



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

ANTÔNIO FELIPE LEITE SIMÃO

EFEITO INIBITÓRIO DO PRÉ-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO
À DISTÂNCIA SOBRE A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS:
MECANISMOS E MEDIADORES

FORTALEZA-CE

2010

ANTÔNIO FELIPE LEITE SIMÃO

**EFEITO INIBITÓRIO DO PRÉ-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO
À DISTÂNCIA SOBRE A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS:
MECANISMOS E MEDIADORES**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador (a):

Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro

Co-orientador(a):

Prof.Dr. Fernando de Queiroz Cunha

FORTALEZA-CE

2010

ANTÔNIO FELIPE LEITE SIMÃO

**EFEITO INIBITÓRIO DO PRÉ-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO
À DISTÂNCIA SOBRE A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS:
MECANISMOS E MEDIADORES**

Dissertação submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca setorial da referida Universidade.

Data de aprovação: 29/07/2010

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro (Orientador).
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dra. Sara Maria Thomazzi
Universidade Federal de Sergipe-UFS

S596e Simão, Antônio Felipe Leite

Efeito inibitório do pré-condicionamento isquêmico à distância sobre a migração de neutrófilos: mecanismos e mediadores/ Antônio Felipe Leite Simão. – Fortaleza, 2010.

139 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, CE.

1. Precondicionamento Isquêmico 2. Inibição de Migração Celular 3. Neutrófilos 4. Mediadores da Inflamação 5. Moléculas de Adesão Celular 6. Receptores CXCR I. Ribeiro, Ronaldo de Albuquerque (orient.) II. Título.

CDD: 615.1

DEDICATÓRIA

**Aos meus pais Francisco José Ferreira
Simão e Maria de Fátima Leite Simão,
pelo apoio incondicional e pelo
sacrifício desmedido sempre pensando
na educação como bem maior a deixar
para nós, seus filhos.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço

A Deus, amigo e guia de todas as horas, trazendo-me as oportunidades de ensinamento, sabedoria e força.

À minha família, por apoiar-me indistintamente em todos os momentos, sem muitas vezes ter plena ciência dos planos traçados por mim, me trazendo conforto nos momentos difíceis e paz e equilíbrio para continuar sem nunca desistir.

Ao grande amigo e orientador Prof. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, o qual semeou o encantamento pela ciência e o gosto pela pesquisa em mim, depositando enorme confiança durante toda minha trajetória no LAFICA, desde a iniciação científica e sempre me mostrando a melhor direção.

Ao amigo Prof. Fernando de Queiróz Cunha pela orientação, disponibilidade e pelas várias discussões científicas travadas as quais me fizeram crescer enormemente como ser pensante e cientista, ensinando-me os caminhos com uma preocupação paterna.

Ao Prof. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza por ser um brilhante professor e amigo, muito presente enquanto vice-chefe da pós-graduação em Farmacologia, deixando nos acolhidos como alunos. Sempre me foi um exemplo de conduta profissional e caráter.

Ao amigo e exemplo Marcus Vinícius Ponte de Souza Filho por dividir anos de agradável convívio na pesquisa experimental e me mostrar que é o possível ser um habilidoso cirurgião e um pesquisador sagaz de grande capacidade investigativa.

Ao amigo e professor Antero Gomes Neto por ser fundamental na minha formação de pesquisador durante minha iniciação científica. Cirurgião muito habilidoso norteou meus primeiros passos em direção as minhas escolhas de hoje enquanto médico e pesquisador.

A todos os amigos do LAFICA, especialmente André Luiz, Antoniella Gomes, Jand-Venes, Pedro Soares, Samuel de Paula Pessoa e Renata Leitão dividindo anos de pesquisa na bancada sempre mantendo um clima amistoso e de muita harmonia no laboratório.

A todos os amigos do Laboratório de Inflamação e Dor de Ribeirão Preto, especialmente Fabrício Oliveira Souto, Fernando Spiller, Romualdo Barroso de Sousa e Thiago Mattar Cunha por discussões científicas, agradáveis momentos divididos nas bancadas e, nos fins de semana, momentos de descontração e alegria.

Aos amigos médicos residentes em Ribeirão Preto, especialmente Antônio Bruno, Felipe Pinheiro, Joel Porfírio, Samir Câmara, Patricia Rolim, Romualdo Barroso e

Rômulo Lôbo pela companhia e por me acolherem em seus lares dividindo dias de agradável convivência, amizade e saudosas reuniões.

A técnica Vandinha França Pinheiro pela organização e por sempre está disponível a resolver nossos problemas no laboratório.

Aos técnicos Ana Kátia dos Santos, Diva Amábilis Montanha de Souza, Eliana Beatriz de Barros, Fabíola Leslie Mestriner, Giuliana Bertozzi Francisco, Ieda Regina dos Santos Schivo, Júlio Anselmo, Maria Inês Nemoto, Sérgio Roberto Rosa, Tadeu Franco Vieira, todos da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto pelo apoio na realização dos experimentos e pela maravilhosa e agradável convivência durante o período

Às secretárias Aura Rhanes Yida e Marcia Borges pela atenção e gentileza com que sempre me atenderam quaisquer que fossem minhas necessidades em relação à pós-graduação.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia: Haroldo, Carlos, Íris, Chiquinho, Fernando, Joana, Alana, pela indispensável ajuda na manutenção das atividades do departamento.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

“O homem se torna mortal pelos seus medos e imortal pelos seus sonhos.”

(Pitágoras).

RESUMO

RESUMO

Efeito inibitório do pré-condicionamento isquêmico a distância sobre a migração de neutrófilos: Mecanismos e mediadores Autor: Antônio Felipe Leite Simão. Mestrado em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará. Defesa: 29 de julho de 2010. Orientador: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro.

Introdução: O pré-condicionamento isquêmico (PCI) vem sendo considerado como um potente mecanismo endógeno capaz de inibir a resposta inflamatória. A migração de neutrófilos (mn) é um evento central no desenvolvimento da reação inflamatória. Nosso grupo tem demonstrado que o PCI inibe a mn em modelos experimentais, entretanto os mecanismos e mediadores envolvidos ainda não são conhecidos. **Objetivo:** Estudar a participação dos mediadores Óxido nítrico e Monóxido de carbono, proteínas de adesão (ICAM-1 e β 2-integrina) e da expressão de CXCR2 no efeito inibitório do PCI a distância sobre a mn. **Métodos:** O modelo de PCI a distância foi realizado com um torniquete no membro posterior direito de camundongos durante 10 minutos seguidos de 30 de reperfusão. Participação do NO e CO foi investigada através de inibidores de iNOS (1400 W, 3 mg/kg ou Aminoguanidina (Amg), 50 mg/kg) e HO-1 (ZnPPiX, 10 mg/kg) como pré-tratamento de 30 min. Posteriormente, induziu-se peritonite com Carragenina (Cg) (500 mg /cav). Quatro horas após, a cavidade peritoneal (cp) era lavada e leucócitos eram contados. Após aquele mesmo procedimento, os animais foram submetidos a microscopia intravital (miv) para avaliar os efeitos do NO e CO nas vênulas mesentéricas de 3ª ordem. Neutrófilos de animais pré-condicionados e pré-tratados ou não, foram utilizados para o ensaio de quimiotaxia *in vitro*, usando como estímulo a quimiocina KC (30 ng/ml). A expressão de CXCR2 e GRK2 dos neutrófilos foi determinada por citometria de fluxo e imunofluorescência, respectivamente. As participações de ICAM-1/CD54 e β 2-integrina/CD11b foram investigadas em camundongos nocautes para os genes dessas moléculas. A mn nesses animais foi avaliada segundo protocolo já descrito pelo lavado peritoneal. Na investigação do papel do NO e CO na modulação da proteína de adesão celular (β 2-integrina), utilizou-se inibidores da iNOS (1400W, 3 mg/kg ou Amg, 50 mg/kg, sc), HO-1 (ZnPPiX, 10 mg/kg, sc) e Guanilato Ciclase (ODQ (5 μ mol/kg, ip)) em pré-tratamento de 30 min antes do PCI. Após peritonite, o sangue foi colhido e a expressão de CD11b em neutrófilos foi determinada por citometria de fluxo. Para análise estatística, utilizou-se ANOVA/Bonferroni. $P < 0,05$ foi aceito. **Resultados:** Os inibidores de CO e NO preveniram o efeito inibitório do PCI sobre a mn ($p < 0,05$). Além disso, os neutrófilos de animais pré-condicionados apresentaram redução de quimiotaxia ($p < 0,05$), achado que se correlacionou com a diminuição da expressão de CXCR2 na membrana dos neutrófilos ($p < 0,05$) e com aumento da expressão de GRK2. Não houve alteração da quimiotaxia, nem da expressão de GRK2 quando os neutrófilos foram obtidos a partir de animais pré-condicionados e pré-tratados com inibidores de CO, NO e GCs. Os animais pré-condicionados apresentaram redução nos neutrófilos circulantes e da aderência *miv*, as quais foram prevenidas pelo pré-tratamento com os inibidores ($p < 0,05$). O efeito inibitório do PCI persistiu em animais nocautes para β 2-integrina, o que não se observou nos animais nocautes para ICAM-1. Além disso, os neutrófilos de animais pré-condicionados apresentaram redução significativa na expressão de CD11b, que foi prevenida nos animais pré-tratados com os inibidores de iNOS, HO-1 e GCs. **Conclusões:** Os resultados sugerem que o NO e CO atuam no efeito inibitório do PCI via iNOS e HO-1 em sítio distante, modulando ICAM-1, β 2-integrina e CXCR2 via GRK2.

Palavras-chave: Pré-condicionamento isquêmico, migração de neutrófilos, monóxido de carbono, óxido nítrico e moléculas de adesão.

ABSTRACT

Inhibitory effect of ischemic preconditioning distance on migration of neutrophils: Mechanisms and mediators. Author: Antônio Felipe Leite Simon Masters in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará. Defense: July 29, 2010. Advisor: Prof. Dr. Ronaldo Albuquerque Ribeiro.

Introduction: Ischemic preconditioning (IPC) has been considered as a potent endogenous mechanism capable of inhibiting the inflammatory response. The migration of neutrophils (mn) is a central event in the development of inflammation. Our group has demonstrated that PCI inhibits mn in experimental models, however the mechanisms and mediators involved are not yet known. **Aim:** To study the involvement of mediators nitric oxide and carbon monoxide, adhesion proteins (ICAM-1 and β 2-integrin) and expression of CXCR2 in the inhibitory effect of PCI on the distance min. **Methods:** The model of distance PCI was performed with a tourniquet in the right hind limb of mice for 10 minutes followed by 30 reperfusion. Involvement of NO and CO was investigated using inhibitors of iNOS (1400 W, 3 mg/kg or aminoguanidine (Amg), 50 mg/kg) and HO-1 (ZnPPIX, 10 mg/kg) as pretreatment 30 min. Later, peritonitis was induced by carrageenan (Cg) (500 mg/cav). Four hours later the peritoneal cavity (pc) was washed and leukocytes were counted. After that same procedure, the animals were subjected to intravital microscopy (IVM) to evaluate the effects of NO and CO in the mesenteric venules of 3rd order. Neutrophils from animals preconditioned and pre-treated or untreated, were used for testing chemotaxis *in vitro*, using the stimulus to chemokine KC (30ng/ml). The expression of GRK2 and CXCR2 in neutrophils was determined by flow cytometry and immunohistochemistry, respectively. The stakes and ICAM-1/CD54 β 2-integrina/CD11b been investigated in knockout mice for genes of these molecules. The mn in these animals was evaluated according to protocol previously described by washed peritonea. In the investigation of the role of NO and CO in the modulation of cell adhesion protein (β 2-integrin), we used iNOS inhibitor (1400W, 3 mg/kg or Amg, 50 mg/kg, sc), HO-1 (ZnPPIX, 10 mg/kg, sc) and guanylate cyclase (ODQ (5 μ mol/kg, ip)) in pre-treatment 30 min before PCI. After peritonitis, blood was collected and the expression of CD11b on neutrophils was determined by flow cytometry. For statistical analysis, we used ANOVA/Bonferroni. $P < 0,05$ was accepted. **Results:** The CO and NO inhibitors prevented the inhibitory effect of PCI on mn ($P < 0,05$). Moreover, neutrophils from animals preconditioned showed reduced chemotaxis ($p < 0,05$), a finding that correlated with decreased expression of CXCR2 in the membrane of neutrophils ($p < 0,05$) and increased expression of GRK2. There was no change in chemotaxis or the expression of GRK2 when neutrophils were obtained from animals pre-conditioned and pretreated with inhibitors of CO, NO and sGC. Preconditioned animals showed a reduction in circulating neutrophils and the grip on IVM, which were prevented by pretreatment with inhibitors ($P < 0,05$). The inhibitory effect of PCI was shown in knockout animals for β 2-integrin, which was not observed in the knockout animals to ICAM-1. Moreover, neutrophils from animals preconditioned showed a significant reduction in the expression of CD11b, which was prevented in animals pretreated with inhibitors of iNOS, HO-1 and GCs. **Conclusions:** The results suggest that NO and CO act in the inhibitory effect of PCI via iNOS and HO-1 in place apart by modulating ICAM-1, β 2-integrin and CXCR2 via GRK2.

Keywords: Ischemic preconditioning, neutrophil migration, carbon monoxide, nitric oxide and adhesion molecules.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	Migração de neutrófilos para o sítio inflamatório em resposta a estímulo quimiotático.....	35
FIGURA 2-	Efeito protetor do pré-condicionamento isquêmico a distância na lesão gástrica induzida por AINES	39
FIGURA 3-	Camundongo anestesiado usando o torniquete com a faixa elástica no membro inferior direito, durante o período de isquemia (10 minutos)	48
FIGURA 4-	Efeito inibitório do PCI sobre a migração de neutrófilos.....	63
FIGURA 5-	Efeito inibitório do PCI sobre a migração de neutrófilos.....	64
FIGURA 6-	Ação do inibidor de iNOS previne efeito inibitório na migração pelo PCI.....	65
FIGURA 7-	Ação do inibidor de HO-1 previne efeito inibitório na migração pelo PCI.....	66
FIGURA 8-	Inibição da atividade leucocitária pelo PCI: diminuição do rolamento	69
FIGURA 9-	Inibição da atividade leucocitária pelo PCI: diminuição da adesão.....	70
FIGURA 10-	Prevenção da ação inibitória do PCI a distância por inibidor de HO-1, ZnPPIX no rolamento leucocitário.....	71
FIGURA 11-	Prevenção da ação inibitória do pré-condicionamento isquêmico a distância por inibidor de HO-1 na adesão leucocitário	72
FIGURA 12-	Inibição da atividade dos neutrófilos pelo PCI: Diminuição da transmigração <i>in vitro</i>	74
FIGURA 13-	Prevenção do efeito inibitório do pré-condicionamento isquêmico a distância por inibidor de HO-1 (ZnPPIX) sobre a migração de neutrófilos <i>in vitro</i>	76
FIGURA 14-	Prevenção do efeito inibitório do pré-condicionamento isquêmico a distância por inibidor específico de iNOS (1400W) sobre a migração de neutrófilos <i>in vitro</i>	77
FIGURA 15-	Prevenção do efeito inibitório do pré-condicionamento isquêmico a distância por inibidor de GCs (ODQ) sobre a migração de neutrófilos <i>in vitro</i>	78

FIGURA 16-	Aumento da expressão de GRK2 nos neutrófilos pelo PCI a distância	80
FIGURA 17-	Prevenção do aumento da expressão de GRK2 nos neutrófilos pelo PCI a distância por inibidor de HO-1	81
FIGURA 18-	Prevenção do aumento da expressão de GRK2 nos neutrófilos pelo PCI a distância por inibidor específico de iNOS	82
FIGURA 19-	Prevenção do aumento da expressão de GRK2 nos neutrófilos pelo PCI a distância por inibidor de GCs.....	83
FIGURA 20-	Diminuição da expressão de CXCR2 nos neutrófilos pelo PCI a distância	87
FIGURA 21-	Diminuição da expressão de CD11b nos neutrófilos pelo PCI a distância	89
FIGURA 22-	Prevenção da diminuição da expressão de CD11b nos neutrófilos pelo PCI a distância por inibidor específico de iNOS.....	91
FIGURA 23-	Prevenção da diminuição da expressão de CD11b nos neutrófilos pelo PCI a distância por inibidor específico de GCs	92
FIGURA 24-	Prevenção da diminuição da expressão de CD11b nos neutrófilos pelo PCI a distância por inibidor específico de HO-1	93
FIGURA 25-	Migração de neutrófilos em animais nocautes para ICAM-1: Manutenção da migração nos nocautes.....	95
FIGURA 26-	Migração de neutrófilos em animais nocautes para β 2-integrina: Inibição da migração nos nocautes.....	97
FIGURA 27-	Dosagem de bilirrubina no plasma de animais pré-condicionados: Redução da concentração de bilirrubina.....	99
FIGURA 28-	Dosagem de bilirrubina no plasma de animais pré-condicionados e pré-tratados com inibidor de HO-1: Prevenção da redução da concentração de bilirrubina.....	101
FIGURA 29-	Dosagem de bilirrubina no plasma de animais pré-condicionados e pré-tratados com inibidor de iNOS: Prevenção da redução da concentração de bilirrubina.....	103
FIGURA 30-	Dosagem de bilirrubina no plasma de animais pré-condicionados e pré-tratados com inibidor de GCs: Prevenção da redução da concentração de bilirrubina.....	105

FIGURA 31- Análise de concentração de bilirrubina vs tempo: Variação da concentração de bilirrubina com o tempo.....	107
FIGURA 32- Efeito inibitório do PCI a distância sobre a migração de neutrófilos para o sítio inflamatório via receptores em neutrófilos e proteínas de adesão em resposta a estímulo quimiotático.....	124

LISTA DE QUADROS E ESQUEMAS

QUADRO 1- Esquema das metodologias aplicadas aos vários protocolos utilizados na investigação.....	51
QUADRO 2- Painel de imunofluorescência para GRK2 em animais pré-condicionados e submetidos ao pré-tratamento com inibidores de iNOS, HO-1 e GCs	85
ESQUEMA 1- Proposição do mecanismo de injúria inflamatória induzida pela lesão de isquemia e reperfusão	30
ESQUEMA 2- Proposição do efeito inibitório do pré-condicionamento isquêmico sobre a migração de neutrófilos. Inibição de proteínas de adesão (ICAM-1) e inibição direta da ativação de neutrófilos, com isso inibição da adesão celular	119

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AMP	Adenosina Monofostato
BALB/c	Camundongos da espécie BALB/c
C57BL/6	Camundongos da espécie C57BL/6
CO ₂	Dióxido de Carbono
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
IL-1 α	Interleucina-1 α
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzida
i.p.	Intraperitoneal
KC	quimiocina derivada de queratinócito
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Kilograma
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MPO	Enzima mieloperoxidase
NaCl	Cloreto de sódio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sódio monobásico
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
NOS	Enzima óxido nítrico sintase
O ₂	Oxigênio
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
s.c.	Subcutânea

TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
WT	Wild type (tipo selvagem)
(-/-)	Deficientes homozigotos
μg	micrograma – 10^{-6} do grama
μL	microlitros – 10^{-6} do litro
AINES	antiinflamatórios não-esteroidais
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	adenosina trifosfato
oC	graus Celsius
Cg	Carragenina
Cm	Centímetros
COX	enzima cicloxigenase
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
E.P.M.	erro padrão da média
g	Gramas
GMPc	guanosina monofosfato cíclico
h	Hora
hs	Horas
i.p	Intraperitoneal
KATP	canais de potássio sensíveis ao ATP
Kg	Quilograma
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm ²	milímetros quadrados
mmHg	milímetros de mercúrio
ng	Nanogramas
NO	Óxido nítrico
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
HO-1	Heme-oxigenase-1
GCs	Guanilato Ciclase solúvel
1400W	N-(3-(aminometil)benzil)acetamidina
ZnPPiX	Zinco-Protoporfirino-IX
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-ona

pg	Picogramas
PGE2	prostaglandina E2
s	Segundos

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
1.1 Pré-condicionamento isquêmico (PCI)	25
1.2 Pré-condicionamento isquêmico a distância e inflamação	27
1.3 Inflamação e tráfego de células inflamatórias	31
1.4 Mecanismos e mediadores envolvidos nos processos de migração de células inflamatórias	31
1.5 Modulação da resposta inflamatória.....	36
1.6 Pré-condicionamento isquêmico remoto e migração celular	37
1.7 Justificativa.....	40
2 OBJETIVO.....	42
3 MÉTODOS	44
3.1 Animais.....	45
3.2 Drogas, reagentes e anticorpos	45
3.3 Modelo de Indução do pré-condicionamento isquêmico a distância (PCI)	47
3.4 Modelo de migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de camundongos.....	49
3.5 Contagem de leucócitos totais e diferencial	49
3.6 Isolamento de neutrófilos por gradiente de Percoll	49
3.7 Ensaio de citometria de fluxo	50
3.8 Protocolos experimentais	52
3.8.1 Tráfego leucocitário	52
3.8.1.1 Protocolo I: Migração celular <i>in vivo</i> em cavidade peritoneal	52
3.8.1.1.1 Efeitos dos inibidor de HO-1 e inibidor específico de iNOS na migração de neutrófilos induzida por Carragenina (Cg) em camundongos submetidos ao PCI a distância	52
3.8.1.2 Protocolo II: Rolamento e adesão leucocitária em microcirculação de mesentério de camundongos analisados por microscopia intravital.....	53
3.8.1.2.1 Efeitos do inibidor de HO-1 no rolamento e aderência de leucócitos na microcirculação mesentérica de camundongos submetidos ao PCI a distância	54

3.8.2 Participação de receptores transmembrana.....	54
3.8.2.1 Protocolo III: Ensaio de quimiotaxia	54
3.8.2.1.1 Efeitos do inibidor de HO-1, inibidor específico de iNOS e inibidor de GCs na migração <i>in vitro</i> de neutrófilos desafiados com quimiotático KC de camundongos submetidos ao PCI a distância.....	55
3.8.2.2 Protocolo IV: Ensaio de imunofluorescência (GRK2)	55
3.8.2.2.1 Expressão de GRK-2 na microcirculação mesentérica de camundongos selvagens e pré-condicionados pré-tratadas com ZnPPIX, 1400W, e ODQ.....	56
3.8.2.3 Protocolo V: Ensaio de citometria de fluxo	56
3.8.2.3.1 Expressão de CXCR-2 em neutrófilos de camundongos pré-condicionados WT e pré-tratadas com ZnPPIX, 1400W, e ODQ	57
3.8.3 Proteínas de adesão	57
3.8.3.1 Protocolo VI: Citometria de fluxo para CD11b.....	57
3.8.3.1.1 Expressão de CD11b em neutrófilos de camundongos pré-condicionados WT e pré-tratadas com ZnPPIX, 1400W, e ODQ	58
3.8.3.2 Protocolo VII: Migração <i>in vitro</i> em nocautes para ICAM-1 e β 2-integrina	58
3.8.3.3 Protocolo VIII: Dosagem de bilirrubina no plasma de animais pré-condicionados	58
3.9 Análise estatística	59
4 RESULTADOS	60
4.1 Efeito inibitório do PCI sobre a migração de neutrófilos em lavado peritoneal....	61
4.1.1 Ação dos inibidores de iNOS (Aminoguanidina) e Heme-oxigenase-1 (ZnPPIX) no efeito inibitório do pré-condicionamento isquêmico a distância	61
4.2 Inibição da atividade leucocitária pelo PCI: Diminuição do rolamento e adesão leucocitárias pelo pré-condicionamento isquêmico a partir de mecanismo dependente de HO-1	67
4.3 Inibição da atividade dos neutrófilos pelo pré-condicionamento a distância: Diminuição da transmigração <i>in vitro</i>	73
4.3.1 Prevenção do efeito inibitório do PCI a distância por inibidor de HO-1 (ZnPPIX) e por inibidor específico de iNOS (1400W) e inibidor GCs (ODQ) sobre a migração de neutrófilos <i>in vitro</i>	75

4.4 Expressão de GRK2 nos neutrófilos pelo PCI a distância e Prevenção do aumento da expressão de GRK2 nos neutrófilos pelo PCI a distância por inibidores de HO-1, iNOS e GCs.....	79
4.5 Inibição do aumento da expressão de GRK2 pelo pré-tratamento com inibidores de iNOS (1400W), de HO-1 (ZnPPiX) e de GCs (ODQ) em neutrófilos de animais pré-condicionados.....	84
4.6 Diminuição da expressão de CXCR2 nos neutrófilos pelo PCI a distância.....	86
4.7 Diminuição da expressão de CD11b (β 2-Integrina) nos neutrófilos pelo PCI a distância.....	88
4.7.1 Prevenção da diminuição da expressão de CD11b nos neutrófilos pelo PCI a distância por inibidor específico de iNOS (1400W), inibidor de HO-1 (ZnPPiX) e por inibidor de GCs (ODQ).....	90
4.8 Migração de neutrófilos em animais nocautes para ICAM-1: Manutenção da migração nos nocautes.....	94
4.9 Migração de neutrófilos em animais nocautes para β 2-integrina: Inibição da migração nos nocautes.....	96
4.10 Dosagem de bilirrubina no plasma de animais pré-condicionados: Redução da concentração de bilirrubina.....	98
4.10.1 Dosagem de bilirrubina no plasma de animais pré-condicionados e pré-tratados com inibidor de HO-1: Prevenção da redução da concentração de bilirrubina.....	100
4.10.2 Dosagem de bilirrubina no plasma de animais pré-condicionados e pré-tratados com inibidor de iNOS: Prevenção da redução da concentração de bilirrubina.....	102
4.10.3 Dosagem de bilirrubina no plasma de animais pré-condicionados e pré-tratados com inibidor de GCs: Prevenção da redução da concentração de bilirrubina.....	104
4.11 Variação da concentração de bilirrubina com o tempo.....	106
5 DISCUSSÃO.....	108
6 CONCLUSÃO.....	125
7 REFERÊNCIAS.....	127

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Pré-condicionamento isquêmico (PCI)

Dentre as diversas formas de lesão ao organismo, existe uma que se apresenta nos mais diversos tipos de dano tissular: a lesão de isquemia e reperfusão (LIR). Sabe-se que a reperfusão de tecidos submetidos a longos períodos de isquemia resulta em dano endotelial e lesão parenquimatosa (MURRY et al., 1986; ANTELMÍ et al., 1996). Tal lesão pode ser induzida por diversos mecanismos de dano celular, podendo estar presente em inúmeras condições patológicas e aplicações biomédicas: transplante de órgãos e tecidos (FERNÁNDEZ et al., 2002), reconstruções com retalhos livres (RESTIFO; THOMSON, 1998; MOUNSEY et al., 1992), síndrome coronariana isquêmica (GHOSH; GALINANES, 2003), no acidente vascular encefálico isquêmico e nas lesões hepáticas de reperfusão (YIN et al., 1998; PERALTA et al., 1996; 2001), assim como nas demais lesões isquêmicas (LLORIS-CARSI et al., 1993).

Considerando esse grande espectro de apresentação desta lesão, fica indiscutível sua importância. Nos tecidos e órgãos transplantados, invariavelmente há um período de isquemia levando-os a hipóxia durante algumas horas. A LIR, que se segue ao período composto de hipóxia e a subsequente reperfusão, leva por vezes a total ou parcial necrose do tecido ou órgão reperfundido (ZAHIR et al., 1998).

O termo pré-condicionamento isquêmico (PCI) surgiu após a observação pioneira através de experimentos com cães, da presença de um mecanismo endógeno capaz de atenuar a lesão de isquemia e reperfusão, utilizando curtos períodos de isquemia seguidos de períodos subsequentes de reperfusão no sítio da possível lesão de isquemia-reperfusão futura (MURRY et al., 1986).

Vários grupos, a partir de então, vem trabalhando com esse fenômeno em diversas abordagens e aplicações. Zahir et al (1998) demonstraram, pela primeira vez, o aumento de sobrevivência de retalho miocutâneo randomizado em dorso de camundongos pela aplicação de curtos períodos de isquemia e reperfusão na área do retalho.

Frasseto et al (1999) elaboraram um modelo de pré-condicionamento isquêmico cerebral em camundongos capaz de diminuir o estresse oxidativo periférico induzido por isquemia cerebral global de 10 minutos através de PCI com

isquemias sequenciais de 2 minutos. Zhang et al (2002) induziram lesão isquêmica das células retinianas que foi atenuada significativamente com isquemias retinianas anteriores nos camundongos.

Ainda no ano de 2002, Rudiger et al. realizaram um modelo de PCI em fígado de camundongos, no qual observaram melhora de parâmetros de lesão hepática, depois de isquemia prolongada. Em 2004, o efeito protetor do PCI em musculatura esquelética de rato foi observado após clampeamentos sequências da aorta em camundongos por Saito et al.

Foi idealizado por Speechly-Dicket al. (1995) um modelo *in vitro* de isquemia de células atrias humanas pré-condicionadas, as quais foram capazes de recuperarem-se melhor de período extenso de hipóxia do que as células do grupo controle.

Antelmi et al (1996), em um estudo clínico observacional, verificou melhor evolução clínica no grupo de pacientes que apresentaram angina pectoris pré-infarto quando comparados a um grupo sem eventos isquêmicos anginosos prévios, ambos com circulação colateral semelhante.

Em 2007, Salehipouret al., em experimentos com cães, demonstraram efetiva atuação protetora do pré-condicionamento isquêmico nos rins de cachorros, nos quais manteve níveis normais em animais pré-condicionados de marcadores de lesão renal aguda diferentemente de animais não pré-condicionados quando foram submetidos a isquemia renal prolongada.

Atualmente, o pré-condicionamento já atinge as mais diferentes áreas na Medicina como na anestesia onde foi utilizado como fator protetor da medula espinal contra possíveis lesões de isquemia e reperfusão durante um procedimento cirúrgico (DONG et al., 2010).

Thielmann et al., em 2010, realizaram um estudo clínico com pacientes que sofriam de síndrome coronariana isquêmica. Neste, os pacientes tinham indicação de cirurgia de revascularização do miocárdio. Foi demonstrado que o pré-condicionamento isquêmico realizado a distância reduziu lesão miocárdica na cirurgia de revascularização atribuída à parada do miocárdio com uso de solução cardioplégica de perfusão.

1.2 Pré-condicionamento isquêmico a distância e inflamação

Sabe-se que a lesão por isquemia-reperfusão induz a superprodução de oxigênio, levando a produção de espécies reativas de oxigênio, dano endotelial, indução de mediadores inflamatórios e lesão parenquimatosa (LENTSCH; WARD,2000).

Seguindo essa perspectiva, questiona-se a natureza inflamatória da LIR. Estudos mais recentes entendem a lesão de isquemia e reperfusão como uma lesão inflamatória (TAMION et al.,2007; SOUZA FILHO et al.,2009). Diante desse novo entendimento sobre a fisiopatologia da lesão de isquemia-reperfusão, o pré-condicionamento isquêmico está também sendo abordado na perspectiva de evento com atividade anti-inflamatória no sítio da LIR.

A atividade anti-inflamatória do pré-condicionamento isquêmico foi demonstrada em modelo de choque séptico por endotoxina, onde se estudou inclusive a modulação da resposta inflamatória frente ao evento protetor (THUILLEZ et al.,2007).

Vários estudos atualmente estão em desenvolvimento em busca de investigar a atividade anti-inflamatória do pré-condicionamento isquêmico. Nesse sentido, nosso laboratório utilizando modelos clássicos de resposta inflamatória como edema de pata induzido por Carragenina e lesão gástrica por Indometacina tem demonstrado que o PCI é capaz de inibir de forma significativaos eventos inflamatórios observados nessas condições (SOUZA FILHO et al.,2009).

Adicionalmente, também demonstrou recentemente que o PCI promoveu um significativo incremento na sobrevivida de retalho randomizado em dorso de camundongos (SOUZA FILHO et al., 2010). Fica claro nessas duas situações que o PCI tem de fato um efeito anti-inflamatório marcante. (CARROLL; CARROLL,1997 ; KUNTSCHER et al.,2010)

Apesar de a literatura ter demonstrado um mecanismo potencialmente benéfico, o pré-condicionamento sofre algumas críticas. Muito se tem questionado acerca do efeito lesivo dos repetidos intervalos de isquemia sobre o tecido ou órgão em questão, argumentando-se que tais situações poderiam causar agressão direta ao endotélio vascular por ativação do sistema trombogênico e piora da isquemia futura, pelo menos em parte, devido à produção prévia de microtrombos e ativação endotelial (PERALTA et al.,1996).

Diante disso, propôs-se uma nova abordagem para o PCI: o pré-condicionamento isquêmico a distância. Este seria uma nova modalidade de pré-condicionamento em que a indução deste seria realizada a distância do tecido ou órgão sujeito a isquemia ou processo inflamatório (TAPURIA et al., 2008).

Deste modo, a ação protetora do pré-condicionamento isquêmico não será prejudicada por uma possível lesão direta ao tecido-alvo, pois o estímulo pré-condicionante, o torniquete, realizar-se-á em sítio distante, tornando-o inócuo para o sítio alvo.

O pré-condicionamento isquêmico a distância foi demonstrado pela primeira vez no músculo cardíaco (McCLANAHAN et al., 1993). Constatou-se que a isquemia no rim seguido reperusão, levou a diminuição da área de isquemia do miocárdio.

Com isso, obtiveram-se áreas cardíacas perilesionais protegidas e redução do tamanho do infarto. Após essa primeira evidência, foi verificado em modelos animais de pré-condicionamento isquêmico de membros, intestino ou rim, redução do tamanho de infarto, também, em músculo cardíaco.

Nos seres humanos, o pré-condicionamento isquêmico em músculo esquelético está começando a ser usado para a proteção do miocárdio com o efeito benéfico ser atribuído à regulação de proteção endotelial (KHARBANDA et al., 2002).

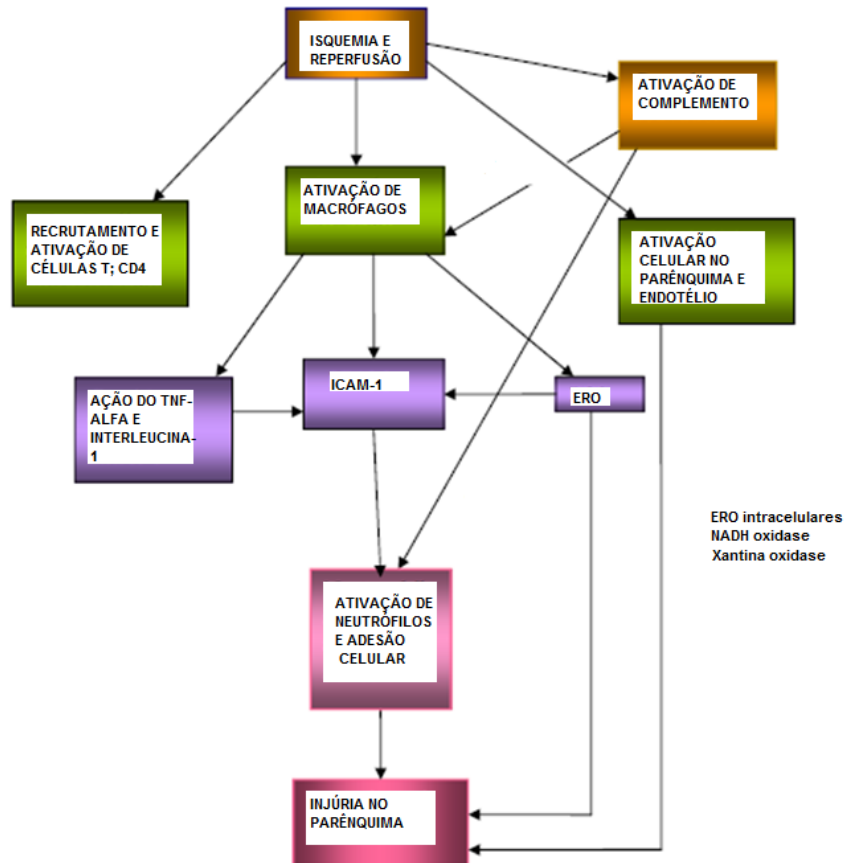
O pré-condicionamento isquêmico a distância é considerado hoje como um evento endógeno anti-inflamatório com sua atividade bem caracterizada e demonstrada (SOUZA FILHO et al., 2009; 2010). Contudo, o mecanismo pelo qual ele age ainda é motivo de muitas discussões. Existem muitas proposições a respeito do PCI a distância, quanto a sua modulação e seus mediadores.

Adenosina, o Óxido Nítrico (NO) (KUNTSCHER et al., 2002), TNF- α , bradicinina, PKC, ciclo-oxigenase, canais K dependente de ATP, capsaicina, proteínas de choque térmico e norepinefrina são exemplos de componentes propostos que estão envolvidos no mecanismo de controle remoto pré-condicionamento isquêmico (LEFER; LEFER, 1996; TAPURIA et al., 2008).

Atualmente, inclusive os opióides estão envolvidos na modulação do PCI (KIUMEHR et al., 2005). Essas substâncias são liberadas como uma resposta ao estresse endotelial e agem através de vias neuronal ou humoral para a produção dos órgãos de proteção (LIM et al., 2010) As vias de mediação envolvidas são

diferentes em resposta a diferentes estímulos isquêmicos e, muitas vezes, se sobrepõem(ADDISON; NELIGAN,2003).

A evidência para o papel de cada um destes compostos, bem como os mecanismos pelos quais atuam e as vias envolvidas são temas que são intensamente estudados hoje em busca de futuramente pensar-se em ter controle sobre essa importante ferramenta, que hoje apenas se apresenta como uma resposta humoral a um estímulo isquêmico (Esquema 1).



ESQUEMA 1- Proposição do mecanismo de injúria inflamatória induzida pela lesão de isquemia e reperfusão

Fonte: Adaptado de TAPURIA N et al. Remote Ischemic Preconditioning: A novel protective method from Ischemia Reperfusion Injury – A review, **J Surg Res.** 150: 304-330, 2008.

1.3 Inflamação e tráfego de células inflamatórias

O processo inflamatório é um evento biológico complexo presente em muitos sítios no organismo humano. O agente ativador desta resposta inflamatória, na grande maioria das vezes, é uma agressão ao indivíduo seja ela endógena ou exógena. A inflamação tem o papel de recrutar, organizar e ativar os vários sistemas no nosso corpo envolvidos na proteção ante um agressor externo (MAJNO; PALACE,1961).Na vigência de uma agressão orgânica, há mobilização de respostas vasculares, ativação e migração de células inflamatórias para o foco danoso, assim como liberação e produção de diversos mediadores inflamatórios responsáveis, seja diretamente, pela modulação do processo, seja indiretamente, pela amplificação dos eventos já em atividade (WEISSMAN,1992).

A inflamação aguda inicia-se com o aumento da permeabilidade vascular que leva a exsudação de fluidos e proteínas causando edema e retenção de líquidos no espaço extravascular (LENTSCH; WARD,2000). Sob estímulo de mediadores quimioatratores, ocorre a migração de leucócitos, na maioria, neutrófilos, em direção ao local inflamado, onde estes, uma vez ativados, eliminam o agente nocivo.

Apesar de ter funções de reparo e defesa no organismo, a inflamação tem um potencial lesivo que pode ser bastante prejudicial ao paciente. Muitas doenças têm a fisiopatologia fundamentada no processo inflamatório crônico,ora contra seu próprio organismo, ora contra agentes invasores que induzem uma resposta cruzada do organismo e este passa a agir contra si, prejudicando a homeostase.

