO JC, SPILLER F, DAL - SECCO D, DALTO VF, ROSSI MA, FERREIRA SH, CUNHA FQ. Peroxynitrite mediates the failure of neutrophil migration in severe polymicrobial sepsis in mice. *Br J Pharmacol.* 152(3):341-52, 2007.

VALLANCE BA, DIJKSTRA G, QIU B, VAN DER WAAIJ LA, VAN GOOR H, JANSEN PL, MASHIMO H, COLLINS SM. Relative contributions of NOS isoforms during experimental colitis:endothelial-derived NOS maintains mucosal integrity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 287(4):G865-74, 2004.

VAN DAMME J, SCHAAFSMA MR, FIBBE WE, FALKENBURG JH, OPDENAKKER G, BILLIAU A. Simultaneous production of interleukin 6, interferon-beta and colony-stimulating activity by fibroblasts after viral and bacterial infection. *Eur J Immunol*. 19(1):163-8, 1989.

VAN EIJK HM, LUIKING YC, DEUTZ NE. Methods using stable isotopes to measure nitric oxide (NO) synthesis in the L-arginine/NO pathway in health and disease. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 15;851(1-2):172-85, 2007.

VEGA A, CHACÓN P, MONTESEIRÍN J, EL BEKAY R, ALVAREZ M, ALBA G, CONDE J, MARTÍN-NIETO J, BEDOYA FJ, PINTADO E, SOBRINO F. A new role for monoamine oxidases in the modulation of macrophage-inducible nitric oxide synthase gene expression. *J Leukoc Biol*. 75(6):1093-101, 2004.

WANG SZ, SMITH PK, LOVEJOY M, BOWDEN JJ, ALPERS JH, FORSYTH KD. Shedding of L-selectin and PECAM-1 and upregulation of Mac-1 and ICAM-1 on neutrophils in RSV bronchiolitis. *Am J Physiol*. 275(5 Pt 1):L983-9, 1998.

WIEDLE G, DUNON D, IMHOF BA. Current concepts in lymphocyte homing and recirculation. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci*. 38(1):1-31, 2001.

WONG GH, ELWELL JH, OBERLEY LW, GOERDDEL DV. Manganese superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. *Cell*. 58: 923 – 931, 1989.

WONG MX, HARBOUR SN, WEE JL, LAU LM, ANDREWS RK, JACKSON DE. Proteolytic cleavage of platelet endothelial cell adhesion molecule-1(PECAM-1/CD31) is regulated by a calmodulin-binding motif. *FEBS Lett*. 18;568(1-3):70-8, 2004.

WOO CH, LIM JH, KIM JH. VCAM-1 upregulation via PKCdelta-p38 kinase-linked cascade mediates the TNF-alpha-induced leukocyte adhesion and emigration in the lung airway epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 288(2):L307-16, 2005.

WOODFIN A, VOISIN MB, NOURSHARGH S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 27(12):2514-23, 2007.

YANG L, FROIO RM, SCIUTO TE, DVORAK AM, ALON R, LUSCINSKAS FW. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. *Blood*. 15;106(2):584-92, 2005.

YANG W, SHIMAOKA M, CHEN J, SPRINGER TA. Activation of integrin beta-subunit I-like domains by one-turn C-terminal alpha-helix deletions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 24;101(8):2333-8, 2004.

YU ML, LIMPER AH. Pneumocystis carinii induces ICAM-1 expression in lung epithelial cells through a TNF-alpha-mediated mechanism. *Am J Physiol*. 273(6 Pt 1):L1103-11, 1997.

YUSUF-MAKAGIANSAR H, ANDERSON ME, YAKOVLEVA TV, MURRAY JS, SIAHAAN TJ. Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. *Med Res Rev*. 22(2):146-67, 2002.

ZAJKOWSKA J, GRYGORCZUK S, KONDRUSIK M, PANCEWICZ S, JAMIOŁKOWSKI J, MUSZYŃSKA A, HERMANOWSKA-SZPAKOWICZ T. Concentrations of soluble forms of adhesive particles: sVCAM-1, sPECAM-1, sVAP in early localized and late disseminated borreliosis. *Pol Merkur Lekarski*. 21(125):459-64, 2006.

ZIPRIN P, RIDGWAY PF, PFISTERMULLER KL, PECK DH, DARZI AW. ICAM-1 mediated tumor-mesothelial cell adhesion is modulated by IL-6 and TNF-alpha: a potential mechanism by which surgical trauma increases peritoneal metastases. *Cell Commun Adhes*. 10(3):141-54, 2003.

APÊNDICE

Apêndice: Artigo Submetido Durante o Estudo

**MECHANISMS INVOLVED IN REDUCED LEUCOCYTE MIGRATION
EVOKED BY CHRONIC BLOCKADE OF NITRIC OXIDE SYNTHESIS**

Running title: leucocyte migration and blockade of NO synthesis

CB Hebeda¹, S Teixeira², MN Muscará², SBV de Mello³, SHP Farsky¹

¹ Department of Clinical and Toxicological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

² Department of Pharmacology, Institute of Biological Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

³ Rheumatology Division, Department of Internal Medicine, School of Medicine, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

Corresponding author: Dr Sandra HP Farsky

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Av Prof Lineu Prestes 580 - Bl 13 B

05508-900 - Sao Paulo - SP, Brazil

E-mail: sfarsky@usp.br

Summary

Background and purpose: Chronic L-NAME treatment reduced leucocyte migration into the inflammatory focus, which was partially dependent on impaired leucocyte-endothelium interactions. Herein, we clarify the absence of nitric oxide (NO) on glucocorticoid secretion, synthesis and expression of adhesion molecules in leucocytes and endothelial cells.

Experimental approach: Male Wistar rats were treated for 14 days with 20 mg kg⁻¹ L-NAME dissolved in drinking water. Control animals received only water. Activity of total, Ca⁺²-dependent and independent nitric oxide synthase (NOS) was evaluated in brain tissue. Expression of L-selectin, β_2 -integrin, and PECAM-1 was quantified in circulating leucocytes by flow cytometry. Expression of E-selectin, PECAM-1, ICAM-1, and VCAM-1 was assessed in vessels of the cremaster muscle using immunohistochemistry assay. mRNA levels of L-selectin and PECAM-1 were quantified in by RT-PCR assay. Plasma levels of corticosterone were quantified by ELISA.

Key results: L-NAME treatment almost abolished the activities of total and Ca⁺²-dependent NOS, characterizing a deficiency in NO production. The treatment promoted reduction in leucocyte migration into LPS-inflamed peritoneum; did not change corticosterone levels; reduced the basal expression of L-selectin and PECAM-1 in circulating leucocytes and impaired PECAM-1 expression in endothelial cells in both with or without LPS-stimulation. Only impairment in the expression of L-selectin reflected

deficiency in its synthesis, since mRNA levels were reduced in leucocytes from L-NAME-treated rats.

Conclusions and Implications: The results presented herein reveal the role of NO in the expression of constitutive adhesion molecules by distinct mechanisms and confirm the NO pro-inflammatory activity in leucocyte-endothelium interactions.

Keywords: nitric oxide, NOS activity, *in vivo* chronic L-NAME treatment, oral route, leucocyte, endothelial cell, LPS- induced peritonitis, L-selectin, PECAM-1, glucocorticoids.

Abbreviations:

L-NAME, N-(G)-nitro-L-arginine methyl ester; NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide synthase; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; PECAM-1, platelet endothelial cell adhesion molecule; ICAM-1, intercellular cell adhesion molecule; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule.