1.4 Mecanismos e mediadores envolvidos nos processos de migração de células inflamatórias

Para que as células inflamatórias atuem na defesa do organismo, é necessária a interação destas com o agente inflamatório na área da lesão. Neste propósito, a migração leucocitária se torna indispensável para que a cadeia de eventos de processo de modo adequado. A sequência de eventos na jornada dos leucócitos do lúmen vascular para o tecido intersticial, chamada de extravasamento, pode ser dividida em 3 etapas(MULLER,2002): 1. Marginalização, rolamento e adesão

de leucócitos ao endotélio; 2. Transmigração; 3. Migração nos tecidos intersticiais em direção ao estímulo. É necessário lembrar que para que ocorra a primeira fase, o endotélio deve estar ativado de modo a permitir a adesão das células a parede vascular.

Para que se desenvolva toda essa sequência, faz-se necessário uma complexa rede de reconhecimento, ativação e seleção de moléculas presentes tanto nas células, endotélio e sítio da inflamação. Diante do exposto, pode-se perceber que moléculas de adesão presentes no endotélio e nos neutrófilos, quimiocinas ou agentes quimioatratadores liberados no foco da inflamação e seus respectivos receptores são protagonistas indispensáveis nessa cinética do tráfego leucocitário (ALEXANDER;HILTON,2004).

As quimiocinas são uma grande família de citocinas, estruturalmente homólogas, que estimulam o movimento dos leucócitos e regulam a migração destes do sangue para os tecidos, em resposta a estímulos inflamatórios, sejam eles internos ou externos (BAGGIOLINI,1998; CHARO; RANSOHOFF,2006).

As principais famílias são a das quimiocinas CC, nas quais os resíduos de cisteína N-terminais são adjacentes, e a família CXC, na qual esses resíduos são separados por um aminoácido, ambas são produzidas por vários tipos de células, como células endoteliais, epiteliais e fibroblastos (MOSER et al.,2004). Em muitas dessas células, a secreção de quimiocinas é induzida por microorganismos, via sinalização por TLR, e por citocinas inflamatórias principalmente TNF e IL-1 (BROMBACHER; KASTELEIN,2003).

Deste modo, as quimiocinas se ligam a células endoteliais e são exibidas, assim, para os leucócitos circulantes que se ligarão às superfícies endoteliais por meio de interações dependentes de selectinas. A exibição endotelial proporciona uma alta concentração local de quimiocinas, as quais ativam as integrinas dos leucócitos, reforçando a adesão e estimulando a mobilidade dos leucócitos e a transmigração pelas paredes dos vasos sanguíneos (CHARO; RANSOHOFF,2006).

Já os receptores de quimiotáticos com sete domínios alfa-helicoidais transmembrana são acoplados as proteínas G, e atuam como proteínas de troca de GTP, catalisando a substituição de GDP pelo GTP. Os receptores de quimiocinas podem ser rapidamente regulados negativamente e internalizados por exposição à quimiocinas, e esse é um importante mecanismo proposto para a finalização das

respostas. Já foram identificados em torno de dez receptores de quimiocinas CC (CCR1 a CCR10) e seis de CXC (CXCR1 a CXCR6).

Estes receptores são expressos em leucócitos, principalmente neutrófilos. Tais receptores são essenciais para o recrutamento de neutrófilos na vigência de um processo de inflamação seja por agressão endógena ou por infecção a partir de agente externo (PEREIRA et al., 1987; MOSER et al., 2004). As quimiocinas são importantes para a ativação endotelial seja induzindo o rolamento dos leucócitos no endotélio, seja aumentando a afinidade das integrinas destes por seus ligantes. Estes são eventos fundamentais para a firme aderência dos leucócitos ao endotélio.

A expressão de ligantes de integrinas no endotélio é estimulada a princípio por IL-1 e TNF, cooperativamente as quimiocinas são fatores amplificadores dessa etapa. Elas induzem o tráfego leucocitário em direção ao gradiente químico da citocina pró-inflamatória. (MORENO et al., 2006).

Na família da CXC, quimiocinas que contêm glutamato-leucina-arginina (CXCL-1, CXCL-2 e outras) estão principalmente envolvidas no recrutamento de neutrófilos para os locais de inflamação.

Os neutrófilos são um dos componentes chave na resposta inflamatória. Atualmente, são as células inflamatórias mais estudadas. Como principal dos fagócitos circulantes, estas células são os leucócitos que primeiro e mais abundante chegam ao foco de infecção.

Os neutrófilos são ideais para a eliminação de organismos patogênicos, bactérias, por exemplo, devido a grande quantidade de enzimas proteolíticas e rápida produção de oxigênio e nitrogênio reativos espécies responsáveis pela destruição do organismo estranho (ALVES-FILHO, CUNHA, 2005; 2006; 2008).

Com estudos mais atuais da função do neutrófilo na resposta inflamatória, sabe-se hoje que eles têm um enorme potencial de induzir dano ao tecido, ao osso e cartilagens por secreção de proteases e metabólitos tóxicos do oxigênio, assim como direcionar a inflamação através da apresentação de antígenos, secreção de citocinas, prostaglandinas e leucotrienos (WRIGHT et al., 2010).

Portanto, não é nenhuma surpresa que essas células têm um papel fundamental na defesa contra processos inflamatórios como infecções bacterianas (CUNHA et al., 2008).

A migração de neutrófilos (Figura 1) do compartimento intravascular para o extravascular ocorre predominantemente nas vênulas pós-capilares.

Detalhadamente, sabe-se que o passo inicial é a marginalização, ou seja, os neutrófilos se movimentam em direção a periferia do vaso provenientes do leito central.

Este evento permite a interação molecular entre as células superfícies endoteliais e neutrófilos, anteriormente citados, no qual acarretará em interação íntima dessas células com a parede vascular (SMITH,1993).

Os neutrófilos começarão o rolamento leucocitário devido a forte interação de forças moleculares mediadas por selectinas e seus ligantes. Selectinas são uma família de glicoproteínas de superfície, moléculas de adesão, e incluem a E-selectina (expressa em células endoteliais), a L-selectina (expressa exclusivamente nos leucócitos) e a P-selectina (expressa em plaquetas e células endoteliais).

L-selectina é expressa constitutivamente em neutrófilos circulantes quiescentes, enquanto que E-selectina e P-selectina são expressas nas células endoteliais após a ativação (KANSAS,1996; POWNER et al.,2007). Com isso, vê-se que as integrinas são fundamentais para a adesão de neutrófilos e representantes como a β 2-integrina, também conhecida como CD11b é uma das mais importantes no processo de reconhecimento e adesão de neutrófilos (HUTTENLOCHER,1995; CARRIGAN; PINK,2007).

Após a ativação via receptores de citocinas, as integrinas dos leucócitos se ligam aos membros da superfamília imunoglobulina presentes na membrana das células endoteliais, como a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) (LAUDANNA et al., 2002; YANG; FROIO, 2005). Como já foi esclarecido, após a adesão, leucócitos necessitam de um gradiente de quimioatração para completar o processo de transmigração (MULLER, 2003).

Existem muitos fatores quimiotáticos como fator complementar 5, leucotrieno B4, fator ativador plaquetário, e fosfolípidios de membrana de bactérias (BOKOCH,1995). No entanto, existem tipos específicos, com os quais os leucócitos podem ser atraídos: citocinas ou quimiocinas, como a IL-8 (ou CXCL-1/2).Esta está relacionada, principalmente, à quimiotaxia de neutrófilos nos mais diversos processos inflamatórios(HECHTMAN et al., 1991; CARPAGNANO; SPANEVELLO, 2010).

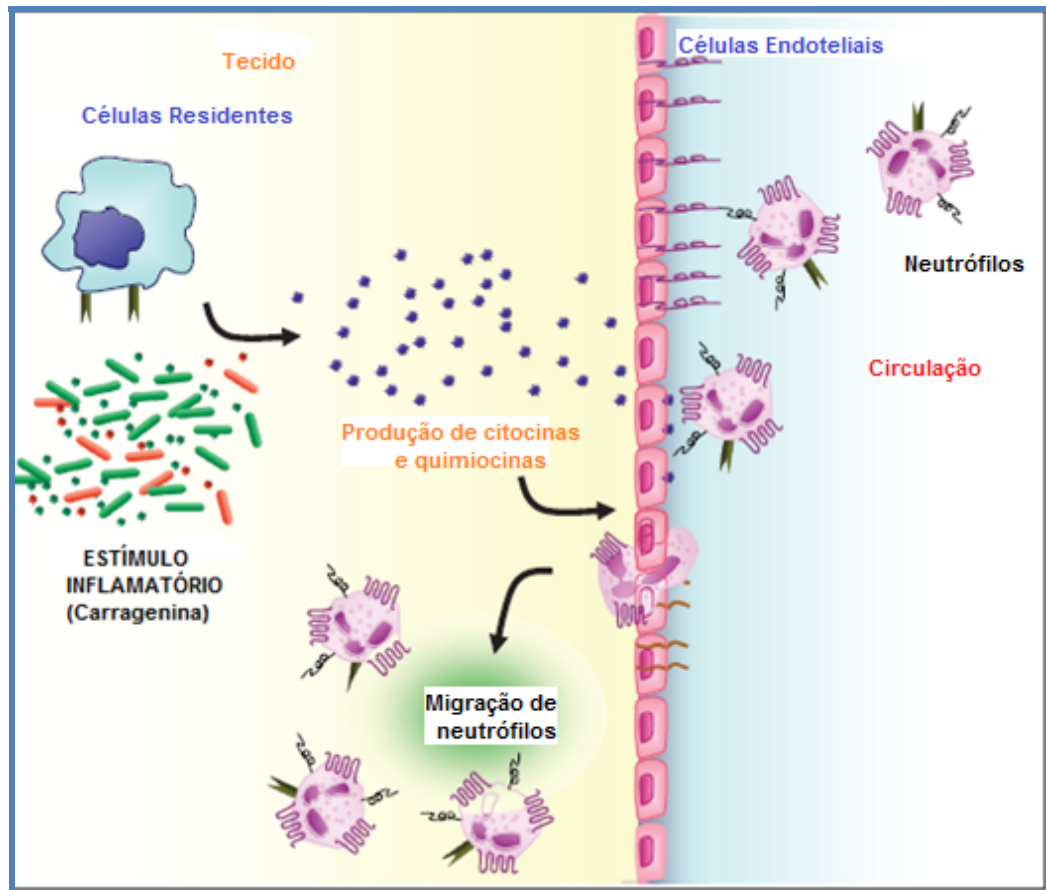


FIGURA 1- Migração de neutrófilos para o sítio inflamatório em resposta a estímulo quimiotático

Fonte: Adaptado de ALVES-FILHO et al.: The role of Neutrophils in severe sepsis. *Shock*, Vol 30, Supplement 1, pp. 3-9, 2008.

1.5 Modulação da resposta inflamatória

Tão importante quanto à migração é a modulação desta na resposta inflamatória. A migração de neutrófilos é regulada por uma vasta gama de mediadores inflamatórios, que incluem lipídios (lipoxinas), citocinas e as moléculas gasosas (SIMON; GREEN, 2005). Entre os mediadores gasosos, o Óxido Nítrico (NO) e o monóxido de carbono (CO) são importantes moduladores da migração de neutrófilos (HICKEY et al., 1997; 2001; PAUL-CLARK et al., 2001; NAUGHTON et al., 2002; WILLS et al., 1996).

O NO é produzido a partir de L-arginina e oxigênio em uma reação catalisada por uma família de enzimas de óxido nítrico sintase (NOS). Três isoformas desta enzima têm sido identificados: neuronal (nNOS ou tipo I), induzível (iNOS ou tipo II), e endotelial (eNOS ou tipo III). Tipos I e III são isoformas expressas constitutivamente, enquanto o tipo II ou iNOS pode ser induzida durante a resposta imunológica e inflamatória (MONCADA et al., 1991; ALDERTON et al., 2001).

Os mecanismos pelos quais NO atenua o acúmulo de neutrófilos não estão completamente esclarecidos, apesar de evidências sugerirem que o NO formado por iNOS ou eNOS modula as interações leucócito-endotélio celular. Inibidores seletivos de iNOS e eNOS aumentam a adesão de neutrófilos às células endoteliais, enquanto que doadores de NO diminuem tanto a adesão quanto a transmigração de leucócitos para sítios inflamatórios (CUZZOCREA et al., 2000; AJUEBOR, 1998; IALENTI et al., 2000; LEFER et al., 1999). Componentes dependentes de NO ainda por serem conhecidos também atuam inibindo a inflamação através da inibição adesão de neutrófilos a células endoteliais (KOSONEN et al., 1999).

Além disso, a expressão nas células e endotélio de moléculas de adesão como as β 2-integrinas e ICAM-1 são reguladas negativamente por doadores de NO e positivamente por inibidores de NOS (ZADEH et al., 2000; LEFER et al., 1999; KUBES et al., 1991; 1999; SPIECKER et al., 1998; FURIE et al., 1991).

Este efeito é dependente de guanosina monofosfato cíclico (DAL SECCO et al., 2006), um produto da guanilato ciclase ativada a partir de NO. Conclui-se tal fato, pois os inibidores da guanilato ciclase impedem os efeitos inibitórios de doadores de

NO na adesão de leucócitos e na expressão de moléculas de adesão (DAL SECCO et al., 2006; CATERINA; LIBBY et al., 1995).

Numerosos estudos têm demonstrado que a enzima heme-oxigenase (HO), uma enzima microsomal que catalisa a degradação do heme (ABRAHAM et al., 1988), juntamente com os seus produtos finais CO, biliverdina e ferro livre, são capazes de modular o processo inflamatório. Estes reduzem a migração celular, a exsudação, a liberação de TNF- α e a expressão de moléculas de adesão (VICENTE et al., 2003).

Três isoformas da Heme-oxigenase foram caracterizadas. A Heme oxigenase-1, uma isoforma induzível por um estímulo inflamatório, é expressa em uma variedade de células, incluindo as endoteliais e neutrófilos. A expressão de heme-oxigenase-1 pode ser modulada por citocinas, NO, endotoxina, heme e durante uma resposta inflamatória (WILLIS et al., 1996; ALCARAZ et al., 2003).

As Heme oxigenase 2 e 3 são isoformas constitutivamente expressas no cérebro, testículos e endotélio (MAINES, 1997). Cunha et al. (2008) demonstrou que a modulação pela HO-1 leva a uma regulação negativa do recrutamento de neutrófilos induzida pela injeção intraperitoneal de Carragenina, pois foi constatada a redução do rolamento e adesão de neutrófilos no endotélio.

Estes efeitos não parecem ser mediados por NO. Paradoxalmente, também foi demonstrado por Cunha et al. (2008) que o efeito inibitório do NO sobre o recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório envolve a via da Heme-oxigenase (FREITAS et al., 2006).

1.6 Pré-condicionamento isquêmico remoto e migração celular

Diante dos novos conceitos do pré-condicionamento isquêmico a distância aplicados ao processo inflamatório, investiga-se hoje a inibição da participação de mediadores inflamatórios nas várias fases da inflamação, mediada pelo PCI.

Como sabemos, a migração de neutrófilos é um evento crucial no mecanismo de inflamação, e por isso torna-se um tema indispensável para entender a mediação do PCI a distância sobre a resposta inflamatória.

Estudos atuais advogam que para que a migração de neutrófilos ocorra, tanto para a adesão como para a própria quimiotaxia, deve-se existir um substrato

mecânico e bioquímico, os quais seriam os responsáveis pela interação celular migratória. Deste modo, torna-se imperativo estudar os mediadores envolvidos na migração (JANNAT et al., 2010; DRISCOLL et al., 1995; KATANAEV, 2001).

No estudo desenvolvido por Souza Filho et al. (2009), verifica-se a aplicabilidade do efeito anti-inflamatório do PCI a distância nos modelos de edema de pata, cistite hemorrágica e lesão gástrica pelo pré-condicionamento remoto. Entender o quão significativa é a migração de neutrófilos nesses processos nos mostrar o real valor do entendimento da relação PCI e migração para esclarecer o envolvimento de mediadores na modulação desse processo.

No edema de pata induzido por carragenina, sabe-se que grande parte da resposta inflamatória é mediada por migração de leucócitos polimorfonucleares em comparação a edema de pata mediado por outros mecanismos como no edema por Dextran 70, fato bem demonstrado no estudo de Thomazzi et al. em 1995.

No modelo de cistite hemorrágica, sabe-se que a migração de neutrófilos também tem importante participação demonstrado inclusive em estudo de Lima et al. em 1994 onde estudo a cistite induzida por ciclofosfamida e observou-se um importante infiltrado neutrofílico nas lesões estabelecidas.

Quanto à lesão gástrica induzida por indometacina, o principal mecanismo de toxicidade dessa droga no epitélio gástrico é a inibição de prostaglandinas como a PGE₂, via inibição das cicloxigenases devido à inibição de eventos de defesa do epitélio mediados por essa via (WALLACE, 1997).

Estudos anteriores e recentes apontam para um papel importante dos neutrófilos na gênese desta lesão, pois a indometacina é capaz de desencadear um aumento no número de neutrófilos aderidos ao endotélio na microcirculação gástrica dos camundongos (MALECH; GALLIN, 1987; NIGGLI, 2003).

A indução de neutropenia ou utilização de soro anti-neutrófilos também inibe a lesão gástrica induzida por AINES (Figura 2). Diante dos importantes resultados de Souza Filho et al. (2009), pelos quais ficou demonstrado a inibição do processo inflamatório pelo pré-condicionamento isquêmico nos modelos acima discorridos e discutidos, percebe-se a significativa participação da migração de neutrófilos nos processos inflamatórios e a ação da regulação negativa do PCI em relação à migração de neutrófilos para o sítio inflamatório.



Aspecto macroscópico de estômagos de camundongos 3 h após a injeção intragástrica de veículo Tris(A), indometacina sozinho (B) ou indometacina com o membro posterior previamente submetido ao pré-condicionamento isquêmico (C). As setas indicam as lesões gástricas lineares.

FIGURA 2- Efeito protetor do pré-condicionamento isquêmico a distância na lesão gástrica induzida por AINES

Fonte: Retirado de M.V.P. Souza Filho et al. Hind limb ischemic preconditioning induces an anti-inflammatory response by remote organs in rats. Braz J Med Biol Res 2009; 42: 921-929.

Além disso, estudos têm mostrado a importante mediação da inibição do dano inflamatório pelo PCI através da inibição da heme-oxigenase na lesão de isquemia e reperfusão (MALLICK; WINSLET, 2009).

Tal ação atribuída ao PCI e relacionada com a mediação da HO, faz-se questionar a participação da inibição da migração de células dentro desse processo, tanto em lesões de isquemia-reperfusão (MALLICK; WINSLET, 2009) propriamente ditas como lesões induzidas por mediadores inflamatórios clássicos.

Tendo em vista a existência indiscutível do PCI e suas recém-descobertas amplificadas funções como o PCI a distância, faz-se necessário aprofundar o conhecimento a respeito de como se processa esse mecanismo endógeno tão poderoso quando nos referimos à inibição da cascata inflamatória.

Assim, é de importância indiscutível o estudo do envolvimento da migração de neutrófilos para desvendar as vias envolvidas no PCI. Tal tema tem significado central, pois o PCI pode agir em vários pontos da via da inflamação em que a migração de neutrófilos (mn) estará envolvida: formação de interleucinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, formação de NO induzível, mecanismos de adesão, rolamento e transmigração celular, aumento de permeabilidade celular, quimiotaxia e ativação de leucócitos polimorfonucleares, em especial, de neutrófilos.

1.7 Justificativa

O pré-condicionamento isquêmico é o mais potente mecanismo endógeno conhecido capaz de inibir a LIR e hoje, de agir como importante agente anti-inflamatório em diversas situações. Deste modo, tal fenômeno ganha grande importância quando se pensa no contexto clínico de sua aplicação e no consequente benefício para a humanidade.

Processos mórbidos como o infarto do miocárdio e o AVC estão diretamente envolvidos com a LIR, além dos procedimentos cirúrgicos como transplantes, cirurgias cardíacas e retalhos microcirúrgicos.

A inflamação está presente em todos estes eventos, e o PCI a distância vem sendo demonstrado como atuante agente inibitório desses mecanismos lesivos. Além do mais, o PCI a distância é um procedimento de simples execução e de baixa morbidade frente ao benefício grandioso a que se propõe.

Percebe-se também que a migração de neutrófilos na resposta inflamatória, apresenta-se como peça chave no desenvolvimento da atividade do PCI sobre a cadeia flogística, sendo indispensável ao entendimento do mecanismo e dos mediadores que agem a partir da indução do PCI.

Deste modo, este estudo tem como objetivo principal: Esclarecer a participação do pré-condicionamento isquêmico remoto na inibição do processo inflamatório a distância. Entender como alguns mediadores participam desse inibitório e como a migração celular é mobilizada na vigência de um processo inflamatório bloqueado pela ação do PCI a distância são objetivos específicos desse trabalho.

2 OBJETIVO

2 OBJETIVO

Avaliar o envolvimento do Óxido Nítrico, do Monóxido de Carbono, de proteínas de adesão (ICAM-1 e β 2-integrina) e do receptor CXCR2 no efeito inibitório do pré-condicionamento isquêmico (PCI) a distância sobre a migração de neutrófilos.

3 MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mamalia, Rodentia, Muridae, Nome científico: Mus musculus*) machos, adultos de linhagens diversas, com peso variando de 18 a 25 gramas. O cuidado e tratamento dos animais foram embasados no Guia Internacional de Manejo e Uso de animais de laboratório de Bethesda e a pesquisa foi também aprovada pelo comitê de ética em pesquisa com animais da faculdade de medicina da Universidade Federal do Ceará.

Foram usados camundongos Swiss provenientes do biotério central da UFC e camundongos C-57BL6, assim como 10 animais knockouts para β 2-integrina (β 2-integrina^{-/-}) e ICAM-1 (ICAM-1^{-/-}), obtidos do biotério Central da faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e mantidos em biotério no departamento de Farmacologia em temperatura ambiente com livre acesso a água e comida.

As matrizes reprodutoras dos camundongos com fragmentos silenciados para gene ICAM-1 e β 2-integrina foram obtidos do Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine). Todas as soluções administradas aos animais foram preparadas em PBS estéril e filtradas através de filtros de Millipore Sterile Millex-GS 0.22 μ m filters (Millipore Corporation).

3.2 Drogas, reagentes e anticorpos

- 1- Carragenina (Cg), (Sigma).
- 2- Zinco-protoporfirino-IX (ZnPPIX; inibidor específico de HO-1) (Sigma).
- 3- Tribromo-etanol a 2,5% (Aldrich Chemical).
- 4- Aminoguanidina (Amino; Inibidor seletivo de iNOS),(Sigma).
- 5- 1400W(inibidor específico de iNOS) (Sigma).
- 6- ODQ: 1H-(1,2,4)oxadiazolo(4,3-a)qui-noxalin-1-ona (Inibidor de Guanilato ciclase) Sigma (EUA).
- 7- Anticorpos de coelhos anti-camundongos CD54/ ICAM-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA).
- 8- Anticorpo de cabra anti-coelho biotin-labeled (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

- 9- Complexo avidin–biotin–per-oxidase (Vector).
 10-3,3-diaminobenzidine tetrahy- drochloride (DAB; Sigma).
 11-Isotipo controle de coelho anti-camundongo GRK2 Ab (Santa Cruz Biotechnology).
 12- KC (quimiocina derivada de queratinócitos) (Invitrogen)

Soluções e corantes:

- Solução salina:

Cloreto de sódio a 0.9% estéril

- Tampão Tris:

Hidroximetil aminometano (Tris) 6,1g

Água destilada 500ml

O pH do tampão foi acertado para 8,0.

- Tampão de lise de hemácias – tampão Tris-Cloreto de Amônio:

Cloreto de Amônio (NH₄Cl) 2,14g

Água deionizada 250ml

Esterilização por filtração com filtro de 0,22µm.

- Tampão PBS-BSA a 0,1%:

BSA (Sigma) 0,1g

Tampão PBS 100ml

Esterilização por filtração com filtro de 0,22µm.

- Salina tamponada com fosfato (PBS):

Cloreto de Sódio 8,0g

Cloreto de Potássio 0,2g

Fosfato de Sódio dibásico 1,15g

Fosfato de Sódio monobásico 0,2g

Água destilada 1,0 litro

O pH foi ajustado para 7,4 com NaOH ou HCl.

- Solução de Turk:

Ácido acético glacial (Merck)	20,0ml
Violeta de Gensiana.....	2,0ml
Água destilada	1,0 litro

- Hematoxilina (REAGEN);**- Eosina (REAGEN).****3.3 Modelo de Indução do pré-condicionamento isquêmico a distância (PCI)**

Para a indução do pré-condicionamento isquêmico à distância, foi utilizado um modelo desenvolvido por Küntscher em 2002, com o uso de um torniquete com uma faixa elástica circundando o membro inferior direito do camundongo com pressão suficiente para manter o membro isquêmico por 10 minutos (Figura 3). Seguiu-se a este intervalo de tempo, 30 minutos de reperfusão do membro. As participações do NO e do CO foram investigadas usando inibidores específicos para os respectivos gases: (1400w; 3mg/kg or Aminoguanida; 50mg/kg; s.c.) e HO-1 (ZnPPIX; 10mg/kg; s.c.) ou ODQ (5 µmol/kg; i.p.) também foi utilizada salina como pré-tratamento para o controle. O pré-tratamento era realizado 30 minutos antes do pré-condicionamento do animal.



FIGURA 3- Camundongo anestesiado usando o torniquete com a faixa elástica no membro inferior direito, durante o período de isquemia (10 minutos) (Küntscher ; 2002)

Fonte: Pesquisa direta

3.4 Modelo de migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de camundongos

Depois do pré-tratamento e da indução do pré-condicionamento isquêmico a distância, a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal do animal era induzida por injeção de Carragenina (500 μ g/cav). Depois de quatro horas, os camundongos eram sacrificados e as células da cavidade peritoneal eram colhidas por lavado da cavidade com 3 mililitros com PBS contendo EDTA (0,1mM).

Os volumes colhidos foram similares em todos os grupos e equiparados a cerca de 95% do volume injetado. A contagem total de células foi realizada por Contador de células (COULTER™ ACT; Coulter Corporation, Miami, FL, USA) e a contagem diferencial (total de 100 células) foram realizados em uma centrífuga montando-se lâminas posteriormente coradas com HE (Cytospin™3; Shandon Lipshaw Inc., Pittsburgh, PA, USA). Os resultados foram apresentados como número de neutrófilos por cavidade.

3.5 Contagem de leucócitos totais e diferencial

Os animais foram levemente anestesiados com éter etílico para coleta de 20 μ L de sangue. Esta amostra foi diluída imediatamente em 380 μ L de solução de Turk. A contagem total de leucócitos na amostra foi realizada utilizando-se uma câmara de Neubauer e a diferencial feita também na Neubauer para definir o percentual de neutrófilos.

3.6 Isolamento de neutrófilos por gradiente de Percoll

Anestesiava-se o animal, retirava o sangue do animal, via retro-orbital ou punção cardíaca, colocando o sangue no coletor heparinizado, agitando frequentemente à medida que for retirando o sangue. Depois sacrificava o animal. Aproximadamente 1mL de sangue por animal era o necessário, em seguida completava até 2mL com Hanks 1X e homogeneizava, montavam os gradientes, primeiro adicionava-se ao tubo falcon (de 15mL), 3mL dopercoll a 72% e

posteriormente, cuidadosamente, adicionava 3mL do percoll a 65%, inclinando o tubo mais ou menos 35°, adicionava o sangue (diluído em Hanks 1X) em cima do gradiente de 65% e 72% de Percoll.

Centrifugava o gradiente a 1200 g por 32 minutos na temperatura ambiente (25°C), aceleração e desaceleração 2. Os neutrófilos ficavam na marcação de 3mL no tubo. Retirava a parte superior com auxílio de uma pipeta Pasteur e após retirava a “nuvem” de neutrófilos e passava para outro tubo (adicionava no máximo dois gradientes por tubo para lavar, sendo do mesmo grupo).

Lavava-se a primeira vez com solução de lise (NH₄Cl), completando até 14mL, 400g por 8 minutos e 25°C, aceleração e desaceleração 7; em seguida desprezava-se o sobrenadante e ressuspensava o sedimento celular com Hanks 1X, adicionava primeiro 3mL e homogeneizava o sedimento celular, em seguida ia completar até 12mL com Hanks 1X, centrifugar a, 400g por 8 minutos e 25°C, aceleração e desaceleração 7. Descartava-se o sobrenadante após centrifugação e ressuspensava o sedimento de neutrófilos com 500µL de RPMI, contava-se assim o total e o diferencial.

3.7 Ensaio de citometria de fluxo

Usava-se 100µL do sangue total (heparinizado ou com EDTA), colocava em tubos de FACS, de acordo com os grupos. Colocava-se os anticorpos de acordo com o objetivo. Usava-se: 0,5 µL anti-Gr1-PerCP (marcador de neutrófilos) mais 3-6µL do anticorpo primário, em seguida ia usar os anticorpos controles (IgGs), de acordo com as marcações utilizadas, incubar por 30 minutos a 4°C, ou no gelo ou na geladeira, protegidos da luz.

Lavava-se 2 a 3 vezes com 3 mL de tampão de lise (NH₄Cl) com a centrifugação de 400xg, 08 minutos, 4°C). Lavou-se 1 X com 2 mL de tampão de FACS com a centrifugação de 400xg, 08 minutos, 4°C). Ressuspendeu-se em 100µL de solução de formaldeído a 1% em PBS. Leu-se no aparelho FACSort, ou quando não lidas imediatamente, deixou-se as células mantidas a 4°C, na geladeira, até o dia seguinte para análise.

DESENHO EXPERIMENTAL

Tráfego Leucocitário

Protocolo I: Migração celular *in vivo* em cavidade peritoneal

Protocolo II: Rolamento e Adesão leucocitária em microcirculação

Participação de Receptores transmembrana

Protocolo III: Ensaio de Quimiotaxia

Protocolo IV: Ensaio de Imunofluorescência (GRK2).

Protocolo V: Ensaio de Citometria de fluxo para CXCR2

Proteínas de adesão

Protocolo VI: Citometria de fluxo para CD11b

Protocolo VII: Migração *in vivo* em nocautes para ICAM-1 e B2-integrina

Protocolo IX: Dosagem de bilirrubina

QUADRO 1- Esquema das metodologias aplicadas aos vários protocolos utilizados na investigação

Fonte: Pesquisa direta

3.8 Protocolos experimentais

3.8.1 Tráfego leucocitário

3.8.1.1 Protocolo I: Migração celular *in vivo* em cavidade peritoneal

Animais Swiss foram divididos em grupos de cinco animais (n=5) Grupo I: controle selvagem (WT) tratado com salina; Grupo II: animais selvagens (WT) tratados com Carragenina (indutor inflamatório); Grupo III: animais selvagens (WT) foram pré-condicionados com um torniquete de faixa elástica por dez minutos em seguida liberada a faixa por 30 minutos (período de reperfusão) e tratados com Carragenina 500µg (indutor inflamatório); Grupo IV: animais selvagens (WT) foram pré-tratados com inibidores de iNOS (1400W; 3mg/kg ou Aminoguanidina; 50mg/kg).

A seguir pré-condicionados com um torniquete de faixa elástica por dez minutos em seguida liberada a faixa por 30 minutos (período de reperfusão) e tratados com Carragenina 500microg i.p (indutor inflamatório) Grupo V: animais selvagens (WT) foram pré-tratados com inibidor de HO-1 (ZnPPIX; 10mg/kg) a seguir pré-condicionados com um torniquete de faixa elástica por dez minutos em seguida liberada a faixa por 30 minutos (período de reperfusão) e tratados com Carragenina 500µg i.p (indutor inflamatório); realizou-se o sacrifício dos animais quatro horas após, então foi feito o lavado da cavidade peritoneal com salina e o número de leucocitos avaliado.

3.8.1.1.1 Efeitos dos inibidor de HO-1 e inibidor específico de iNOS na migração de neutrófilos induzida por Carragenina (Cg) em camundongos submetidos ao PCI a distância

Os camundongos foram pré-tratados por via subcutânea (sc) com sauna tamponada com fosfato (PBS, 0,2 mL) ou com inibidores da NOS, (inibidor seletivo da iNOS aminoácidos), na dose de 50mg/kg e com 1400W (inibidor específico de iNOS), na dose de 3mg/kg ou inibidor de HO-1 (ZnPPIX; 10mg/kg, sc). Trinta minutos depois de realizada a indução da isquemia. Depois de feita a indução do

PCI, os camundongos pré-tratados também foram injetados ip com Cg na dose de 500 µg por cavidade. A migração de neutrófilos foi determinada após 4h, como descrito acima.

3.8.1.2 Protocolo II: Rolamento e adesão leucocitária em microcirculação de mesentério de camundongos analisados por microscopia intravital

Resumidamente, os animais foram anestesiados com Tribromo-etanol a 2,5% (250mg/kg). O tecido mesentérico foi exposto para exame microscópico in situ. Isto foi conseguido através de uma incisão longitudinal da pele e músculo abdominal do lado direito do corpo, seguido pela exposição do mesentério. Movimentos respiratórios dos animais não afetaram a preparação e as características da microcirculação permaneceram essencialmente estáveis durante todo o curso do experimento.

Os animais foram mantidos em placa especial termo estabilizado a 37°C, com uma plataforma transparente em que o tecido mesentérico a ser transiluminada foi colocado. Na preparação, o tecido foi mantido úmido e quente, irrigando-o com uma solução aquecida (37°C) Ringer Lactato pH 7,2-7,4.

As imagens foram gravadas em um gravador de vídeo com um objetivo 40x longa distância e uma abertura numérica 0,65. A imagem dividida e micrômetrada foi ajustada para a célula fotoelétrica do microscópio. Um divisor de imagem separou a imagem óptica em duas imagens separadas.

Girando o divisor de imagem na célula fotoelétrica, a corte manteve-se em uma direção perpendicular ao eixo. O deslocamento de uma imagem da outra medida permitida do diâmetro do vaso. Vasos selecionados para estudo foram vênulas terceira ordem, definidas de acordo com seus vasos locais para dentro da rede microvascular. Estes vasos corresponderam a vênulas pós-capilares, com um diâmetro de 10-18 µm.

A interação dos leucócitos com a superfície luminal do endotélio venulares foi estudada em um segmento do vaso. Leucócitos rolantes foram definidos como os glóbulos brancos que se moviam a uma velocidade menor do que eritrócitos no mesmo pertuito. O número de leucócitos circulantes foi determinado em intervalos de 10 minutos.

Estes leucócitos moviam com lentidão suficiente para serem vistos individualmente e foram contados enquanto rolavam em todo o comprimento de 10µm da vênula. Um dos leucócitos era considerado quando se aderido ao endotélio venular, caso ele permanecesse parado durante mais de 30 segundos.

As células aderentes foram expressas como o número de células por 10µm de comprimento venular. As células foram contadas na imagem gravada com cinco campos diferentes para cada animal, para evitar a variabilidade devida à amostragem. Os dados foram, então, expressos em média, para cada animal.

3.8.1.2.1 Efeito do inibidor de HO-1, ZnPPIX, no rolamento e aderência de leucócitos na microcirculação mesentérica de camundongos submetidos ao PCI a distância

Os camundongos foram pré-tratados por via subcutânea (sc) com salina tamponada com fosfato (PBS, 0,2 mL) ou HO-1 (ZnPPIX; 10mg/kg, sc). Trinta minutos após, foi realizada a indução do PCI a distância. Após ser feita a indução do PCI, os camundongos pré-tratados também foram injetados ip com Cg na dose de 500 µg por cavidade.

O rolamento e adesão de leucócitos à porção ileocecal da microcirculação mesentérica foram determinados em cinco campos diferentes para cada mesentério de cada animal, por microscopia intravital, 2 e 4 h após, respectivamente. Os animais do grupo controle (C) foram injetados ip com PBS (0,2 mL). Os dados foram, então, expressos em média, para cada animal.

3.8.2 Participação de receptores transmembrana

3.8.2.1 Protocolo III: Ensaio de quimiotaxia

O ensaio de quimiotaxia foi realizado em câmeras de 48 compartimentos (Neuro Probe) utilizando uma membrana de policarbonato de poros de 5µm de diâmetro, permissiva apenas a neutrófilos, anteriormente já isolados de sangue murino por técnica já descrita. A estes (1×10^6 células/mL) eram permitidas migrarem em direção ao fator quimiotático KC (IL-8 de camundongos, CXCL1/2) (30 ng/mL) e incubados a 37°C em incubadora a 5% de CO₂.

Depois de 1 hora, a membrana era removida, fixada e corada. Os neutrófilos que migraram através da membrana eram contados sob um microscópio óptico em 5 campos aleatoriamente selecionados.

3.8.2.1.1 Efeitos do inibidor de HO-1, inibidor específico de iNOS e inibidor de GCs na migração *in vitro* de neutrófilos desafiados com quimiotático KC de camundongos submetidos ao PCI a distância

Os camundongos foram pré-tratados por via subcutânea (sc) com salina tamponada com fosfato (PBS, 0,2 mL) ou com inibidor de iNOS1400W (inibidor específico de iNOS), na dose de 3mg/kg ou HO-1 (ZnPPIX; 10mg/kg, sc) ou ODQ (5 µmol/kg, ip).

Após trinta minutos, foi realizada a indução do PCI a distância. Depois do pré-tratamento dos camundongos e de feita a indução do PCI, estes foram mortos e tiveram seus neutrófilos isolados, então tais neutrófilos foram postos em uma câmara de Boyden, onde foram desafiados com KC, seguido a técnica acima.

3.8.2.2 Protocolo IV: Ensaio de imunofluorescência (GRK2)

Após todo o procedimento de pré-condicionamento isquêmico nos animais pré-tratados, fazia-se a aplicação de Carragenina intraperitoneal. Após 4 horas da aplicação, retirava-se o sangue e por técnica já descrita, isolava-se os neutrófilos e confeccionava-se lâminas com quantidades padrão de neutrófilos e as fixava em paraformol, a partir daí as lâminas estavam prontas para a imunofluorescência. Após o período de 24 horas no freezer, retirava-se as lâminas e aguardava por 30 minutos para estabilização na temperatura ambiente.

A seguir, fixava-se por 20 minutos as lâminas em paraformaldeído a 4% e sacarose também a 4%. Lavava por 3 vezes a dez minutos com PBS. A partir de então, incubava com BSA 3% e Triton-X-100 0,1% por 20 minutos. Novamente, lavava com PBS 3 vezes por 10 minutos. Incubava com glicina 0.1M por 30 minutos, então repetia a lavagem com PBS. Incubava com soro normal de cavalo (1:50) por 40 minutos a temperatura ambiente.

Escorria as lâminas, incubava com o anticorpo primario (anti-GRK2, diluído em BSA 0,1%) overnight a 4°C em câmara úmida. Retirava da geladeira e deixava

estabilizar por 30 minutos. Lavava por 3 vezes por PBS por 10 minutos. Incubava o anticorpo secundário (anti-coelho) a diluição de 1:200, diluído em Hepes 0,1M por 1 hora a temperatura ambiente. Incubava com DAPI por 3 minutos, lavava pela última vez com PBS e em seguida montava-se as lâminas em fluor-mont.

Animais Swiss eram divididos em grupos de cinco animais (n=5) Grupo I: controle selvagem (WT) tratado com salina; Grupo II: animais selvagens (WT) foram pré-tratados com inibidores de NO (1400W; 3mg/kg) a seguir pré-condicionados com um torniquete de faixa elástica por dez minutos em seguida liberada a faixa por 30 minutos (período de reperfusão) e Grupo III: animais selvagens (WT) foram pré-tratados com inibidores de CO (ZnPPIX; 10mg/kg). A seguir pré-condicionados com um torniquete de faixa elástica por dez minutos em seguida liberada a faixa por 30 minutos (período de reperfusão), realizou-se o sacrifício dos animais logo após o período de reperfusão, então foi colhido sangue total para estudo de imunofluorescência para GRK2 e separação dos neutrófilos e uma vez separados levados para estudo em câmara de Boyden.