Introduction

Nitric oxide (NO) is a water-soluble gas produced through oxidation of L-arginine guanidine group by the nitric oxide synthase (NOS) family of enzymes (Moncada *et al.*, 1997). This diatomic mediator has been recognized as one of the most versatile players in the immune system, where it exerts pro- or anti-inflammatory effects. These differences have been ascribed to disease states, tissues studied, schedules of NOS inhibition, time-points under investigation, and concentration of NO at the site and/or its enzymatic source (Rawlingson, 2003; Hickey *et al.*, 2001).

Knockout animals and pharmacological inhibitors of NOS were designed to investigate the participation of NO in the inflammatory process. L-NAME is an L-arginine analogue that acts as a competitive inhibitor of constitutive and inducible NOS experimentally employed in *in vivo* and *in vitro* assays (Moncada *et al.*, 1989; Kubes *et al.*, 1991; Salvemini *et al.*, 1996; Yudoh *et al.*, 1997; Farsky *et al.*, 2004).

Leucocyte migration depends on specific adhesive interactions between circulating cells and endothelium of the microvascular network, which guide leucocytes in the vascular compartment towards the interstitial tissue. The steps in this process include capture and rolling of leucocytes along the endothelium, followed by firm adherence and subsequent transmigration through the endothelial cell barrier (Granger and Kubes, 1994; Worthylake and Burridge, 2001). It is well established that all this process is strongly coordinated by sequential expression of adhesion molecules. Initial

attachment is mainly mediated by selectins, whereas adhesion and crawling into an adjacent tissue are controlled by integrins and members of the immunoglobulin superfamily (Muller and Randolph, 1999; Nourshargh and Marelli-Berg, 2005; Zarbock and Ley, 2008).

It was described that acute blockade of NO production enhances leucocyte-endothelium interactions and neutrophil migration to the inflammatory site (Alves-Filho *et al.*, 2005; Dal Secco *et al.*, 2006). Genetically NOS-depleted animals, as well as acute treatment with high concentrations of NO donors showed that this gas controls rolling and adherence of cells to post capillary venules in the microcirculation (Kubes *et al.*, 1991; Kubes *et al.*, 1993; Hickey *et al.*, 1997). Furthermore, NO impairs the expression of neutrophil integrins (Kubes *et al.*, 1991; Mitchell *et al.*, 1998; Klink *et al.*, 2007), endothelial selectins (Ahluwalia *et al.*, 2004; Nabah *et al.*, 2005), and immunoglobulins (De Caterina *et al.*, 1995; Adams *et al.*, 1997; Lindemann *et al.*, 2000; Hickey, 2001; Nabah *et al.*, 2005; Lozano *et al.*, 2005). Taken together, these results characterize NO as an anti-inflammatory mediator.

On the other hand, it was shown that inhibition of NO synthesis reduces cell infiltration into the inflammatory focus, as well as the levels of tumour necrosis factor alpha (TNF- α) and prostaglandin E₂ (PGE₂) in the inflammatory exudate of carrageenan-induced pleurisy and paw oedema (Salvemini *et al.*, 1996; Marzocco *et al.* 2004). We have confirmed these data using a chronic treatment with L-NAME in different models of

inflammation. Male Wistar rats and New Zealand rabbits presented diminished vascular permeability and leucocyte migration into inflamed- air pouch cavity and antigen-induced arthritis, respectively (Palacios *et al.*, 1999; Farsky *et al.*, 2004). Reduction in L-selectin expression in membranes of neutrophils from bone marrow or blood stream may be partly responsible for accelerated neutrophil delivery from bone marrow and its standstill in the peripheral compartment. It is important to emphasize that these results do not depend on haemodynamic changes. The schedule of L-NAME treatment did not alter the systemic and microvascular pressure, and inhibition of leucocyte trafficking was not completely reversed by losartan, an antihypertensive agent (Palacios *et al.*, 1999; Farsky *et al.*, 2004).

The main purpose of this study was to investigate the mechanisms of NO control of leucocyte-endothelium interactions. By blocking NOS activity for a prolonged period of time, we corroborated the pro-inflammatory action of NO on leucocyte recruitment and demonstrated that NO modulates the expression of constitutive adhesion molecules in white blood cells and endothelium by a distinct mechanism, not dependent on enhanced glucocorticoid secretion.

Methods

Animals

Male Wistar rats weighing 180-220g at the beginning of the experiments were used. The animals were fed a standard pellet diet and water *ad libitum*, and before each experimental procedure, they were anaesthetized with sodium pentobarbital (65 mg kg⁻¹, i.p.) to avoid stress. All procedures were carried out according to the protocols approved by the local Committee for Ethical Surveillance in Animal Experimentation (COBEA) for proper care and use of experimental animals.

L-NAME treatment

A group of animals was randomly treated with L-NAME (20 mg kg⁻¹ day⁻¹, 14 days) dissolved in the drinking water. The drug was administered for two weeks, and then the experiments were performed. Control animals received only water.

Ca⁺²-dependent and -independent NOS activity

Ex vivo NOS activity was evaluated in whole-brain homogenates to analyze the efficacy of L-NAME treatment. The ability of a whole-brain homogenate to convert [³H] L-arginine to [³H] L- citrulline was measured according to Faria *et al.* (1996). Briefly, two hours after the last dose of

treatments, the animals were anaesthetized and brain samples were rapidly removed. The samples were homogenized in 5 volumes of cold incubation buffer (50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4) containing phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF; 1 mM) and L-citrulline (1 mM). The homogenates were incubated for 30 min in the presence of NADPH (1mM), CaCl_2 (2 mM) and L-arginine (10 μM) containing 100 000 dpm of [2,3,4,5- ^3H] L-arginine monohydrochloride at room temperature (25–27°C). Pharmacological controls of enzymatic activity were carried out in parallel and consisted of either the omission of CaCl_2 and addition of either EGTA (1 mM) or L-NAME (1 mM) to the incubation medium. The protein content of the samples was determined according to the method of Peterson (1977) and the activity of brain NO synthase was expressed as pmol L-citrulline produced $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ of protein.

***In vivo* leucocyte migration to the peritoneal cavity**

Leucocyte migration into the peritoneal cavity was determined 4 h after lipopolysaccharide (LPS) injection (5 mg kg^{-1}). The rats were killed and the peritoneal cavity cells were harvested by washing the cavity with PBS (10 ml). The volumes recovered were similar in all experimental groups and corresponded to approximately 95% of the injected volume. Total counts were performed in a Neubauer chamber and differential cell counts (100 cells total) were carried out on cytocentrifuge (Cytospin; FANEN, Sao Paulo, SP, Brazil) slides stained with May-Grumwald-Giemsa. The results

are presented as the number polymorphonuclear (PMN) and mononuclear (MN) in cavity.

Determination of levels of circulating corticosterone

Rats were killed by decapitation and trunk blood was collected. Serum was isolated by centrifugation (5 min; 1000 g) and utilized to determine the levels of circulating corticosterone with a commercial ELISA-based kit. Briefly, a polyclonal anti-rat corticosterone antibody was applied onto the inner surface of polystyrene plate wells. Calibrators, controls, and diluted samples were incubated overnight, 2 to 8 °C, with enzyme horseradish peroxidase-labelled corticosterone in antibody-coated wells. The wells were washed and colour was developed using 3,3'-5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) as a chromogenic substrate. The reaction was stopped and the absorbance was measured in a microplate reader (Power Wave X340, Bio Tek Instruments INC, USA); the intensity of colour so developed was shown to be inversely proportional to the concentration of corticosterone.

Flow cytometry

In order to quantify the expression of L-selectin and β_2 -integrin, leucocytes were obtained from control and L-NAME-treated rats in basal condition or 4 h after inflammation induced by LPS injection (5 mg kg⁻¹; i.p.). Blood was collected from the abdominal aorta using EDTA (2 mg ml⁻¹)

as anticoagulant. Briefly, erythrocytes were lysed by addition of ammonium chloride solution (0.13 M) to the samples and leucocytes were recovered after washing with Hank's balanced salt solution (HBSS). To quantify the expression of adhesion molecules, leucocytes (1×10^6) were incubated (20 min, 4 °C) in the dark with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated L-selectin monoclonal antibody (10 μ l; 1:10) or FITC-conjugated β_2 -integrin (10 μ l; 1:10) or phycoerythrin (PE)-conjugated PECAM-1 monoclonal antibodies (10 μ l; 1:50). After that, the cells were analysed in a FACScalibur flow cytometer (Becton & Dickinson, San Jose, CA, USA). Data from 10,000 cells were obtained and only morphologically viable leucocytes were analysed. Results are presented as arbitrary units of fluorescence intensity.

Immunohistochemistry

Animals were anaesthetized and their testes were surgically removed. They were immediately frozen in nitrogen-hexan solution, cryosectioned (8 μ m thickness) and fixed in cold acetone (10 min). For direct immunohistochemistry assay, sections were incubated with H₂O₂ (3%) or Superblock solution to block the activities of endogenous peroxidase and biotin, respectively. This was followed by overnight incubation (in a humidified box, 4 °C) with purified anti-rat E-selectin. Sections were incubated (60 min) with streptavidin-conjugated peroxidase. Colour was developed by the addition of 3,3-diaminobenzidine (DAB).

Sections were lightly stained in haematoxylin and dehydrated with ethanol and xylene. Another set of immunohistochemistry assays was performed using antibodies conjugated with a fluorochrome. First, sections were incubated overnight with Superblock solution to avoid nonspecific binding. After that, sections were incubated overnight with FITC-conjugated ICAM-1, or PE-conjugated PECAM-1 or VCAM-1. DAB- or fluorescent-stained areas of vessel walls were selected and the colour or fluorescence intensity was quantified using an image analyzer software (KS 300, Kontron Elektronik, Carl-Zeiss, Germany). In order to evaluate the background reaction, the same procedures were also carried out in sections of testes incubated without antibody or using goat anti-mouse immunoglobulin G.

Reverse Transcriptase - PCR

cDNA was synthesized from total RNA (2 µg) using an oligo(dT)₁₅ primer (20 µg ml⁻¹) after incubation (70 °C, 5 min) in the presence of deoxynucleotide triphosphate mixture (dNTP, 2 mM), ribonuclease inhibitor (20 U) and Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase (200 U) in Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase buffer (25 µl final volume). The reverse transcription occurred by incubation (42 °C, 60 min). For PCR, the cDNA obtained was incubated with Taq DNA Polymerase (2.5 U), 3'- and 5'- specific primers (0.4 µM) and dNTP mix (200 µM) in buffer-thermophilic DNA polymerase containing MgCl₂ (1.5 mM). The following primer sequences were used: GAPDH, 5'-TATGATGACATCAAGAAGGTGG-

3'(forward) and 5'-CACCACCCTGTTGCTGTA-3' (reverse), L-selectin, 5'-AACGAGACTCTGGGAAGT-3' (forward) and 5'-CAAAGGCTCACATTGGAT-3' (reverse), and PECAM-1, 5'-TCTCCATCCTGTCTGGGTAACG-3' (forward) and 5'-CTTGGGTGTCATTACGGTTTC-3' (reverse).

Data and statistical analyses

Mean and standard error of the mean (s.e.m.) of all data presented herein were compared by Student's *t*-test or ANOVA. Turkey's multiple comparisons or Newman-Keuls test were made to determine the significance of differences calculated between the values for the experimental conditions. GraphPad Prism 4.0 software (San Diego, CA, USA) was used. The differences were considered significant for $P < 0.05$.

Drugs, chemicals, reagents, and other materials

L-selectin monoclonal antibody conjugated with FITC (anti-rat CD62L), β_2 -integrin monoclonal antibody conjugated with FITC (anti-rat CD18), ICAM-1 monoclonal antibody conjugated with FITC (anti-rat CD54), PECAM-1 monoclonal antibody conjugated with PE (anti-rat CD31), VCAM-1 monoclonal antibody conjugated with PE (anti-rat CD106), P-selectin polyclonal purified (anti-rat CD62P) and biotinylated anti-mouse immunoglobulin G secondary antibody were purchased from BD PharMingen Technical (San Diego, CA, USA). Anti-rat E-selectin monoclonal antibody was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Sodium pentobarbital was purchased from Cristália (São Paulo,

Brazil). L-NAME, LPS (E. Coli serotype 026:B6), EDTA, EGTA, NADPH, May-Grumwald-Giemsa, 3,3-diaminebenzidine, Tris-HCl buffer, PMSF, L-citrulline, [2,3,4,5-³H] L-arginine monohydrochloride were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). IDS OCTEIA Corticosterone ELISA-based kit was purchased from Immunodiagnostic Systems Limited (Baldon, UK). Phosphate buffered saline was purchased from EMD Chemicals (Darmstadt, Germany). Trizol reagent was purchased from Invitrogen (Grand Island, NY, USA). Oligo(dT)₁₅ primer, ribonuclease inhibitor, dNTP mix, Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase, Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase buffer, Taq DNA Polymerase, buffer-thermophilic DNA polymerase were purchased from Promega (Madison, WI, USA). Streptavidin conjugated with peroxidase, and goat anti-mouse immunoglobulin G antibody were purchased from Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA); Superblock solution from Pierce (Rockford, IL, USA); acetone, ammonium chloride, calcium chloride, ethanol, haematoxylin, H₂O₂, hexan solution, saline solution, xylene, and Hank`s balanced salt solution were purchased from Labsynth (São Paulo, Brazil).

Results

***In vivo* treatment with L- NAME markedly inhibits Ca^{+2} -dependent NOS activity**

NOS activity was evaluated in brain tissue from animals two hours after treatment with L-NAME was interrupted. Results in Figure 1 show that treatment with L-NAME evoked more than 90% inhibition on total NOS activity as compared to values found in control-rat tissue (A). A similar decrease was also observed in Ca^{+2} -dependent NOS activity (B). Treatment with L-NAME did not significantly affect the lower activity of Ca^{+2} -independent NOS activity (C).

***In vivo* treatment with L-NAME reduces migration of leucocytes into the LPS-inflamed peritoneum**

Quantification of leucocytes in the inflamed peritoneum showed that the number of PMN and MN leucocytes in the peritoneal cavity was significantly lower than that observed in vehicle-treated animals 4 h after local injection of LPS (Figure 2). It is noteworthy that the treatment did not change the basal number of cells in the peritoneum, since PMN and MN count was equivalent in absence of inflammation in both groups (Control rats: PMN= 14.20 ± 1.56 (n=5); MN= 85.80 ± 1.92 (n=5); L-NAME-treated rats= PMN= 13.83 ± 1.20 (n=6); MN= 86.17 ± 1.37 (n=6).