3.8.2.2.1 Expressão de GRK2 na microcirculação mesentérica de camundongos selvagens e pré-condicionados pré-tratadas com ZnPPIX, 1400W, e ODQ

Os camundongos foram pré-tratados por via subcutânea (sc) com salina tamponada com fosfato (PBS, 0,2 mL) ou com inibidor de iNOS , 1400W, (inibidor específico de iNOS), na dose de 3mg/kg ou HO-1 (ZnPPIX; 10mg/kg, sc) ou ODQ (5 µmol/kg, ip).

Após trinta minutos foi realizada a indução do PCI. Depois de feita a indução do PCI e o pré-tratamento, os camundongos foram sacrificados e tiveram seus neutrófilos isolados, então a expressão de GRK2 foi dosada pela técnica de imunofluorescência como mencionado acima.

3.8.2.3 Protocolo V: Ensaio de citometria de fluxo

Usou 100µL do sangue total (heparinizado ou com EDTA), colocados em tubos de FACS, de acordo com os grupos. Colocaram-se os anticorpos de acordo com o objetivo. Usou-se: 0,5 µL anti-Gr1-PerCP (marcador de neutrófilos) mais 3-6µL do anti-CXCR2-PE.Em seguida, usaram-se os anticorpos controles (IgGs), de

acordo com as marcações utilizadas, incubar por 30 minutos a 4°C, ou no gelo ou na geladeira, protegidos da luz. Lavou-se 2 a 3x com 3 mL de tampão de lise (NH₄Cl) com a centrifugação de 400xg, 08 minutos, 4°C. Lavou-se 1 X com 2 mL de tampão de FACS com a centrifugação de 400xg, 08 minutos, 4°C.

Ressuspendia em 100µL de solução de formaldeído a 1% em PBS. Então, leu-se no aparelho FACSort, ou quando não lidas imediatamente, deixaram as células mantidas a 4°C, na geladeira, até o dia seguinte para análise.

Animais Swiss foram divididos em grupos de cinco animais (n=5) Grupo I: controle selvagem (WT) tratado com salina; Grupo II: animais selvagens (WT) foram pré-condicionados com um torniquete de faixa elástica por dez minutos em seguida liberada a faixa por 30 minutos; realizou-se o sacrifício dos animais para coleta de sangue total para estudo de citometria de fluxo para CXCR2.

3.8.2.3.1 Expressão de CXCR-2 em neutrófilos de camundongos pré-condicionados WT

Os camundongos foram submetidos ao PCI. Depois de feita a indução, os camundongos foram mortos e tiveram seus neutrófilos isolados como técnica já descrita anteriormente. Por fim, a expressão de CXCR2 foi dosada por análise de citometria de fluxo como citado acima.

3.8.3 Proteínas de adesão

3.8.3.1 Protocolo VI: Citometria de fluxo para CD11b

Animais Swiss foram divididos em grupos de cinco animais (n=5) Grupo I: controle selvagem (WT) tratado com salina; Grupo II: animais selvagens (WT) foram pré-condicionados com um torniquete de faixa elástica por dez minutos em seguida liberada a faixa por 30 minutos; realizou-se o sacrifício dos animais para coleta de sangue total para estudo de citometria de fluxo para CD11b.

3.8.3.1.1 Expressão de CD11b em neutrófilos de camundongos pré-condicionados WT e pré-tratadas com ZnPPIX, 1400W, e ODQ

Os camundongos foram submetidos a um pré-tratamento, sendo realizada a indução do PCI, trinta minutos mais tarde. Depois de feita a indução, os camundongos foram mortos e tiveram seus neutrófilos isolados como técnica já descrita anteriormente. Por fim, a expressão de CD11b foi dosada por análise de citometria de fluxo como citado acima.

3.8.3.2 Protocolo VII: Migração *in vitro* em nocautes para ICAM-1 e β 2-integrina

Efeitos da migração de neutrófilos induzida por Carragenina em animais selvagens (WT) submetidos ao PCI a distância e em animais nocautes (ICAM-1^{-/-} e β 2integrina^{-/-}).

Os camundongos WT, ICAM^{-/-} e β 2integrina^{-/-} foram tratados por via subcutânea (sc) com sauna tamponada com fosfato (PBS, 0,2 mL), trinta minutos depois realizada a indução do PCI. Após realizada a indução do PCI, os camundongos também foram injetados ip com Cg na dose de 500 μ g/cavidade . A migração de neutrófilos foi determinada após 4 horas.

3.8.3.3 Protocolo VIII: Dosagem de bilirrubina no plasma de animais pré-condicionados

Foi feita a dosagem de bilirrubina no sangue de animais do grupo controle e do grupo de animais pré-condicionados segundo o modelo já descrito anteriormente. Foi feita a coleta de plasma em sangue centrifugado de 5 animais por grupo e avaliado por espectrofotometria a absorbância das amostras para dosagem de bilirrubina total.

A coleta do sangue foi feita nos seguintes horários seguindo-se ao período de 30 minutos de reperusão no grupo experimental: 0h e 180 minutos. Os resultados foram plotados em uma curva de dosagem versus tempo.

3.9 Análise estatística

Os dados foram expressos como médias mais ou menos desvio padrão e representativos de dois ou três experimentos. As médias de diferentes tratamentos entre indivíduos foram comparadas por ANOVA.

Quando diferenças significativas eram identificadas, comparações individuais eram subsequentemente feitas usando teste de Bonferroni para valores não pareados. O nível de significância foi definido pelo valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Efeito inibitório do PCI sobre a migração de neutrófilos em lavado peritoneal

O efeito inibitório do PCI sobre a migração de neutrófilos foi avaliado nesse experimento utilizando um modelo clássico de peritonite com aplicação de carragenina (500µg/cavidade) no animal.

Na figura 4, observa-se a significativa migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal através da análise do lavado em relação ao controle, no qual foi aplicado apenas salina intraperitoneal (^ap<0,05).

Pode-se verificar que o grupo pré-condicionado apresenta migração significativamente menor que o grupo submetido a indução inflamatória, mesmo tendo aquele recebido a mesma dose de Carragenina que o segundo(^bp<0,05).

Na figura 5, visualiza-se fotografias de lâminas coradas com hematoxilina-eosina, nas quais apresentam os grupos Salina, Carragenina e Pré-condicionado. Observa-se importante acúmulo de neutrófilos no grupo Carragenina diferentemente do grupo pré-condicionado, apesar de que neste tenha sido aplicado a mesma dose do indutor inflamatório. Os neutrófilos são as células com aspecto típico de polimorfonucleares multilobulares, facilmente identificáveis no grupo Carragenina e praticamente ausentes nos demais grupos.

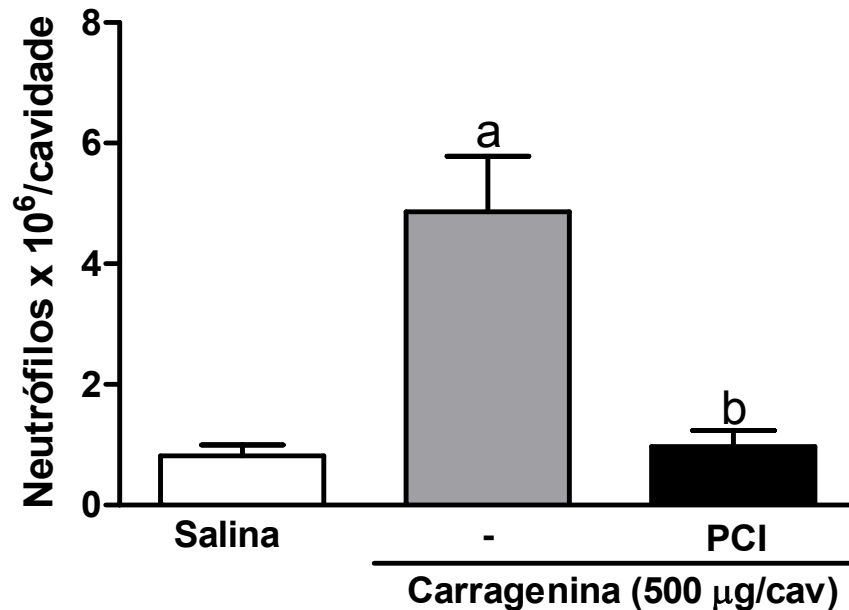
4.1.1 Ação dos inibidores de iNOS (Aminoguanidina) e Heme-oxigenase-1 (ZnPPiX) no efeito inibitório do pré-condicionamento isquêmico a distância

Observa-se na figura 6, com o pré-tratamento dos animais do grupo Aminoguanidina (inibidor seletivo de iNOS) que ocorre uma significativa prevenção do efeito inibitório do pré-condicionamento isquêmico sobre a migração de neutrófilos bem caracterizada no grupo PCI(^cp<0,05). O grupo PCI ratifica o efeito inibitório do pré-condicionamento isquêmico, outrora já demonstrado.

Já na figura 7, demonstra-se a ação do inibidor de HO-1 (ZnPPiX) sobre a migração. Verifica-se significativa manutenção da migração no grupo Aminoguanidina em relação ao grupo PCI (^cp<0,05), quando quantificado o número de neutrófilos migrados para a cavidade peritoneal no lavado. Observa-se também

nesse experimento, o efeito inibitório do PCI sobre a migração quando comparamos o grupo controle e PCI ($p < 0,05$).

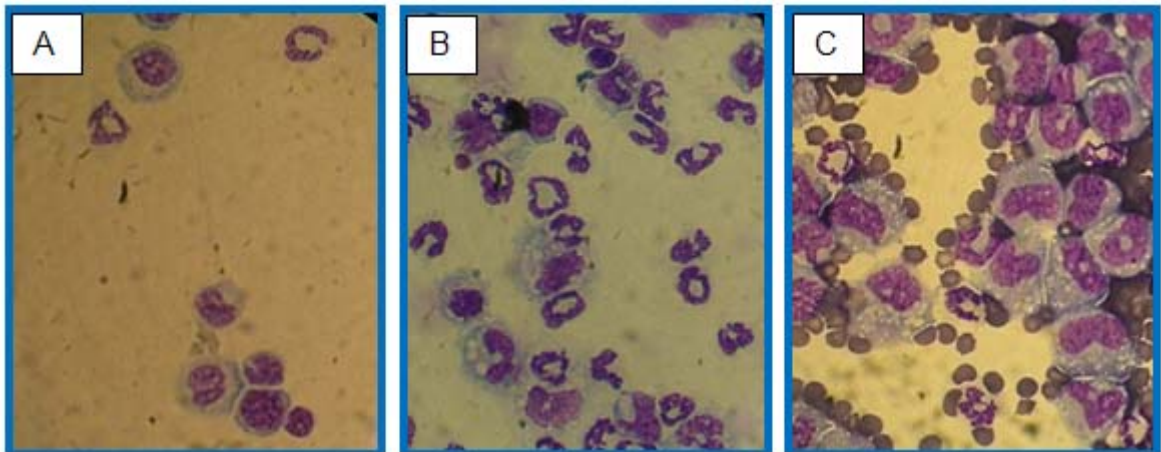
- MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIO



Aplicação do pré-condicionamento isquêmico a distância no membro posterior direito do camundongo leva ao efeito inibitório sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal. Os animais foram pré-condicionados e foi realizada a indução inflamatória com Carragenina (500µg/cav). Após 4 horas da aplicação da Carragenina (Cg), realizou-se o sacrifício, e a quantidade de neutrófilos no lavado peritoneal dos animais foi avaliada em Counter nos grupos acima. ^ap<0,05 vs grupo salina tratada com solução fisiológica 0.9%. ^bp<0,05 vs grupo Sham. Para análise estatística, utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

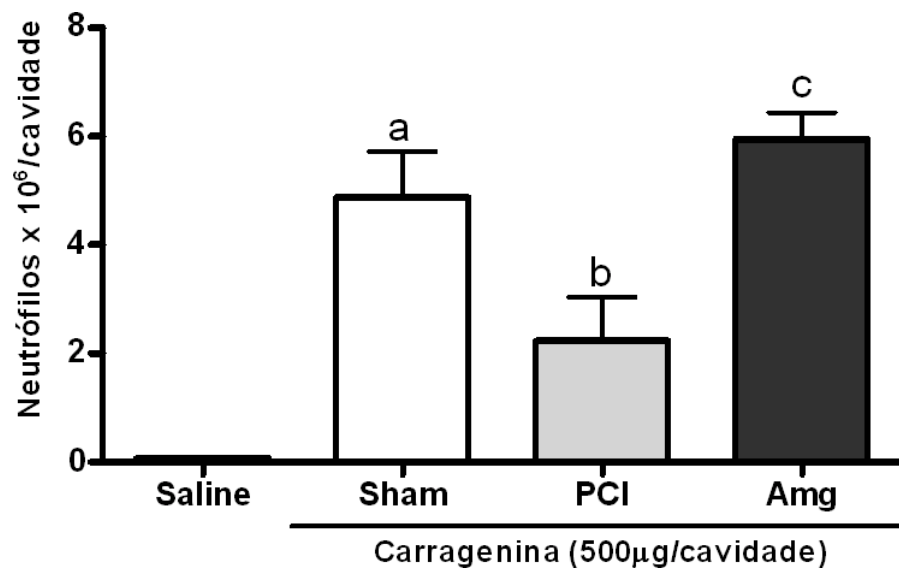
FIGURA 4- Efeito inibitório do PCI sobre a migração de neutrófilos

Fonte: Pesquisa direta



Fotografias de lâminas de coradas com HE em aumento de 40x, nas quais apresentam os grupos A) Salina, B) Carragenina e C) Pré-condicionados.

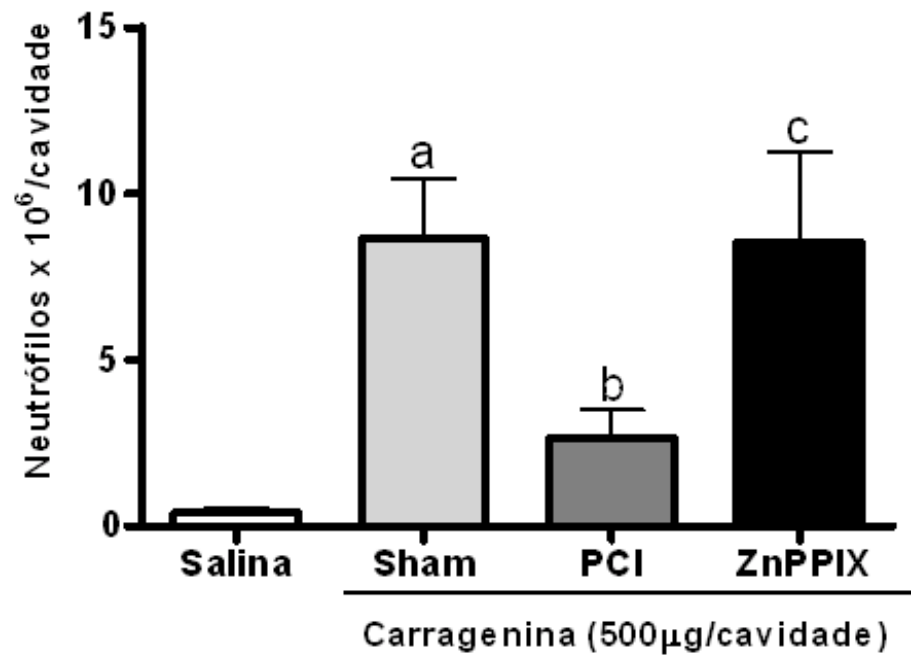
FIGURA 5- Efeito inibitório do PCI sobre a migração de neutrófilos
Fonte: Pesquisa direta



Inibição pela Aminoguanidina (Amg), inibidor seletivo de iNOS, do efeito inibitório do pré-condicionamento isquêmico (PCI) a distância sobre a migração de neutrófilos. Os animais foram pré-tratados com Amg, em seguida, pré-condicionados e por fim foi realizada a indução inflamatória com Carragenina (500µg/cav). O lavado peritoneal dos animais após 4 horas da aplicação de Carragenina (Cg) foi avaliado em Counter a quantidade de neutrófilos na cavidade peritoneal nos grupos acima. Adicionar a $p < 0,05$ vs grupo Sham tratado com Carragenina. $p < 0,05$ vs grupo PCI. Para análise estatística, utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

FIGURA 6- Ação do inibidor de iNOS previne efeito inibitório na migração pelo PCI

Fonte: Pesquisa direta



Inibição pelo ZnPPIX, inibidor específico de HO-1, do efeito inibitório do pré-condicionamento isquêmico a distância sobre a migração de neutrófilos. Os animais foram pré-tratados com ZnPPIX, em seguida, pré-condicionados e por fim foi realizada a indução inflamatória com Carragenina (500µg/cav). O lavado peritoneal dos animais após 4 horas da aplicação de Carragenina (Cg) foi avaliado em Counter a quantidade de neutrófilos na cavidade peritoneal nos grupos acima. Adicionar a $p < 0,05$ vs grupo Sham tratado com Carragenina. $p < 0,05$ vs grupo PCI. Para análise estatística, utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

FIGURA 7- Ação do inibidor de HO-1 previne efeito inibitório na migração pelo PCI

Fonte: Pesquisa direta

4.2 Inibição da atividade leucocitária pelo PCI: Diminuição do rolamento e adesão leucocitárias pelo pré-condicionamento isquêmico a partir de mecanismo dependente de HO-1

Na figura 8, podemos visualizar a avaliação do efeito do PCI sobre a migração de neutrófilos em animais vivos e em tempo real. Avalia-se a migração pela técnica de microscopia intravital onde os animais estão vivos e anestesiados.

Observa-se na gravura, mais precisamente, a avaliação do rolamento leucocitário, ou seja, a capacidade dessas células rolarem no endotélio dos vasos na vigência de um processo inflamatório e também submetido ao pré-condicionamento isquêmico a distância. Como resultado, temos que o grupo experimental apresentou rolamento significativamente maior que o grupo controle (^ap<0,05).

Já o grupo de animais pré-condicionados, apresentaram um rolamento semelhante ao grupo controle e significativamente menor que o grupo experimental (p<0,05). Demonstra-se com isso que o grupo PCI apresenta bem menos neutrófilos marginalizados rolando junto a parede endotelial no mesentério do que o grupo experimental, a despeito de o primeiro ter recebido a mesma dose de indutor inflamatório.

Na figura 9, pode-se observar a avaliação do efeito do PCI sobre a adesão de leucócitos na parede do endotélio na vigência de uma resposta inflamatória. Verifica-se no grupo experimental que ocorre intenso e significativo aumento da adesão leucocitária endotelial quando estimulado por um indutor inflamatório no peritônio em relação ao grupo controle (^ap<0,05).

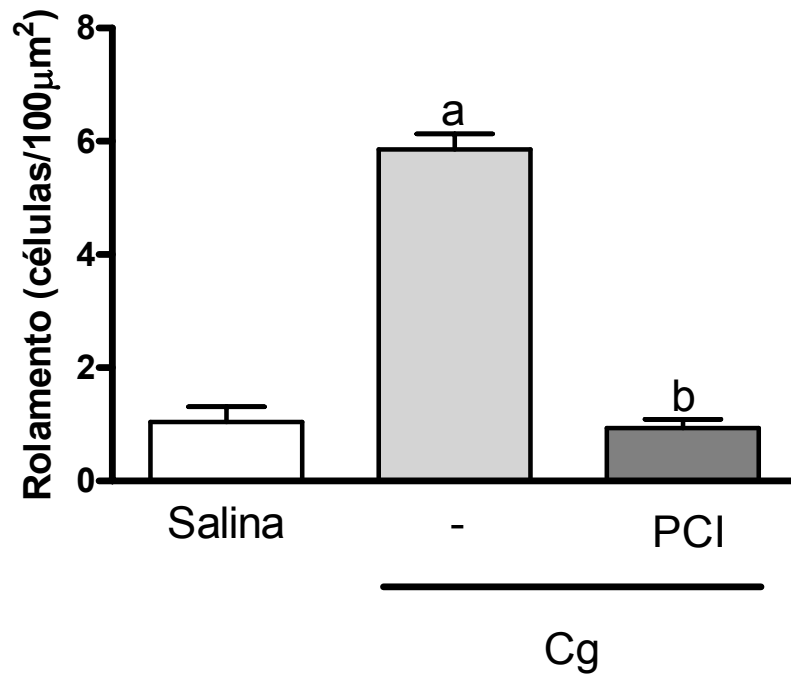
Contudo, verifica-se que o grupo PCI (animais pré-condicionados) apresentam importante inibição da adesão dos leucócitos na parede dos vasos (^cp<0,05) em relação ao grupo experimental, demonstrando o importante efeito inibitório do PCI sobre a adesão de leucócitos.