***In vivo* treatment with L-NAME does not modify the levels of circulating corticosterone**

In order to evaluate participation of glucocorticoids in reducing migration of cells into the peritoneum, circulating levels of corticosterone were measured. Figure 3 shows that hormone levels in serum of L-NAME-treated or control animals are equivalent.

Differential action of *in vivo* treatment with L-NAME on the expression of adhesion molecules in circulating leucocytes

Results presented in Figure 4 show that leucocytes from blood of L-NAME-treated animals presented reduced expression of L-selectin (A) and PECAM-1 (B) as compared to values found in cells from control animals. Impaired expression was detected in both MN and PMN leucocytes. Differently, expression of β_2 -integrin (C) was not modified by treatment with L-NAME .

mRNA levels of L-selectin and PECAM-1 was quantified on circulating leucocytes to evaluate the role of L-NAME treatment on gene expression of these molecules. The RT-PCR assays showed that treatment with L-NAME reduces L-selectin mRNA (D) and do not change PECAM-1 mRNA levels (E). A representative image of agarose gel eletrophoresis is presented in Figure 4F.

Differential action of *in vivo* treatment with L-NAME on the expression of adhesion molecules in endothelial cells

Expression of E-selectin, PECAM-1, ICAM-1, and VCAM-1 was evaluated by immunohistochemistry assay in endothelial cells from the cremaster muscle vessels. Treatment with L-NAME did not modify E-selectin, ICAM-1, and VCAM-1 expression. On the other hand, diminished PECAM-1 expression was observed on tissue obtained from L-NAME-treated rats as compared to control animals (Figure 5 A). A representative picture for the expression of PECAM-1 on control and L-NAME-treated rats is shown in Figure 5B.

In order to evaluate the role of L-NAME treatment in PECAM-1 synthesis, the cremaster muscle was collected from animals, and mRNA was extracted to be employed in RT-PCR assays. These data showed that treatment with L-NAME did not affect PECAM-1 mRNA expression (Figure 5C). A representative image of agarose gel eletrophoresis is presented in Figure 5D.

***In vivo* treatment with L-NAME impairs PECAM-1 expression on the cremaster muscle during LPS-induced inflammation**

Leucocytes and the cremaster muscle were obtained from control and L-NAME-treated animals 4 h after i.p. injection of LPS and utilized to quantify the expression of adhesion molecules. Results presented show

that treatment with L-NAME did not change the expression of L-selectin, β_2 -integrin, and PECAM-1 in circulating leucocytes (Figure 6A) and E-selectin, ICAM-1, and VCAM-1 in endothelial cells (Figure 6B). Although, the expression of PECAM-1 in endothelium remained reduced after LPS injection (Figure 6B). PECAM-1 gene expression was not altered, since the levels of mRNA were similar in cremaster tissues of both L-NAME-treated and control animals (Figure 6C). A representative image of agarose gel electrophoresis is presented in Figure 6D.

Discussion and conclusions

Data presented herein shows that endogenous NO has an important role in the expression of constitutive adhesion molecules and in leucocyte mobilization. Data supporting these conclusions were obtained in an *in vivo* non-specific blockade of NOS activities evoked by treatment with L-NAME chronically administered in drinking water. This treatment abolishes NOS activity and impairs leucocyte migration into the inflammatory focus and adhesion molecules expressions on both leucocytes and endothelium.

We have previously shown that the *in vivo* schedule treatment with L-NAME partially reduced the $\text{NO}^{2-}/\text{NO}^{3-}$ levels in the blood and in the inflammatory exudates in different models of inflammation (Guzzo *et al.*, 2000; Mello *et al.*, 2002; Farsky *et al.*, 2004; Hebeda *et al.*, 2005). However, determinations of $\text{NO}^{2-}/\text{NO}^{3-}$ do not predict the real effect of treatment with L-NAME, since these NO metabolites can be provided with water and diet (Wang *et al.*, 1997; Bryan *et al.*, 2008). Based on these observations, we evaluated herein the efficacy of treatment with L-NAME on the inhibition of NOS activity by quantifying the activity of total, Ca^{+2} -dependent and -independent NOS in the brain. Regarding that L-NAME would have to cross the blood-brain barrier to act, brain tissue was chosen because the effect could be assessed in a tissue with complex pharmacokinetic characteristics. Such approach was employed for *in vivo* treatments to investigate the efficacy of NO inhibitors (Teixeira *et al.*, 2002; 2005). Our data show that treatment with L-NAME inhibited the total and

Ca⁺²-dependent NOS activity. Since tissue was not stimulated, no significant difference was found in the Ca⁺²-independent NOS activities of control- and L-NAME-treated rats.

In previous studies, we have demonstrated that this schedule of L-NAME treatment impairs leucocyte migration in antigen-induced arthritis (Palácios *et al.*, 1999) and *Bothrops jararaca* venom-inflamed air pouch and articular cavity (Mello *et al.*, 1997; Farsky *et al.*, 2004). Such data were corroborated in the present study by a decreased migration of leucocytes into the LPS-inflamed peritoneal cavity of rats treated with L-NAME.

Endogenous glucocorticoids modulate the physiological leucocyte mobilization from bone marrow and its recruitment into inflammatory focus (Flower *et al.*, 1986; Farsky *et al.*, 1995; Pitzalis *et al.*, 2002; Cavalcanti *et al.*, 2006, 2007). Although the relationship between glucocorticoid secretion and NO production has been investigated, no conclusive evidence was presented until now. Glucocorticoids inhibit NO production and iNOS expression in several types of cells, implicating anti-inflammatory effects of these hormones in some diseases (Radomsky *et al.*, 1990; Di Rosa *et al.*, 1990; Szabo *et al.*, 1994; Hattori *et al.*, 1997; Bishayi *et al.*, 2003; White and Holda, 2004). Herein, we hypothesize that blockade of NOS activity could alter glucocorticoid secretion, thus modifying the inflammation process. However, data obtained excluded this inference, since treatment with L-NAME did not change the plasma levels of corticosterone.

By using intravital microscopy assay, we previously showed that treatment with L-NAME impairs the rolling and adherence behaviours in the cremaster muscle of rats in a non-stimulated condition, indicating a physiological role for NO in the initial interaction of leucocytes with the vessel wall. This effect was partly ascribed to a reduced expression of L-selectin in circulating leucocytes and to the maintenance of neutrophils in the vessel central compartment (Farsky *et al.*, 2004). We confirmed herein the role of NO in the control of constitutive adhesion molecules in both leucocytes and the endothelium. Expression of L-selectin and PECAM-1 was reduced in circulating leucocytes and expression of PECAM-1 was also impaired in endothelial cells of rats treated with L-NAME.

L-selectin is a constitutive molecule expressed by all circulating leucocytes, being required for leucocyte rolling. Its expression is controlled by changes in mRNA synthesis or by proteolytic cleavage immediately after cell activation (Kishimoto *et al.*, 1995; Venturi *et al.*, 2003; Zarbock and Ley, 2008). For the first time, we show herein that NO modulates the *in vivo* pre-translational expression of L-selectin, since reduced levels of mRNA were found in leucocytes collected from rats treated with L-NAME. Only recent results have indicated a role for NO in L-selectin expression. Nolan *et al.* (2008) showed that acute and *in vitro* treatment with L-NAME enhanced IL-8-induced human neutrophil migration in chemotaxis chamber assay by an L-selectin-dependent mechanism. As described in the Introduction section, deviations from the anti- and pro-inflammatory effects of NO have been

attributed to schedules of experimental assays. Therefore, the controversial effect of NO on L-selectin expression may could confirm this possibility and suggest a distinctive cell behaviour after chronic or acute blockade of NOS.

PECAM-1 is a constitutive molecule expressed highly concentrated in the lateral border of endothelial cells, in all types of leucocytes in non-inflammatory conditions, and in platelets. Its synthesis is modulated in pre- or post-translational levels and there is a turnover that maintain stable the levels of PECAM-1 on the cell surface (Gong and Chatterjee, 2003; Jackson, 2003). It is responsible for the maintenance of endothelium junction integrity and modulation of leucocyte transmigration via homophilic interactions (Muller and Randolph, 1999; Blankenberg *et al.*, 2003). A relationship between eNOS and PECAM-1 was demonstrated since they are colocalized in endothelial cells (Govers *et al.*, 2002; Dussere *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2005). Activation of PECAM-1 by shear stress induces phosphorylation of eNOS and NO synthesis (Bagi *et al.*, 2005; Fleming *et al.*, 2005; Mukai *et al.*, 2006). We clearly show that physiological blockade of Ca^{+2} -dependent NOS activity reduces PECAM-1 expression irrespective of the transcriptional mechanism since the levels of PECAM-1 mRNA in leucocytes and in the cremaster muscle were not altered by treatment with L-NAME. Therefore, the role of NO on PECAM-1 translocation or recycling will be further investigated. It is worth emphasizing that the cremaster muscle was utilized to quantify PECAM-1 mRNA because isolation of microvascular endothelial cells was not feasible. Immunohistochemistry

assays performed in cremaster muscle clearly labelled the PECAM-1 molecule only in the vessel wall. Therefore, the levels of PECAM-1 mRNA in this muscle represent its expression in endothelial cells.

It is worthwhile to note that treatment with L-NAME did not influence the expression of β_2 -integrin in leucocytes, and E-selectin, VCAM-1, and ICAM-1 in endothelium even in non-stimulated condition or after LPS-induction of systemic inflammation *in vivo*. Quantification of molecules expressed was performed after four hours of inflammation, time required for the molecules to appear on the cell membranes (Chosai *et al.*, 1998; Coisne *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2006). Although the diminished expression of PECAM-1 by leucocytes of L-NAME-treated rats was abolished during inflammation, the impaired expression by endothelial cells remained reduced suggesting an effective role for NO in the control of PECAM-1 on the vessel wall.

Our studies have shown that NO controls leucocyte-endothelial cell interactions irrespective of changes in blood pressure and shear stress (Farsky *et al.*, 2004). These results seem to be controversial, since we show a blockade of constitutive NOS activity and a hypertensive state could be expected. Therefore, we consider that adaptive mechanisms of endothelial cells may be revealed during L-NAME-treatment, which could counteract the absence of NO.

Taken together, results presented herein show that NO controls leucocyte behaviour in the bloodstream by interacting with constitutive molecules responsible for the initial cell adherence and provide evidences

that clarify the controversial role of NO as pro- or anti-inflammatory mediator.

Acknowledgements

The authors thank Jorge M Ferreira for technical assistance. This work was supported by FAPESP grant no. 05/60329-0. SHPF is fellow of the Conselho Nacional de Pesquisa e Tecnologia (CNPq). CBH is a CAPES graduate fellow. FAPESP is Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo and CAPES is Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

Conflict of interest

The authors state no conflict of interest.

Legends for figures

Figure 1. Effects of L-NAME treatment on brain activity of NOS. L-NAME was or not (controls) administrated on drinking water during 14 days (20mg Kg^{-1}). Brain was collected 2 hours after treatments were interrupted and homogenates obtained from whole encephalic mass were employed to quantify total (A), Ca^{+2} -dependent (B) or -independent NOS activity (C). Results are expressed as the mean $\pm$ s.e.m. of activity from tissues collected from three animals in each group. *** $P < 0.001$ vs. control.

Figure 2. Effects of L-NAME treatment on leucocyte migration into the peritoneal cavity after LPS injection. L-NAME was or not (controls) administrated on drinking water during 14 days (20mg Kg^{-1}). LPS (5mg/kg) was intraperitoneally injected 2 hours after treatments were interrupted. Total and differential leukocyte counts were performed 4 hours after LPS injection and quantified in Neubauer chamber. PMN and MN leukocytes were quantified on colored strains with May Grunvald. Results are expressed as the mean $\pm$ s.e.m. of number of leucocytes collected from five animals in each group. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs. control.

Figure 3. Effects of L-NAME treatment on plasma levels of corticosterone. L-NAME was or not (controls) administrated on drinking water during 14 days (20mg Kg^{-1}). Plasma was collected 2 hours after treatments were interrupted.

Levels of corticosterone were quantified by ELISA. Results are expressed as the mean $\pm$ s. e. m. of plasma collected from six animals in each group.

Figure 4. Effects of L-NAME treatment on adhesion molecules expression in circulating leucocytes. L-NAME was or not (controls) administrated on drinking water during 14 days (20mg Kg^{-1}). Cells were collected 2 hours after treatments were interrupted and used to quantify L-selectin, PECAM-1 and β_2 integrin on total leucocytes, polymorphonuclear cells (PMN) and mononuclear cells (MN) by flow cytometer. Reverse transcriptase-PCR was carried out on total leucocytes. A, B and C represents expression of L-selectin, PECAM-1 and β_2 integrin, respectively; D, E and F represents L-selectin and PECAM-1 mRNA expression and their respective images represents agarose gel eletrophoresis. Results are expressed as mean $\pm$ s. e. m. of molecules expression on leucocytes collected from six animals in each group. $*P<0.05$, $**P<0.01$ and $***P<0.001$ vs. control.

Figure 5. Effects of L-NAME treatment on adhesion molecules expression in endothelial cells membranes. L-NAME was or not (controls) administrated on drinking water during 14 days (20mg Kg^{-1}). Cremaster muscle was collected 2 hours after treatments were interrupted. Adhesion molecules expression was quantified by immunohistochemistry and A represent E-selectin, PECAM-1, ICAM-1 and VCAM-1 expression; B is a representative image of PECAM-1 expression on vessel wall from control and L-NAME treated rats; C represents PECAM-1 mRNA expression quantified by RT-PCR, and D is a representative

image of agarose gel eletrophoresis. Results are expressed as the mean $\pm$ s. e. mean of tissues collected from six animals in each group and assayed in triplicate. **** $P < 0.01$ vs. respective control.**

Figure 6. Effects of L-NAME treatment on LPS-induced adhesion molecules expression in circulating leucocytes and endothelial cells. L-NAME was or not (controls) administrated on drinking water during 14 days (20mg Kg^{-1}). 2 hours after treatments were interrupted, animals were inflamed with LPS and 4 hours after circulating leucocytes and cremaster muscle were collected. L-selectin, β_2 integrin, and PECAM-1 were quantified in total leucocytes, polymorphonuclear cells (PMN) and mononuclear cells (MN) by flow cytometer (A). E-selectin, PECAM-1, ICAM-1 and VCAM-1 were quantified on vessel wall from cremaster muscle by immunohistochemistry (B). C represents mRNA PECAM-1 expression on cremaster muscle quantified by RT-PCR and D is a representative image of agarose gel eletrophoresis. Results are expressed as the mean $\pm$ s. e. m. of tissues collected from six animals in each group and assayed in triplicate. **** $P < 0.01$ vs. respective control.**