Já na figura 10, observa-se a prevenção da ação inibitória do PCI a distância por inibidor de HO-1, ZnPPiX no rolamento leucocitário, vendo que no grupo ZnPPiX, o rolamento apresenta-se significativamente aumentado em relação ao grupo PCI(^cp<0,05). Ratifica-se também nesse gráfico, o efeito inibitório do PCI

sobre o rolamento onde podemos ver que o grupo PCI tem significativamente menos representantes em rolamento que o grupo experimental.

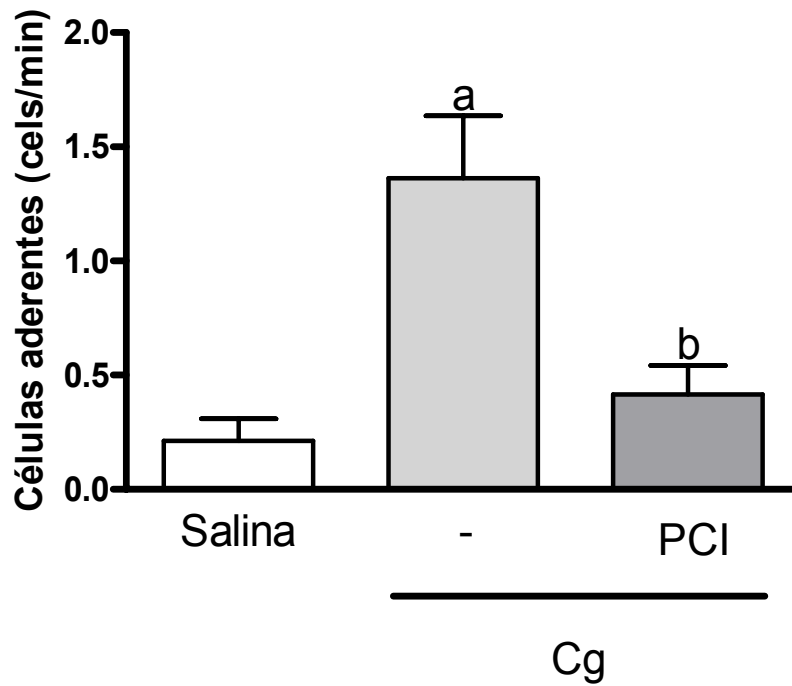
Analogamente a resposta do rolamento ao inibidor de HO-1, vê-se também com a adesão leucocitária na figura 11: Pode-se notar que a adesão é prontamente mantida no grupo ZnPPiX, o qual recebeu o pré-tratamento com ZnPPiX, apresentando significativamente mais células aderidas que o grupo PCI (animais pré-condicionados).

Ambas as figuras 10 e 11, demonstram importantes efeitos do pré-condicionamento isquêmico sobre a migração celular a partir de mecanismos de aderência e rolamento leucocitário, além de demonstrar a importante participação do monóxido de carbono como possível mediador dessa atividade inibitória.



Efeito inibitório do pré-condicionamento isquêmico a distância sobre o rolamento leucocitário na parede endotelial *in vivo* em tempo real. Os animais foram pré-condicionados e foi realizada a indução inflamatória com Carragenina (Cg) (500µg/cav). Após aproximadamente 2 horas da aplicação de Carragenina (Cg), o rolamento leucocitário foi avaliado por microscopia intravital na qual visualiza-se em vênulas de 3ª ordem os neutrófilos marginalizados rolando junto a parede endotelial no mesentério. ap<0,05 vs grupo salina. bp<0,05 vs grupo Cg. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de t-Student.

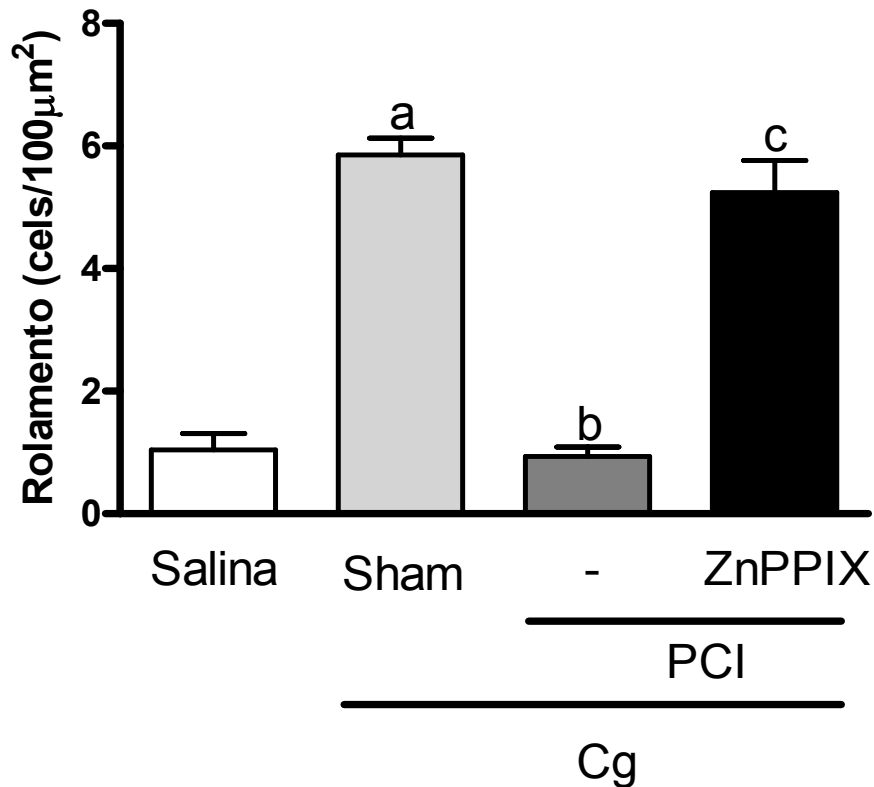
FIGURA 8- Inibição da atividade leucocitária pelo PCI:diminuição do rolamento
Fonte: Pesquisa direta



Efeito inibitório do pré-condicionamento isquêmico a distância sobre a adesão leucocitária na parede endotelial *in vivo* em tempo real. Os animais foram pré-condicionados e foi realizada a indução inflamatória com Carragenina (Cg) (500 μ g/cav). Após aproximadamente 4 horas da aplicação de Carragenina (Cg), a adesão leucocitária foi avaliada por microscopia intravital na qual visualiza-se em vênulas de 3^a ordem os neutrófilos aderidos na parede endotelial no mesentério. ap<0,05 vs grupo salina bp<0,05 vs grupo Cg. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de t-Student.

FIGURA 9- Inibição da atividade leucocitária pelo PCI: diminuição da adesão

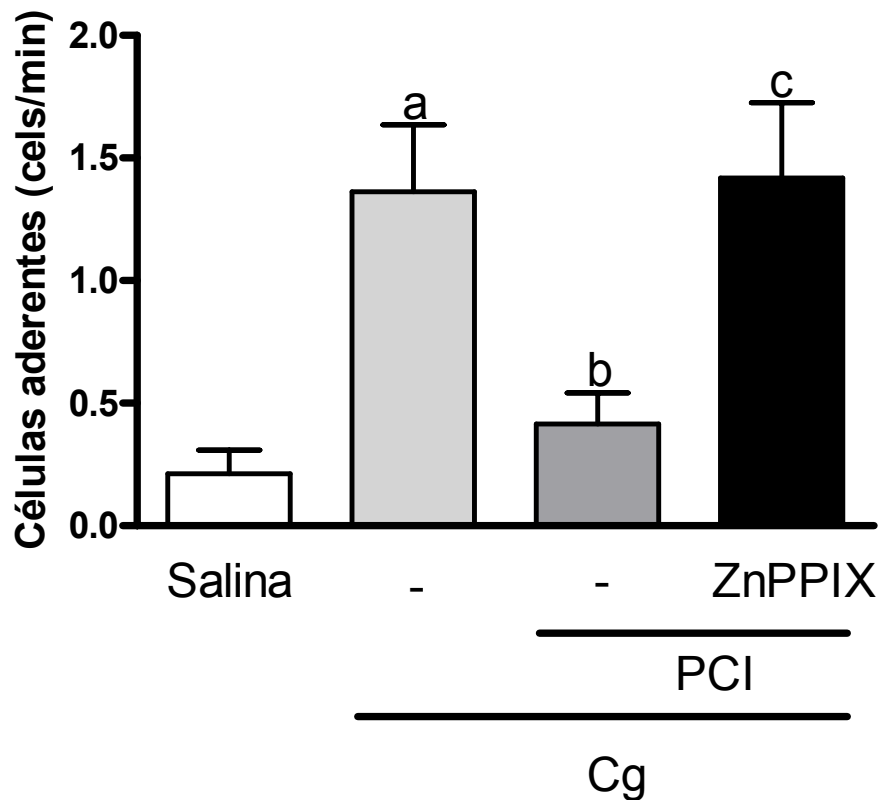
Fonte: Pesquisa direta



Prevenção do efeito inibitório do pré-condicionamento isquêmico a distância pelo inibidor de HO-1, ZnPPIX, sobre o rolamento leucocitário na parede endotelial *in vivo* em tempo real. Após o pré-tratamento, os animais foram pré-condicionados e foi realizada a indução inflamatória com Carragenina (Cg) (500µg/cav). Após aproximadamente 2 horas da aplicação de Carragenina (Cg), o rolamento leucocitário foi avaliado por microscopia intravital na qual visualiza-se em vênulas de 3ª ordem os neutrófilos marginalizados rolando junto a parede endotelial no mesentério. $cp < 0,05$ vs grupos pré-condicionado. Adicionar a $bp < 0,05$ vs grupo Sham. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de t-Student.

FIGURA 10- Prevenção da ação inibitória do PCI a distância por inibidor de HO-1, ZnPPIX no rolamento leucocitário

Fonte: Pesquisa direta



Efeito inibitório do pré-condicionamento isquêmico a distância sobre a adesão leucocitária na parede endotelial *in vivo* em tempo real. Após o pré-tratamento com o inibidor, os animais foram pré-condicionados e foi realizada a indução inflamatória com Carragenina (Cg) (500µg/cav). Após aproximadamente 4 horas da aplicação de Carragenina (Cg), a adesão leucocitária foi avaliada por microscopia intravital na qual visualiza-se em vênulas de 3ª ordem os neutrófilos aderidos na parede endotelial no mesentério. Adicionar a $p < 0,05$ vs grupos pré-condicionado e salina $b p < 0,05$ vs grupo Cg. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de t-Student.

FIGURA 11- Prevenção da ação inibitória do pré-condicionamento isquêmico a distância por inibidor de HO-1 na adesão leucocitária

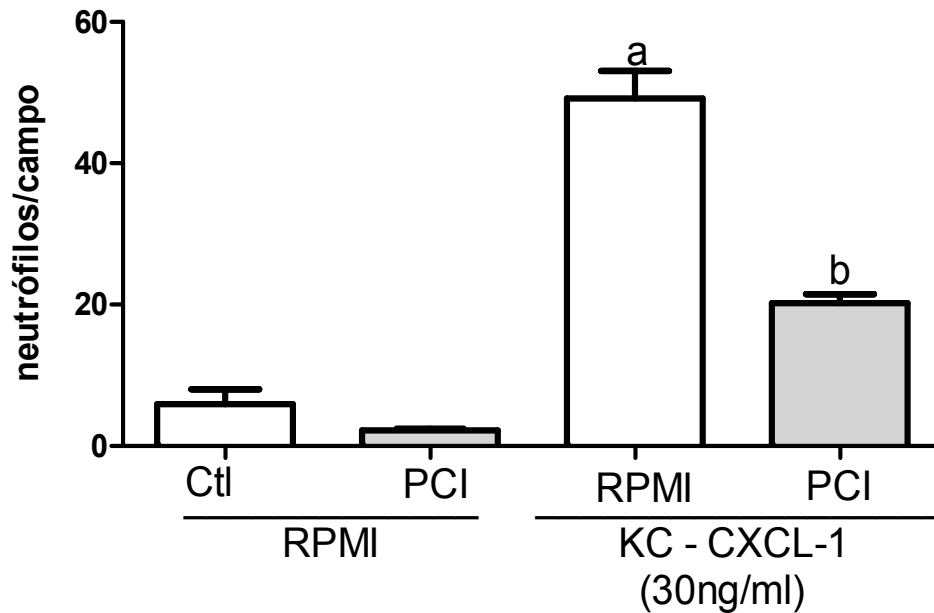
Fonte: Pesquisa direta

4.3 Inibição da atividade dos neutrófilos pelo pré-condicionamento a distância: Diminuição da transmigração *in vitro*

Na figura 12, observa-se a migração de neutrófilos *in vitro*. Neutrófilos colhidos e isolados de sangue de camundongos controles e pré-condicionados foram postos em câmara de Boyden e desafiados com uma quimiocina derivada de queratinócitos (KC), importante quimioatratante de neutrófilos. Percebe-se que os animais sujeitos ao contato apenas com RPMI (meio inerte) não apresentaram migração em direção ao meio, nem diferença significativa entre grupos.

Contudo, quando os neutrófilos eram postos em contato com o indutor inflamatório (KC-CXCL-1), observa-se importante movimento migratório das células em direção ao estímulo inflamatório. Quando em desafio com KC, o grupo RPMI apresenta importante migração *in vitro* significativamente maior que o grupo PCI, cujos neutrófilos vieram de animais pré-condicionados.

- **PARTICIPAÇÃO DE RECEPTORES TRANSMEMBRANA**



Efeito inibitório do pré-condicionamento isquêmico na migração de neutrófilos *in vitro*. Neutrófilos colhidos de animais controle e pré-condicionados foram colocados em uma câmara de Boyden, onde foram desafiados por uma dose padrão (30ng/ml) de KC (quimiocina derivada de queratinócitos) e por RPMI. Em havendo resposta ao KC, os neutrófilos transmigram através de uma membrana neutrófilo-permeável. Observa-se importante resposta migratória do grupo controle diferentemente do grupo pré-condicionado. Sugere que o pré-condicionamento modifica o neutrófilo do animal pré-condicionado, de modo que tal célula não responda mais ao estímulo quimiotático. Adicionar a $p < 0,05$ vs grupo controle. Para análise estatística, utilizou-se o teste t-Student seguido do teste de Bonferroni.

FIGURA 12- Inibição da atividade dos neutrófilos pelo PCI: Diminuição da transmigração *in vitro*.

Fonte: Pesquisa direta

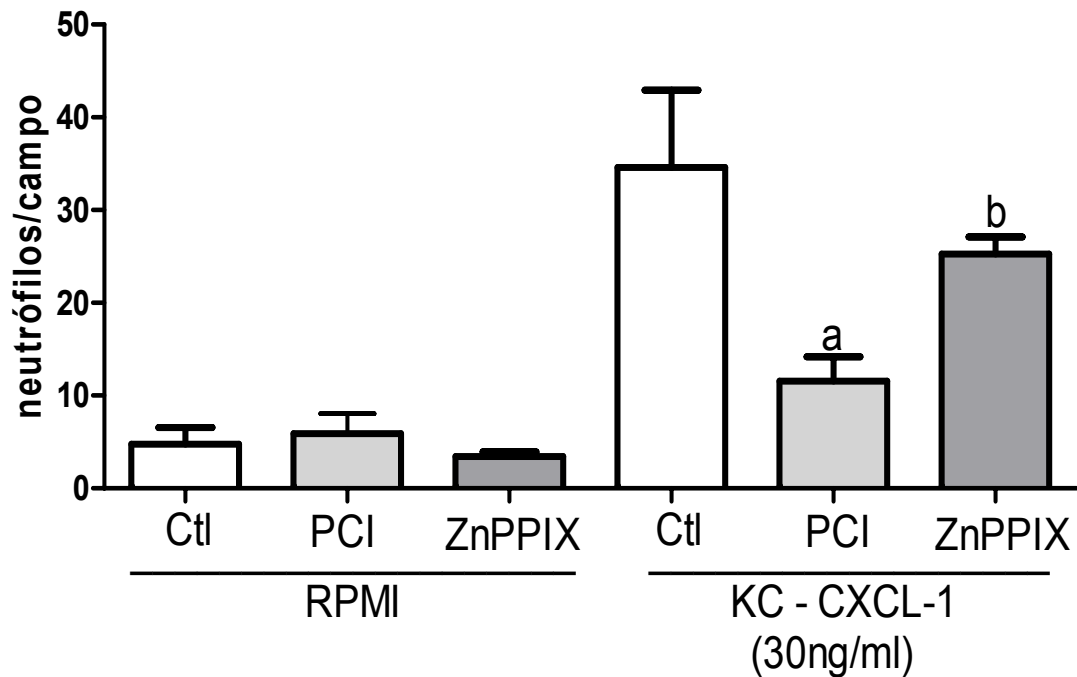
4.3.1 Prevenção do efeito inibitório do PCI a distância por inibidor de HO-1 (ZnPPIX) e por inibidor específico de iNOS (1400W) e inibidor GCs (ODQ) sobre a migração de neutrófilos *in vitro*

Na figura 13, demonstra-se o efeito preventivo do inibidor de HO-1 (ZnPPIX) sobre o PCI. Verifica-se que o grupo ZnPPIX, pré-tratado e pré-condicionado, apresenta migração significativamente maior que o grupo PCI, pré-condicionado (^bp<0,05) Demonstra-se com isso importante ação do CO sobre o efeito inibitório sobre a migração pelo PCI.

Na figura 14, observa-se com o pré-tratamento dos animais com inibidor específico para iNOS a inibição importante do efeito do pré-condicionamento isquêmico nos animais. O grupo 1400W apresenta migração significativamente maior que o grupo PCI (^bp<0,05), demonstrando também a importância do NO na modulação do efeito inibitório sobre a migração pelo PCI.

Na figura 15, é verificado no grupo ODQ pré-tratado com inibidor de Guanilato Ciclase solúvel em acordo com os grupos anteriores a manutenção da migração dos neutrófilos semelhante ao grupo controle submetido ao quimiotático e significativamente diferente do grupo pré-condicionado. Demonstra-se com isso que a Guanilato Ciclase solúvel participa da via final do mecanismo de pré-condicionamento isquêmico a distância.