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4

Figure 5

Figure 6

References

- Adams MR, Jessup W, Hailstones D, Celermajer DS (1997). L-arginine reduces human monocyte adhesion to vascular endothelium and endothelial expression of cell adhesion molecules. *Circulation* **95**:662-668.
- Ahluwalia A, Foster P, Scotland RS, McLean PG, Mathur A, Perretti M, *et al* (2004). Antiinflammatory activity of soluble guanylate cyclase: cGMP-dependent down-regulation of P-selectin expression and leukocyte recruitment. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:1386-1391.
- Alves-Filho JC, Benjamim C, Tavares-Murta BM, Cunha FQ (2005). Failure of neutrophil migration toward infectious focus in severe sepsis: a critical event for the outcome of this syndrome. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **100**:223-226.
- Bagi Z, Frangos JA, Yeh JC, White CR, Kaley G, Koller A (2005). PECAM-1 mediates NO-dependent dilation of arterioles to high temporal gradients of shear stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**:1590-1595.
- Bishayi B, Ghosh S, Bhanja P (2003). Effect of adrenalectomy on rat peritoneal macrophage response. *Acta Biol Hung* **54**:335-346.
- Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L (2003). Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **170**:191-203.
- Bryan NS, Calvert JW, Gundewar S, Lefer DJ (2008). Dietary nitrite restores NO homeostasis and is cardioprotective in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Free Radic Biol Med* **in press**

- Cavalcanti DM, Lotufo CM, Borelli P, Tavassi AM, Pereira AL, Markus RP *et al* (2006). Adrenal deficiency alters mechanisms of neutrophil mobilization. *Mol Cell Endocrinol* **249**:32-39.
- Cavalcanti DM, Lotufo CM, Borelli P, Ferreira ZS, Markus RP, Farsky SH (2007). Endogenous glucocorticoids control neutrophil mobilization from bone marrow to blood and tissues in non-inflammatory conditions. *Br J Pharmacol* **152**:1291-300.
- Cheng C, van Haperen R, de Waard M, van Damme LC, Tempel D, Hanemaaijer L *et al* (2005). Shear stress affects the intracellular distribution of eNOS: direct demonstration by a novel in vivo technique. *Blood* **106**:3691-3698.
- Chosay JG, Fisher MA, Farhood A, Ready KA, Dunn CJ, Jaeschke H (1998). Role of PECAM-1 (CD31) in neutrophil transmigration in murine models of liver and peritoneal inflammation. *Am J Physiol* **274**:776-82.
- Coisne C, Faveeuw C, Delplace Y, Dehouck L, Miller F, Cecchelli R *et al* (2006). Differential expression of selectins by mouse brain capillary endothelial cells in vitro in response to distinct inflammatory stimuli. *Neurosci Lett* **392**:216-220.
- Dal Secco D, Moreira AP, Freitas A, Silva JS, Rossi MA, Ferreira SH *et al* (2006). Nitric oxide inhibits neutrophil migration by a mechanism dependent on ICAM-1: role of soluble guanylate cyclase. *Nitric Oxide* **15**:77-86.
- De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA Jr (1995). Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation.

Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* **96**:60-68.

Di Rosa M, Radomski M, Carnuccio R, Moncada S (1990). Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **172**:1246-1252.

Dusserre N, L'Heureux N, Bell KS, Stevens HY, Yeh J, Otte LA *et al* (2004). PECAM-1 interacts with nitric oxide synthase in human endothelial cells: implication for flow-induced nitric oxide synthase activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**:1796-1802.

Faria MS, Muscará MN, Moreno HJr, Teixeira SA, Dias HB, Oliveira B *et al* (1996) Acute inhibition of nitric oxide synthesis induces anxiolysis in the plus-maze test. *Eur J Pharmacol* **323**: 37–43.

Farsky SP, Sannomiya P, Garcia-Leme J (1995). Secreted glucocorticoids regulate leukocyte-endothelial interactions in inflammation. A direct vital microscopic study. *J Leukoc Biol* **57**:379-386.

Farsky SH, Borelli P, Fock RA, Proto SZ, Ferreira JM Jr, Mello SB (2004). Chronic blockade of nitric oxide biosynthesis in rats: effect on leukocyte endothelial interaction and on leukocyte recruitment. *Inflamm Res* **53**:442-452.

Fleming I, Fisslthaler B, Dixit M, Busse R (2005). Role of PECAM-1 in the shear-stress-induced activation of Akt and the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in endothelial cells. *J Cell Sci* **118**:4103-4111.

- Flower RJ, Parente L, Persico P, Salmon JA (1986). A comparison of the acute inflammatory response in adrenalectomised and sham-operated rats. *Br J Pharmacol* **87**:57-62.
- Gong N, Chatterjee S (2003). Platelet endothelial cell adhesion molecule in cell signaling and thrombosis. *Mol Cell Biochem* **253**:151-158.
- Govers R, Bevers L, De Bree P, Rabelink TJ (2002). Endothelial nitric oxide synthase activity is linked to its presence at cell-cell contacts. *Biochem J* **361**:193-201.
- Granger DN, Kubes P (1994). The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol* **55**:662-675.
- Guzzo ML, Farsky SH, De Nucci G, Antunes E, Silva MA, Mello SB (2000). Role of kinins and nitric oxide on the rabbit arthritis induced by *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon* **38**:1535-1546.
- Hattori Y, Akimoto K, Nakanishi N, Kasai K (1997). Glucocorticoids regulation of nitric oxide and tetrahydrobiopterin in a rat model of endotoxic shock. *Biochem Biophys Res Commun* **240**:298-303.
- Hebeda C, Mello SBV, Farsky SHP (2005). Mechanisms Involved On Inhibition Of Neutrophil Recruitment By Chronic Blockage Of Nitric Oxide Synthesis. *Inflamm Research* **54**:169.
- Hickey MJ, Sharkey KA, Sihota EG, Reinhardt PH, Macmicking JD, Nathan C *et al* (1997). Inducible nitric oxide synthase-deficient mice have enhanced leukocyte-endothelium interactions in endotoxemia. *FASEB J* **11**:955-964.

- Hickey MJ (2001). Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of leucocyte recruitment. *Clin Sci (Lond)* **100**:1-12.
- Hickey MJ, Granger DN, Kubes P (2001). Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and regulation of leucocyte/endothelial cell interactions: studies in iNOS-deficient mice. *Acta Physiol Scand* **173**:119-126.
- Huang MT, Larbi KY, Scheiermann C, Woodfin A, Gerwin N, Haskard DO, Nourshargh S (2006). ICAM-2 mediates neutrophil transmigration in vivo: evidence for stimulus specificity and a role in PECAM-1-independent transmigration. *Blood* **107**:4721-4727.
- Jackson DE. The unfolding tale of PECAM-1 (2003). *FEBS Lett* **540**:7-14.
- Kishimoto TK, Kahn J, Migaki G, Mainolfi E, Shirley F, Ingraham R *et al* (1995). Regulation of L-selectin expression by membrane proximal proteolysis. *Agents Actions Suppl* **47**:121-134.
- Klink M, Bednarska K, Jastrzebska K, Banasik M, Sulowska Z (2007). Signal transduction pathways affected by nitric oxide donors during neutrophil functional response in vitro. *Inflamm Res* **56**:282-290.
- Kubes P, Suzuki M, Granger DN (1991). Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:4651-4655.
- Kubes P, Kanwar S, Niu XF, Gaboury JP (1993). Nitric oxide synthesis inhibition induces leukocyte adhesion via superoxide and mast cells. *FASEB J*. **13**:1293-1299.
- Lindemann S, Sharafi M, Spiecker M, Buerke M, Fisch A, Grosser T *et al* (2000). NO reduces PMN adhesion to human vascular endothelial cells due to

downregulation of ICAM-1 mRNA and surface expression. *Thromb Res* **97**:113-123.

Lozano FS, Barros MB, Fresnadillo MJ, Garcia-Criado FJ, Gomez-Alonso A (2005). Nitric oxide prevents the bacterial translocation and inhibits the systemic inflammatory response produced by implantation of a vascular prosthesis followed by Zymosan A. *Inflamm Res* **54**:261-270.

Marzocco S, Di Paola R, Serraino I, Sorrentino R, Meli R, Mattaceraso G *et al* (2004). Effect of methylguanidine in carrageenan-induced acute inflammation in the rats. *Eur J Pharmacol*. **484**:341-350.

Mello SB, Guzzo ML, Lisboa LF, Farsky SH (2002). Pharmacological characterisation of arthritis induced by Bothrops jararaca venom in rabbits: a positive cross talk between bradykinin, nitric oxide and prostaglandin E2. *Mediators Inflamm* **11**:13-16.

Mello SB, Novaes GS, Laurindo IM, Muscara MN, Maciel FM, Cossermelli W (1997). Nitric oxide synthase inhibitor influences prostaglandin and interleukin-1 production in experimental arthritic joints. *Inflamm Res* **46**:72-77.

Mitchell DJ, Yu J, Tym LK (1998). Local L-NAME decreases blood flow and increases leukocyte adhesion via CD18. *Am J Physiol* **274**:1264-1268.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1989). Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol* **38**:1709-1715.

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

- Mukai Y, Rikitake Y, Shiojima I, Wolfrum S, Satoh M, Takeshita K *et al* (2006). Decreased vascular lesion formation in mice with inducible endothelial-specific expression of protein kinase Akt (2006). *J Clin Invest* **116**:334-343.
- Muller WA, Randolph GJ (1999). Migration of leukocytes across endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes. *J Leukoc Biol* **66**:698-704.
- Nabah YN, Mateo T, Cerda-Nicolas M, Alvarez A, Martinez M, Issekutz AC *et al* (2005). L-NAME induces direct arteriolar leukocyte adhesion, which is mainly mediated by angiotensin-II. *Microcirculation* **12**:443-453.
- Nolan S, Dixon R, Norman K, Hellewell P, Ridger V (2008). Nitric oxide regulates neutrophil migration through microparticle formation. *Am J Pathol* **172**:265-273.
- Nourshargh S, Marelli-Berg FM (2005). Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. *Trends Immunol* **26**:157-165.
- Palacios FA, Novaes GS, Guzzo ML, Laurindo IM, de Mello SB (1999). Interrelationship of the kinin system, nitric oxide and eicosanoids in the antigen-induced arthritis in rabbits. *Mediators Inflamm* **8**:245-251.
- Peterson GL (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal Biochem* **83**: 346.
- Pitzalis C, Pipitone N, Perretti M (2002). Regulation of leukocyte-endothelial interactions by glucocorticoids. *Ann N Y Acad Sci* **966**:108-118.

- Radomski MW, Palmer RM, Moncada S (1990). Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:10043-10047.
- Rawlingson A (2003). Nitric oxide, inflammation and acute burn injury. *Burns* **29**:631-640.
- Salvemini D, Wang ZQ, Wyatt PS, Bourdon DM, Marino MH, Manning PT *et al* (1996). Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *Br J Pharmacol* **118**:829-838.
- Szabo C, Thiermermann C, Wu CC, Peretti M, Vane JR (1994). Attenuation of the induction of nitric oxide synthase by endogenous glucocorticoids accounts for endotoxin tolerance *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:271-275.
- Teixeira SA, Castro GM, Papes F, Martins ML, Rogério F, Langone F *et al* (2002). Expression and activity of nitric oxide synthase isoforms in rat brain during the development of experimental allergic encephalomyelitis. *Brain Res Mol Brain Res* **99**:17-25.
- Teixeira SA, Varriano AA, Dias AA, Martins Porto R, Muscará MN (2005). Nitric oxide synthase activity and endogenous inhibitors in rats recovered from allergic encephalomyelitis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **100**:25-27.
- Venturi GM, Tu L, Kadono T, Khan AI, Fujimoto Y, Oshel P *et al* (2003). Leukocyte migration is regulated by L-selectin endoproteolytic release. *Immunity* **19**:713-724.

- Wang J, Brown MA, Tam SH, Chan MC, Whitworth JA (1997). Effects of diet on measurement of nitric oxide metabolites. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **24**:418-420.
- White AM, Holda JH (2004). Decreasing endogenous glucocorticoids alters the ability of bone marrow cells to produce nitric oxide in response to stimulating agents. *Cell Immunol* **232**:32-37.
- Worthylake RA, Burridge K (2001). Leukocyte transendothelial migration: orchestrating the underlying molecular machinery. *Curr Opin Cell Biol* **13**:569-577.
- Yudoh K, Matsui H, Tsuji H (1997). Nitric oxide induced by tumor cells activates tumor cell adhesion to endothelial cells and permeability of the endothelium in vitro. *Clin Exp Metastasis* **15**:557-567.
- Zarbock A, Ley K (2008). Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. *Am J Pathol* **172**:1-7.

ANEXOS

**Anexo A: Pareceres da Comissão de Ética em Experimentação Animal
(Ofício CEEA n. 007/2005 – Protocolo 60)**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comissão de Ética em Experimentação Animal

Of. CEEA n.º 007/2005

CERTIFICADO

*Certificamos que o Projeto “Inibição crônica da síntese de óxido nítrico: investigação dos mecanismos envolvidos no recrutamento leucocitário” (Protocolo nº60), sob a responsabilidade do(a) Sr(a). **Cristina Bichels Hebeda** e do orientador(a) **Sandra Helena Poliselli Farsky**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 07/03/2005.*

São Paulo, 08 de março de 2005.

*Prof.^a Associada **Elfriede Marianne Bacchi**
Coordenadora da CEEA*

Anexo B: Ficha do Aluno

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

9141 - 5083614/1 - Cristina Bichels Hebeda

Email:	cbh@usp.br
Data de Nascimento:	28/01/1979
Cédula de Identidade:	RG - 2910967 - SC
Local Nascimento:	Estado de Santa Catarina
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutico - Universidade do Vale do Itajaí - - Santa Catarina - Brasil - 1999

Curso:	Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas
Área:	Toxicologia e Análises Toxicológicas
Data da Matrícula:	07/07/2004
Início da Contagem de Prazo:	07/07/2004
Data Limite:	04/11/2008
Orientador(es):	Prof(a). Dr(a). Sandra Helena Poliselli Farsky - 07/07/2004 a -- E.Mail: sfarsky@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 07/07/2004
Prorrogação:	120 dias - Período de 07/07/2008 a 04/11/2008
Exame de Qualificação:	Aprovado em 14/12/2007
Data do Depósito do Trabalho:	
Data máxima para aprovação da Banca:	
Título do Trabalho:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Ocorrência:	Última matrícula em 24/07/2008