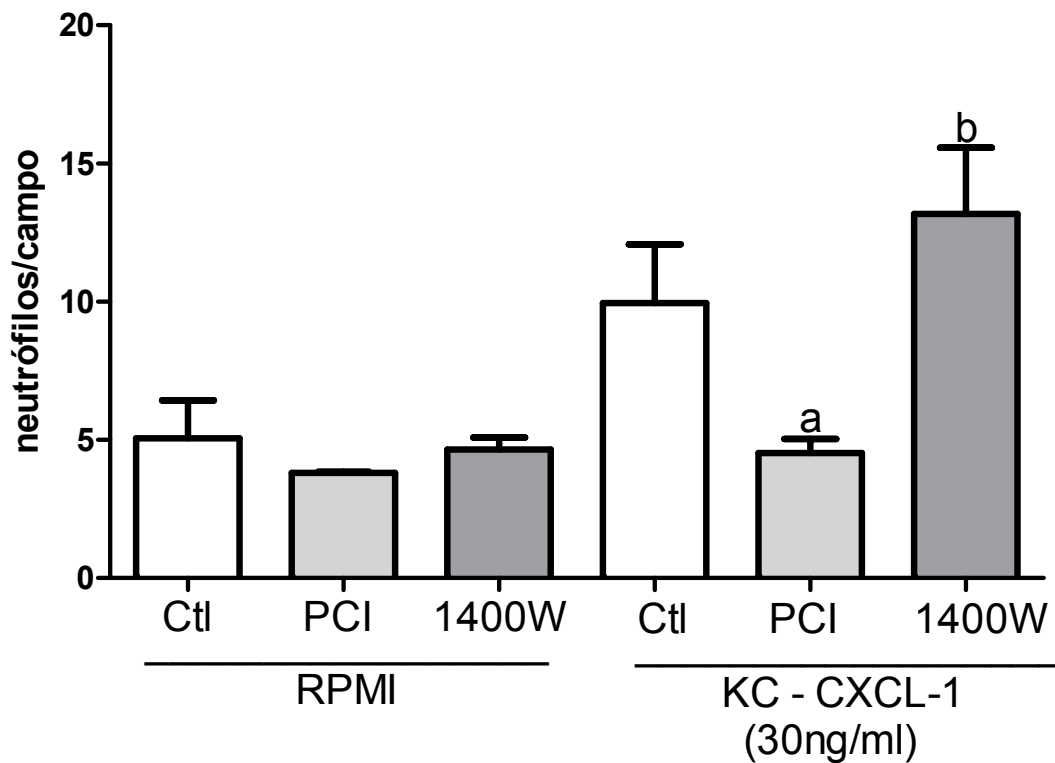
Nas 3 figuras, foi ratificado o importante papel do PCI na inibição da migração *in vitro* dos neutrófilos uma vez em contato com o estímulo inflamatório adequado, no caso, KC (quimiocina derivada de queratinócitos).



Neutrófilos colhidos de animais controles, pré-condicionados e pré-tratados pré-condicionados foram colocados em uma câmara de Boyden, onde foram desafiados por uma dose padrão (30ng/ml) de KC (quimiocina derivada de queratinócitos) e por RPMI. Observa-se importante prevenção do efeito inibitória do PCI a resposta migratória semelhante grupo controle e diferente do grupo pré-condicionado. Sugere que o inibidor de HO-1 previniu o efeito inibitório do pré-condicionamento, evitando possível modificação do neutrófilo do animal pré-condicionado, de modo que tal célula responda ao estímulo quimiotático tal como o controle. $ap < 0,05$ vs grupo controle $bp < 0,05$ vs grupo pré-condicionado. Para análise estatística, utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de t-Student.

FIGURA 13- Prevenção do efeito inibitório do pré-condicionamento isquêmico a distância por inibidor de HO-1 (ZnPPiX) sobre a migração de neutrófilos *in vitro*

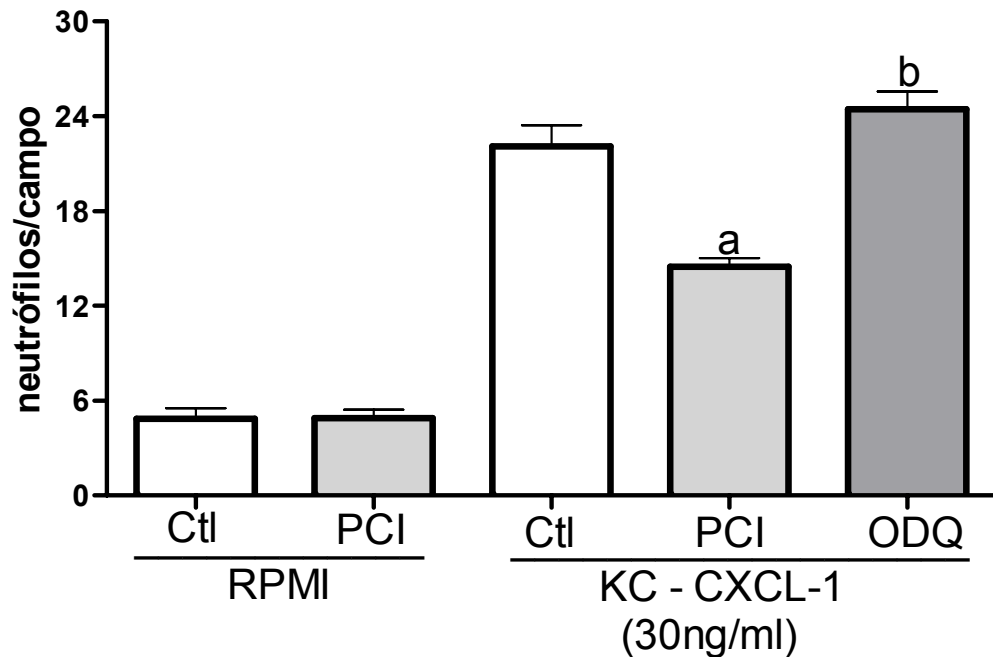
Fonte: Pesquisa direta



Neutrófilos colhidos de animais controles, pré-condicionados e pré-tratados pré-condicionados foram colocados em uma câmara de Boyden, onde foram desafiados por uma dose padrão (30ng/ml) de KC (quimiocina derivada de queratinócitos) e por RPMI. Observa-se importante prevenção do efeito inibitória do PCI a resposta migratória semelhante grupo controle e diferente do grupo pré-condicionado. Sugere que o inibidor de iNOS previniu o efeito inibitório do pré-condicionamento, evitando possível modificação do neutrófilo do animal pré-condicionado, de modo que tal célula responda ao estímulo quimiotático tal como o controle. $ap < 0,05$ vs grupo controle $bp < 0,05$ vs grupo pré-condicionado. Para análise estatística, utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de t-Student.

FIGURA 14- Prevenção do efeito inibitório do pré-condicionamento isquêmico a distância por inibidor específico de iNOS (1400W) sobre a migração de neutrófilos *in vitro*

Fonte: Pesquisa direta



Neutrófilos colhidos de animais controles, pré-condicionados e pré-tratados pré-condicionados foram colocados em uma câmara de Boyden, onde foram desafiados por uma dose padrão (30ng/ml) de KC (quimiocina derivada de queratinócitos) e por RPMI. Observa-se importante prevenção do efeito inibitória do PCI a resposta migratória semelhante grupo controle e diferente do grupo pré-condicionado. Sugere que o inibidor de GCs previniu o efeito inibitório do pré-condicionamento, evitando possível modificação do neutrófilo do animal pré-condicionado, de modo que tal célula responda ao estímulo quimiotático tal como o controle. $ap < 0,05$ vs grupo controle $bp < 0,05$ vs grupo pré-condicionado. Para análise estatística, utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de t-Student.

FIGURA 15- Prevenção do efeito inibitório do pré-condicionamento isquêmico a distância por inibidor de GCs (ODQ) sobre a migração de neutrófilos *in vitro*

Fonte: Pesquisa direta

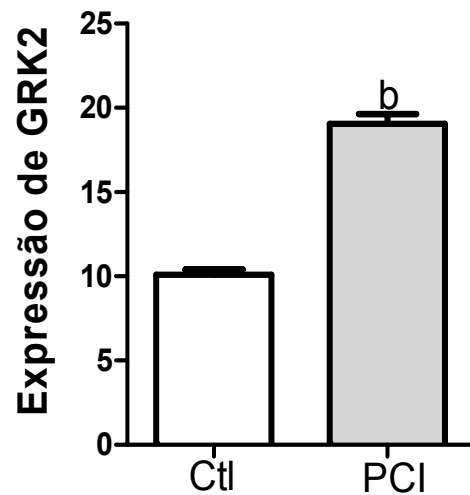
4.4 Expressão de GRK2 nos neutrófilos pelo PCI a distância e Prevenção do aumento da expressão de GRK2 nos neutrófilos pelo PCI a distância por inibidores de HO-1, iNOS e GCs

Após a indução do PCI, foi colhido sangue desses animais e os neutrófilos foram isolados por gradiente de Percoll. Na figura 16, observa-se importante aumento da intensidade de fluorescência nos animais pré-condicionados representados pelo grupo PCI diferentemente do grupo controle. Com isso, percebe-se que o pré-condicionamento isquêmico a distância aumenta significativamente a expressão de GRK2 nos camundongos (^bp<0,05).

Na figura 17, quando avalia-se a expressão de GRK2 em neutrófilos de animais pré-condicionados e pré-tratados com inibidor de heme-oxigenase-1(ZnPPIX), percebe-se importante redução da intensidade de fluorescência quando comparamos o grupo ZnPPIX com o grupo PCI, este dos neutrófilos de animais pré-condicionados. Ainda na mesma figura pode-se verificar a significativa diferença entre o grupo PCI e controle, no qual este é o grupo de neutrófilos controle sem intervenção.

Na figura 18, pode-se observar prevenção do efeito intensificador do pré-condicionamento sobre a expressão de GRK2 devido ao pré-tratamento com 1400W, um inibidor específico de iNOS. O grupo 1400W apresenta menor intensidade de fluorescência do que o grupo PCI (^bp<0,05).

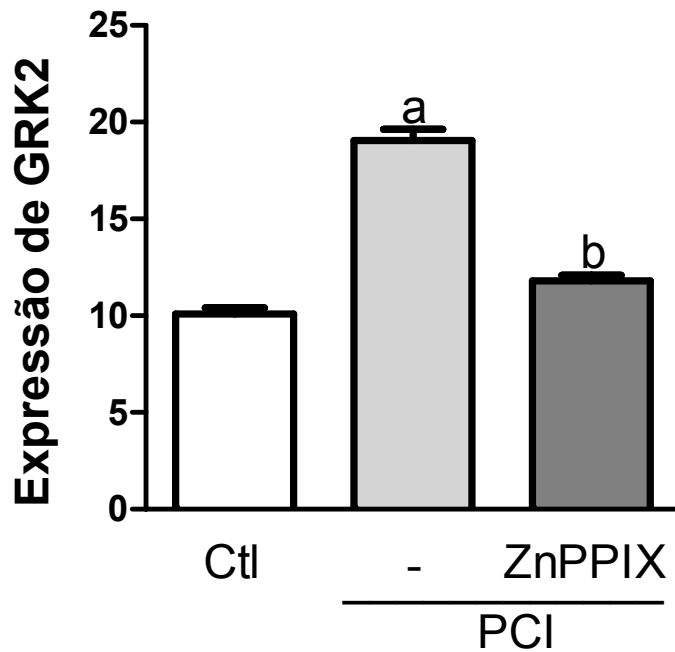
Já na figura 19, corrobora-se os achados presentes quando da utilização dos inibidores antecedentes a este nos animais pré-condicionados. No grupo ODQ, o qual utilizou como pré-tratamento o ODQ (inibidor de Guanilato Ciclase solúvel), houve importante manutenção de níveis baixos de GRK2, diferindo significativamente do grupo PCI.



A expressão de GRK2 (quinase transmembrana) foi mensurada por imunofluorescência em neutrófilos de animais controles e pré-condicionados. Após a indução do PCI, foi colhido sangue desses animais e os neutrófilos foram isolados por gradiente de Percoll. Observa-se importante aumento da intensidade de fluorescência nos animais pré-condicionados diferentemente do grupo controle. Sugere que o pré-condicionamento esteja levando a um aumento da expressão de GRK2, o que pode indiretamente indicar a inibição de receptores importantes para o processo de migração dos neutrófilos. $p < 0,05$ vs grupo controle. Para análise estatística utilizou-se o teste t-Student seguido do teste de Bonferroni.

FIGURA 16- Aumento da expressão de GRK2 nos neutrófilos pelo PCI a distância

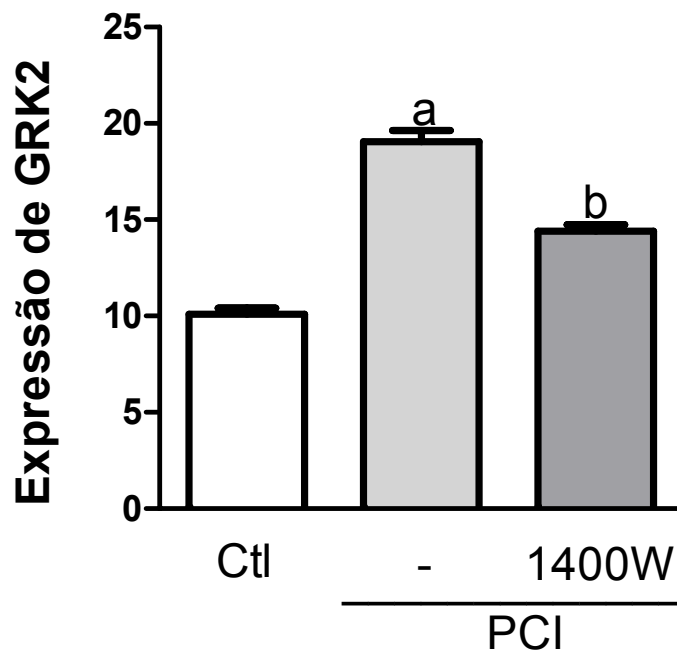
Fonte: Pesquisa direta



A expressão de GRK2 (quinase transmembrana) foi mensurada por imunofluorescência em neutrófilos de animais controles, pré-condicionados e de pré-condicionados pré-tratados com inibidor de HO-1. Após o pré-tratamento, houve a indução do PCI, e foi colhido sangue desses animais. Observa-se manutenção da intensidade de fluorescência no grupo pré-tratado em relação ao controle e importante aumento nos animais pré-condicionados. Sugere que o pré-tratamento com inibidor de HO-1 leva a inibição da expressão de GRK2 pois inibiria a produção de CO, o que seria um importante evento para o efeito inibitório do pré-condicionamento, pois evitaria a inibição de receptores importantes para o processo de migração dos neutrófilos. Adicionar a $p < 0,05$ vs grupo Sham. Para análise estatística utilizou-se o teste t-Student, seguido do teste de Bonferroni.

FIGURA 17- Prevenção do aumento da expressão de GRK2 nos neutrófilos pelo PCI a distância por inibidor de HO-1

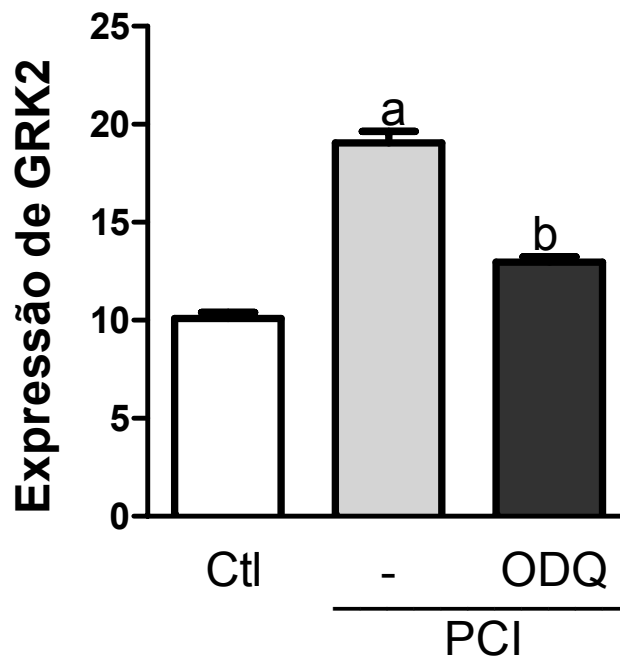
Fonte: Pesquisa direta



A expressão de GRK2 (quinase transmembrana) foi mensurada por imunofluorescência em neutrófilos de animais controles, pré-condicionados e de pré-condicionados pré-tratados com inibidor de iNOS. Após o pré-tratamento, houve a indução do PCI, e foi colhido sangue desses animais. Observa-se manutenção da intensidade de fluorescência no grupo pré-tratado em relação ao controle e importante aumento nos animais pré-condicionados. Sugere que o pré-tratamento com inibidor de iNOS leva a inibição da expressão de GRK2 pois inibiria a produção de NO dependente de iNOS, o que seria um importante evento para o efeito inibitório do pré-condicionamento, pois evitaria a inibição de receptores importantes para o processo de migração dos neutrófilos. Adicionar a $p < 0,05$ vs grupo Sham. Para análise estatística utilizou-se o teste t-Student seguido do teste de Bonferroni.

FIGURA 18- Prevenção do aumento da expressão de GRK2 nos neutrófilos pelo PCI a distância por inibidor específico de iNOS

Fonte: Pesquisa direta



A expressão de GRK2 (quinase transmembrana) foi mensurada por imunofluorescência em neutrófilos de animais controles, pré-condicionados e de pré-condicionados pré-tratados com inibidor de GCs. Após o pré-tratamento, houve a indução do PCI, e foi colhido sangue desses animais. Observa-se manutenção da intensidade de fluorescência no grupo pré-tratado em relação ao controle e importante aumento nos animais pré-condicionados. Sugere que o pré-tratamento com inibidor de GCs leva a inibição da expressão de GRK2, o que seria um importante evento na via final para o efeito inibitório do pré-condicionamento, pois evitaria a inibição de receptores importantes para o processo de migração dos neutrófilos. Adicionar a $p < 0,05$ vs grupo Sham. Para análise estatística utilizou-se o teste t-Student seguido do teste de Bonferroni.

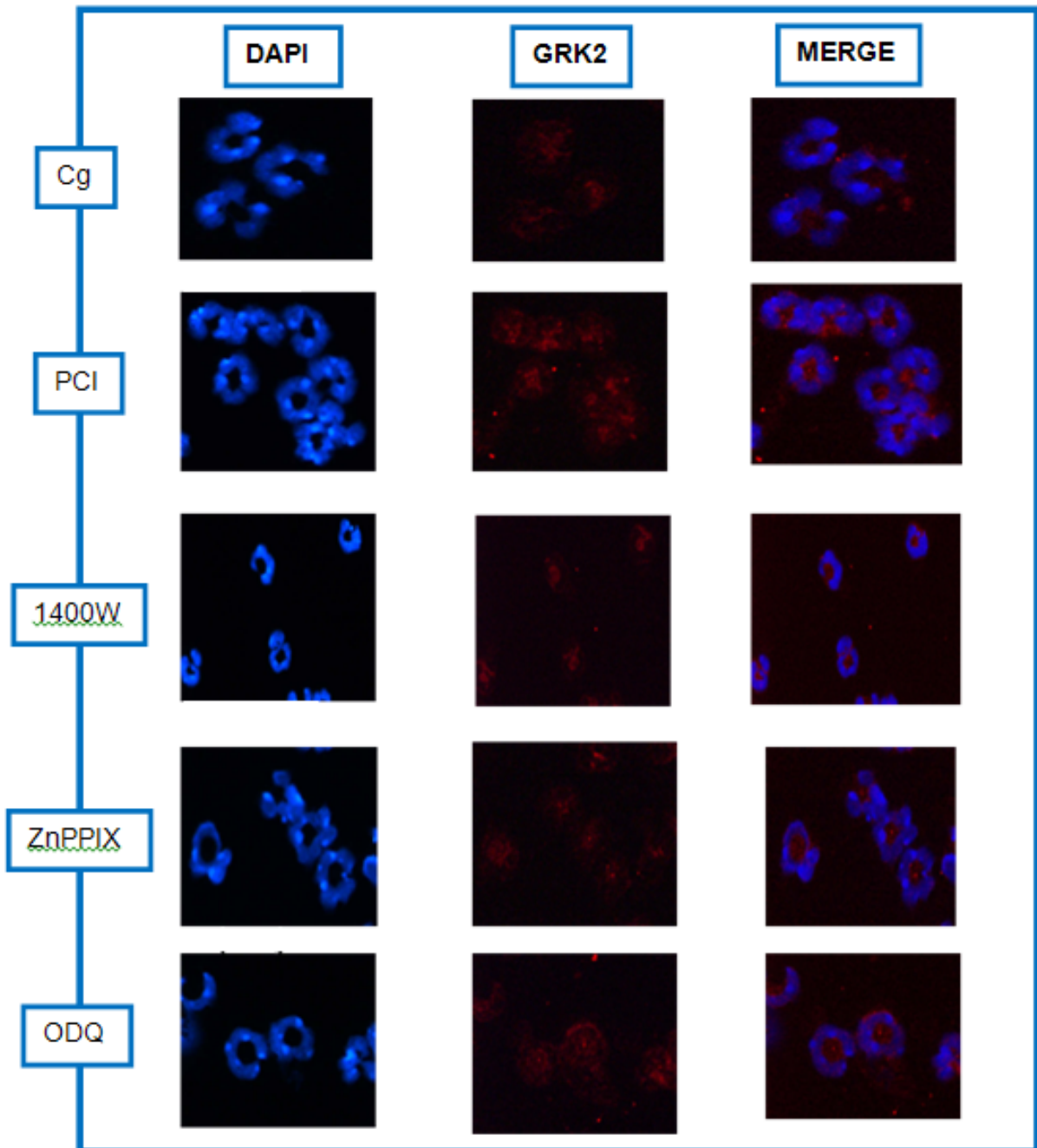
FIGURA 19- Prevenção do aumento da expressão de GRK2 nos neutrófilos pelo PCI a distância por inibidor de GCs

Fonte: Pesquisa direta

4.5 Inibição do aumento da expressão de GRK2 pelo pré-tratamento com inibidores de iNOS(1400W), de HO-1(ZnPPIX) e de GCs(ODQ) em neutrófilos de animais pré-condicionados

Visualiza-se neste painel comparativo as diversas intensidades de expressão de fluorescência, tomando como unidades de comparação os grupos respectivos: Controle (Ctl); Pré-condicionados (PCI); 1400W (Pré-tratados com 1400W e pré-condicionados); ZnPPiX (Pré-tratados com ZnPPiX e pré-condicionados); ODQ (Pré-tratados com ZnPPiX e pré-condicionados).