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Hor.	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Sit. Matric.
FBC5771-6	Seminários Gerais em Toxicologia	18/08/2004	01/12/2004	30	2	85.00	A	N	Concluída
FBC5735-1	Aspectos da Biologia e Bioquímica de Neutrófilos	06/09/2004	26/09/2004	90	6	100.00	A	N	Concluída
FBC5746-1	Comprometimento do Sistema Imunológico nas Intoxicações	08/11/2004	19/12/2004	60	4	100.00	A	N	Concluída
BMF5836-3	Farmacologia da Célula Endotelial	09/11/2004	09/12/2004	75	5	90.00	B	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou de Atividades de Monitoria junto a Disciplina FBC-0512 Bioquímica Clínica, ministrada para alunos de graduação - Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo	01/02/2005	30/06/2005	-	3	0.00	-	-	-
FBC5748-1	Trabalhos Científicos: da Elaboração à Publicação	03/03/2005	11/05/2005	60	4	90.00	A	N	Concluída
EDM5791-4	Metodologia do Ensino Superior	17/08/2005	02/12/2005	120	0	0.00	-	N	Matrícula cancelada
EDM5791-4	Metodologia do Ensino Superior	15/03/2006	19/06/2006	120	8	100.00	A	N	Concluída
QBQ5747-5	Animais de Laboratório	21/08/2006	28/08/2006	15	1	83.00	A	N	Concluída

Créditos mínimos exigidos	Para Exame de Qualificação	Para Depósito de Dissertação/Tese	Créditos obtidos	
Disciplinas:	25	25	Disciplinas:	33
Atividades Programadas:	0	0	Atividades Programadas:	0
Seminários:	0	0	Seminários:	0
Estágios:	0	0	Estágios:	0
Total:	25	25		33

Créditos Atribuídos à Tese : 167

Anexo C: Currículo Lattes

Cristina Bichels Hebeda

possui graduação em Farmácia e Bioquímica pela Universidade do Vale do Itajaí (2001). Tem experiência profissional na área de Análises Clínicas. Atualmente é estudante de doutorado em toxicologia com ênfase em Farmacologia, atuando principalmente nos seguintes temas: leucócitos, moléculas de adesão, óxido nítrico e inflamação.

(Texto informado pelo autor)
Última atualização em 07/08/2008

Endereço para acessar este CV:
<http://lattes.cnpq.br/1035206545138489>

Dados pessoais

Formação acadêmica/Titulação

Produção em C, T & A

Atuação profissional

Áreas de atuação

Linhas de pesquisa

Projetos de pesquisa

Idiomas

Prêmios e títulos

Formação Complementar

Eventos

Bancas

Dados Pessoais

Nome	Cristina Bichels Hebeda
Nascimento	28/01/1979 - Rio do Sul/SC - Brasil
CPF	02498266909

Formação Acadêmica/Titulação

2004	Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas. Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil Título: Inibição da Síntese de NO: Investigação dos Mecanismos Envolvidos no Recrutamento Leucocitário Orientador: Sandra Helena Poliselli Farsky Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
1996 - 2001	Graduação em Farmácia e Bioquímica. Universidade do Vale do Itajaí, UNIVALI, Itajaí, Brasil Título: Estudo da Capacidade de Adsorção dos Complexos Cu-PAN e Cu-PAR por Celulose, Quitina e Quitosana Orientador: Clovis Antonio Rodrigues

Formação complementar

2000 - 2000	Curso de curta duração em Curso de Atualização Em Citopatologia. Universidade do Vale do Itajaí, UNIVALI, Itajaí, Brasil
2003 - 2003	Curso de curta duração em Curso de Atualização Em Hematologia. Pontifícia Universidade Católica do Paraná, PUC-PR, Curitiba, Brasil
2005 - 2005	Extensão universitária em Programa de Aperfeiçoamento de Ensino. Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
2006 - 2006	Curso de curta duração em Cursos de Biologia Molecular. Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
2007 - 2007	TOEFL. MK Idiomas, MK IDIOMAS, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2004 - Atual	Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Aluno de pós graduacao , Carga horária: 40, Regime: Dedicção Exclusiva
---------------------	---

Produção em C, T & A

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. HEBEDA, C. B., BARBOZA, L., MELLO, S. B. V., FARSKY, S. H. P.
Effects of Chronicle Blockage of Nitric Oxide Synthases on Cytokines Secretion By Neutrophils Migrated to Inflammatory Focus In: 39 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2007, Ribeirão Preto.
Programa SBFTE. , 2007.
2. ★ HEBEDA, C. B., BARBOZA, L., MELLO, S. B. V., FARSKY, S. H. P.
Effects of L-NAME treatment on secretion of pro-inflammatory cytokines In: 8th Congress on Inflammation, 2007, Copenhagen.
Book of Abstracts 8th Congress on Inflammation - Inflammation Research. Basel, Switzerland: Birkhauser, 2007. v.56. p.S343 - S514
3. Hatanaka, E, VINOLO, M. A. R., MAGDALON, J., MACEDO, S. M. D., HEBEDA, C. B., FARSKY, S. H. P., CURI, R.
Effects of oleic, linoleic and g-linolenic acids on neutrophils rolling, adherence, migration and expression of L-selectin and b2-integrin In: 48th International Conference on the Biocience of Lipids, 2007, Turku.
Chemistry and Physics of Lipids. , 2007. v.149S. p.S61 -

4. HEBEDA, C. B., MELLO, S. B. V., FARSKY, S. H. P.
NON SPECIFIC CHRONIC BLOCKAGE OF NOS REDUCES PECAM-1 EXPRESSION ON
ENDOTHELIAL CELLS In: XXXI Meeting of the Brazilian Society for Immunology - Signaling in the Immune
System - Extra Section of Clinical Immunology, 2006, Búzios - RJ.
**XXXI Meeting of the Brazilian Society for Immunology - Signaling in the Immune System - Extra
Section of Clinical Immunology - Final Program, Abstracts.** , 2006. p.55 - IP.014 -
5. ★ HEBEDA, C. B., MELLO, S. B. V., FARSKY, S. H. P.
Mechanisms Involved On Inhibition Of Neutrophil Recruitment By Chronic Blockage Of Nitric Oxide Synthesis
In: 7th World Congress on Inflammation 2005, 2005, Melbourne.
Inflammation Research. Zagreb - Croatia: M. J. Parnham PLIVA Research Institute Ltd., 2005. v.54. p.S85
- S232
6. HEBEDA, C. B., MELLO, S. B. V., FARSKY, S. H. P.
Mechanisms Involved on Inhibition of Neutrophil Recruitment by Chronic Blockage of Nitric Oxide Synthesis
In: X SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 2005, São Paulo.
X SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA. São Paulo: , 2005. p.18 - 18
7. HEBEDA, C. B., RODRIGUES, C. A.
Estudo da Adsorção do Complexo Cu: PAN em Diferentes Biopolímeros In: V Seminário Integrado de
Iniciação Científica, 1999, Joacaba - SC.
Anais do V Seminário de Iniciação Científica. , 1999.

Demais produções bibliográficas

1. ★ HEBEDA, C. B., BARBOZA, L., MELLO, S. B. V., FARSKY, S. H. P.
Effects of L-NAME treatment on pro-inflammatory cytokines, 2007. (Congresso, Apresentação de
Trabalho)

Produção Técnica

Demais produções técnicas

1. ALMEIDA, K. A., SANDRI, S., HEBEDA, C. B., OKADA, S.S.
Análises Clínicas, 2007. (Especialização, Curso de curta duração ministrado)

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 14/08/2008 às 09:36:03.

**Anexo D: Informações para os Membros de Banca Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

**Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.