Existem três diferentes marcações em que se dividem: o neutrófilo (DAPI), a da GRK2 e a união das duas marcações, chamando-a de Merge. Fica bem claro, após cuidadosa observação que o grupo com maior intensidade de fluorescência para GRK2 (coluna do meio) é o grupo PCI e os demais grupos apresentam intensidade inferior, tanto controle como pré-tratamento.



O painel acima demonstra a expressão de GRK2 por imunofluorescência presente nos neutrófilos dos diversos grupos (Ctl:controle; PCI:pré-condicionados; e pré-condicionados pré-tratados com 1400W(inibidor de Inos); ZnPPIX(inibidor de HO-1) e ODQ(inibidor de Guanilato Ciclase solúvel)).Observa-se importante aumento de fluorescência no grupo PCI em relação aos demais controle e pré-tratados.

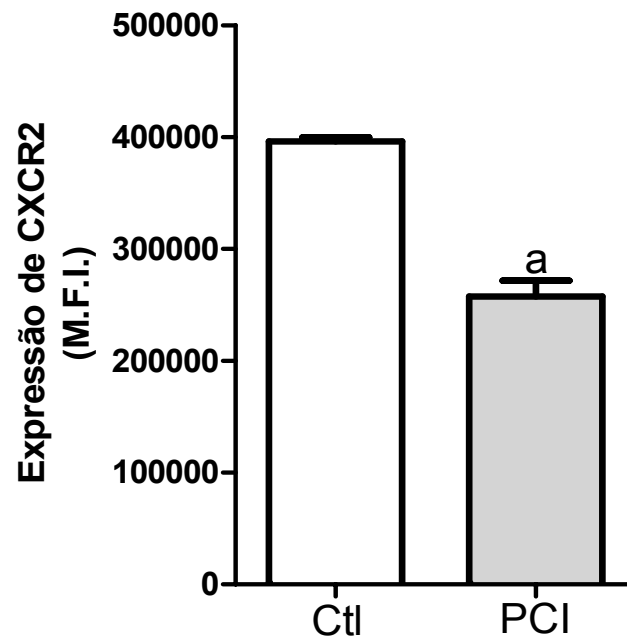
QUADRO 2- Painel de imunofluorescência para GRK2 em animais pré-condicionados e submetidos ao pré-tratamento com inibidores de iNOS, HO-1 e GCs

Fonte: Pesquisa direta

4.6 Diminuição da expressão de CXCR2 nos neutrófilos pelo PCI a distância

Na figura 20, procurou-se avaliar a expressão do receptor de quimicina, CXCR2, este responsável em grande parte pela resposta do neutrófilo ao estímulo quimiotático do KC (quimiocina derivada de queratinócitos). Verifica que o grupo controle, apresentou na citometria de fluxo expressão significativamente maior que o grupo pré-condicionado.

Tal diferença estaria em torno de 40% entre os grupos. Tal fato demonstra o importante efeito inibitório desempenhado pelo pré-condicionamento isquêmico na inibição da migração de neutrófilos.



A expressão de CXCR2 (receptor transmembrana de KC) foi mensurada por citometria de fluxo em neutrófilos de animais controles e pré-condicionados. Após a indução do PCI, foi colhido sangue desses animais e incubado com anticorpos anti-CXCR2. Observa-se importante diminuição da intensidade de fluorescência nos animais pré-condicionados diferentemente do grupo controle. Sugere que o pré-condicionamento esteja levando a uma diminuição da expressão de CXCR2, o que demonstra a importante atividade do pré-condicionamento isquêmico na inibição da migração de neutrófilos. $p < 0,05$ vs grupo controle. Para análise estatística utilizou-se o teste t-Student, seguido do teste de Bonferroni.

FIGURA 20- Diminuição da expressão de CXCR2 nos neutrófilos pelo PCI a distância

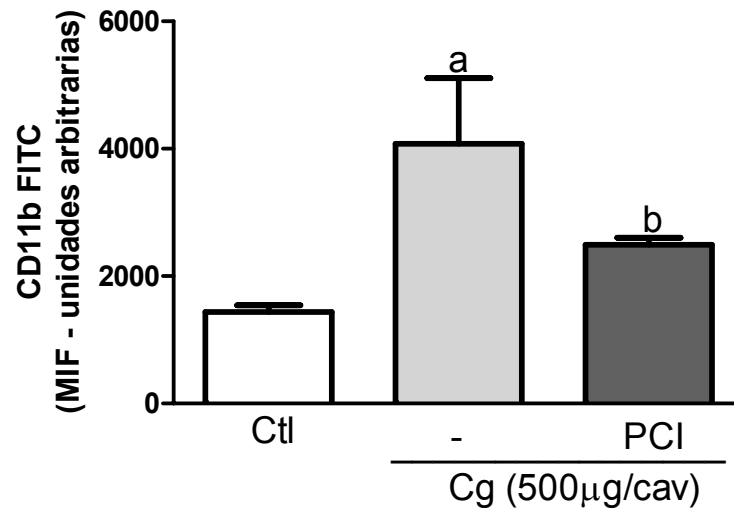
Fonte: Pesquisa direta

4.7 Diminuição da expressão de CD11b (β 2-Integrina) nos neutrófilos pelo PCI a distância

Foi avaliada a expressão das proteínas de adesão presentes nos neutrófilos, as integrinas, em especial, as β 2-Integrinas. São elas as principais responsáveis pelo componente celular da adesão dos neutrófilos a parede do endotélio vascular, na qual irão encontrar proteínas complementares de adesão, as endoteliais, com as quais se fixaram e completaram o processo de transmigração das células para o sítio de resposta inflamatória.

Na figura 21, pode-se observar aumento significativo da expressão dessas proteínas na vigência da resposta inflamatória, vendo que o grupo com estímulo inflamatório apresenta expressão significativamente maior de CD11b do que o grupo controle (^a $p < 0,05$) e o grupo PCI (pré-condicionado antes da indução inflamatória), apresenta expressão expressivamente inferior do que o grupo Carragenina (^b $p < 0,05$), indicando importante atividade de inibição pelo PCI da expressão de β 2-integrinas .

- **PROTEÍNAS DE ADESÃO**



A expressão de CD11b foi mensurada por citometria de fluxo em neutrófilos de animais controles e pré-condicionados. Após a indução do PCI, foi colhido sangue desses animais, incubado com anticorpos anti-CD11b e avaliado em citômetro de fluxo. Observa-se importante diminuição da intensidade de fluorescência nos animais pré-condicionados diferentemente do grupo controle. Sugere que o pré-condicionamento esteja levando a uma diminuição da expressão de CD11b, o que contribui para a diminuição do mecanismo de transmigração dos neutrófilos, pois haveria inibição de proteínas de adesão nos neutrófilos dos animais. Adicionar a $p < 0,05$ vs grupo Sham. Para análise estatística utilizou-se o teste t-Student seguido do teste de Bonferroni.

FIGURA 21- Diminuição da expressão de CD11b nos neutrófilos pelo PCI a distância

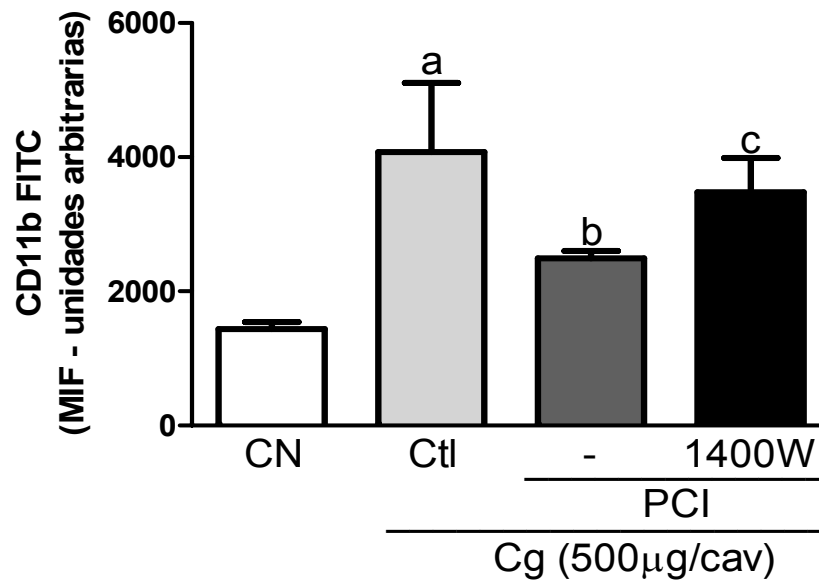
Fonte: Pesquisa direta

4.7.1 Prevenção da diminuição da expressão de CD11b nos neutrófilos pelo PCI a distância por inibidor específico de iNOS (1400W), inibidor de HO-1 (ZnPPiX) e por inibidor de GCs (ODQ)

Na figura 22, verifica-se a manutenção dos níveis de CD11b no grupo de neutrófilos de animais pré-condicionados pré-tratados com inibidor de iNOS, semelhante ao grupo controle e significativamente diferente do grupo pré-condicionado (^cp<0,05). Com isso, percebe-se o importante papel da atuação do Óxido Nítrico na ação do PCI. Pode-se observar também o importante efeito inibitório do PCI na expressão de CD11b significativamente menor que no grupo que recebeu apenas o estímulo inflamatório (^bp<0,05).

Na figura 23, observa-se a prevenção da diminuição da expressão de CD11b pelo PCI devido ao pré-tratamento com ODQ (inibidor de Guanilato ciclase solúvel), quando comparamos o grupo pré-tratado com o grupo que foi apenas pré-condicionado antes do estímulo inflamatório (^cp<0,05).

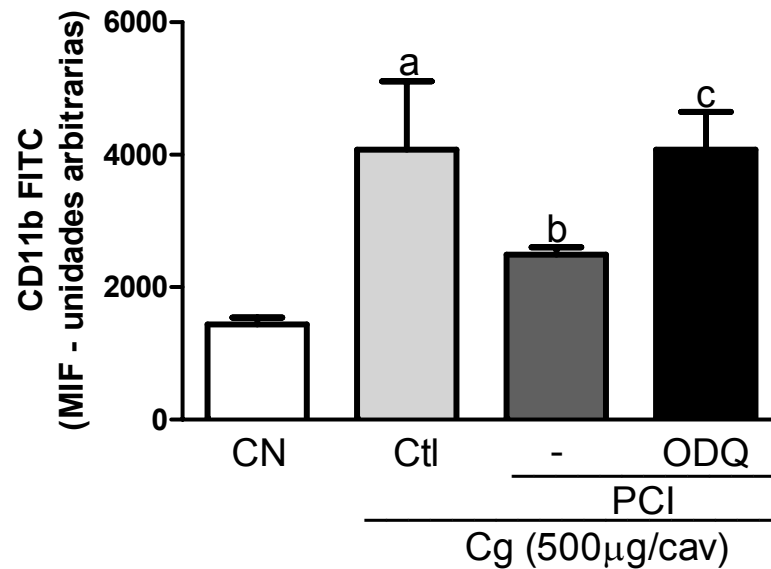
Já na figura 24, pode-se observar que o grupo pré-tratado novamente manteve os níveis de CD11b semelhantes ao grupo que não foi pré-condicionado e significativamente maiores que o grupo pré-condicionados (^cp<0,05), indicando-nos que com o inibidor de HO-1 houve bloqueio da ação do pré-condicionamento assim como nos grupos com os inibidores anteriormente descritos.



A expressão de CD11b foi mensurada por citometria de fluxo em neutrófilos de animais controles, pré-condicionados e pré-condicionados pré-tratados com inibidor de iNOS(1400w). Após o pré-tratamento com 1400W, foi feita a indução do PCI, colhido sangue desses animais, incubado com anticorpos anti-CD11b e avaliado em citômetro de fluxo. Observa-se importante manutenção da intensidade de fluorescência nos animais pré-condicionados semelhante ao grupo controle e diferente do grupo pré-condicionado. Sugere que o inibidor bloqueou a ação do pré-condicionamento o qual levaria a diminuição da expressão de CD11b, por mecanismo dependente de NO, mantendo a expressão de CD11b semelhante a do controle. Adicionalmente $p < 0,05$ vs grupo Sham $p < 0,05$ vs grupo Ctl. Para análise estatística, utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

FIGURA 22- Prevenção da diminuição da expressão de CD11b nos neutrófilos pelo PCI a distância por inibidor específico de iNOS

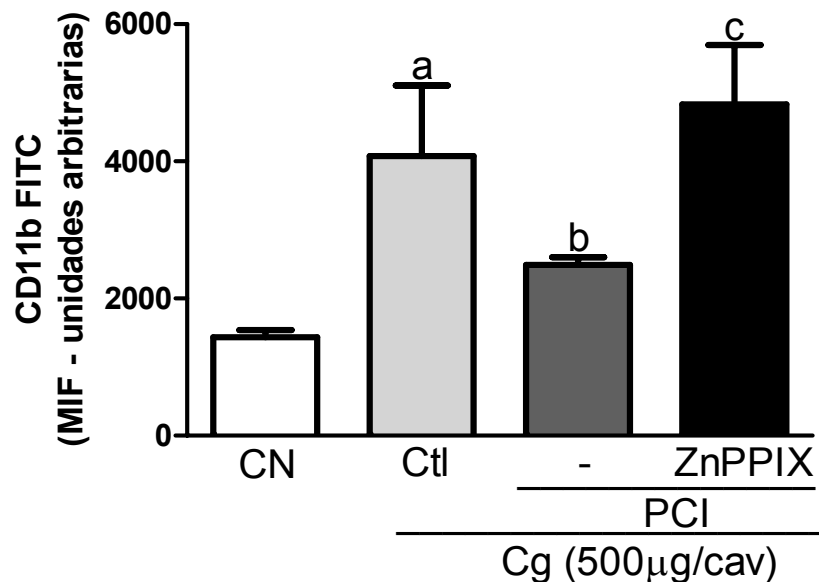
Fonte: Pesquisa direta



A expressão de CD11b foi mensurada por citometria de fluxo em neutrófilos de animais controles, pré-condicionados e pré-condicionados pré-tratados com inibidor de GCs (ODQ). Após o pré-tratamento com ODQ, foi feita a indução do PCI, colhido sangue desses animais, incubado com anticorpos anti-CD11b e avaliado em citômetro de fluxo. Observa-se importante manutenção da intensidade de fluorescência nos animais pré-condicionados semelhante ao grupo controle e diferente do grupo pré-condicionado. Sugere que o inibidor bloqueou a ação do pré-condicionamento o qual levaria a diminuição da expressão de CD11b, por mecanismo dependente de GCs em via final, mantendo a expressão de CD11b semelhante a do controle. Adicionar a $p < 0,05$ vs grupo Sham $p < 0,05$ vs grupo Ctl. Para análise estatística, utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

FIGURA 23- Prevenção da diminuição da expressão de CD11b nos neutrófilos pelo PCI a distância por inibidor específico de GCs

Fonte: Pesquisa direta



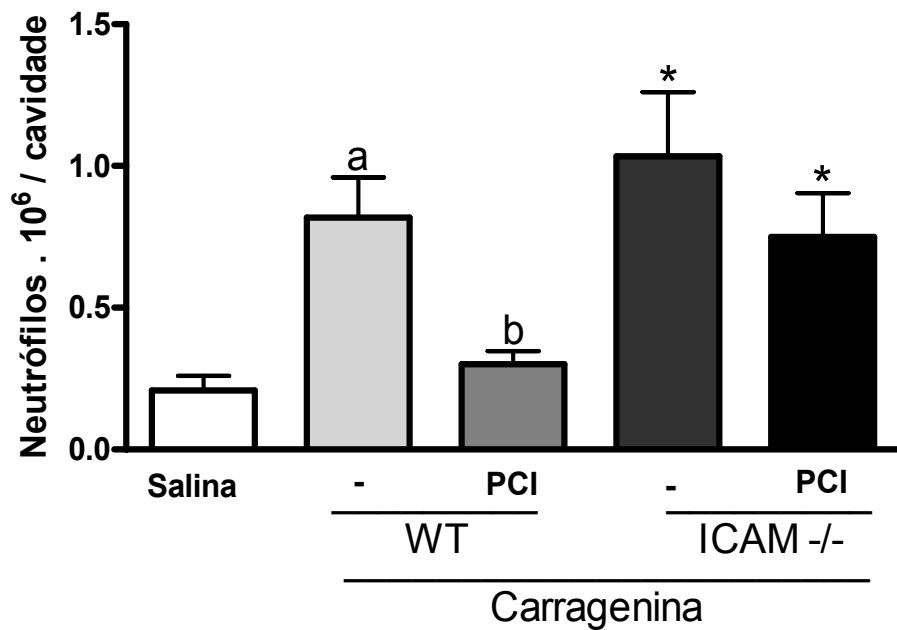
A expressão de CD11b foi mensurada por citometria de fluxo em neutrófilos de animais controles, pré-condicionados e pré-condicionados pré-tratados com inibidor de HO-1 (ZnPPiX). Após o pré-tratamento com ZnPPiX, foi feita a indução do PCI, colhido sangue desses animais, incubado com anticorpos anti-CD11b e avaliado em citômetro de fluxo. Observa-se importante manutenção da intensidade de fluorescência nos animais pré-condicionados semelhante ao grupo controle e diferente do grupo pré-condicionado. Sugere que o inibidor bloqueou a ação do pré-condicionamento o qual levaria a diminuição da expressão de CD11b, por mecanismo dependente de ZnPPiX, mantendo a expressão de CD11b semelhante a do controle. Adicionar a $p < 0,05$ vs grupo Sham $p < 0,05$ vs grupo Ctl. Para análise estatística, utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

FIGURA 24- Prevenção da diminuição da expressão de CD11b nos neutrófilos pelo PCI a distância por inibidor específico de HO-1
 Fonte: Pesquisa direta

4.8 Migração de neutrófilos em animais nocautes para ICAM-1: Manutenção da migração nos nocautes

Nesse experimento, avaliou-se a participação da proteína de adesão presente no endotélio, mais frequentemente relacionada ao mecanismo de transmigração de células inflamatórias, a ICAM-1. Optou-se como ferramenta farmacológica para a avaliação o uso de animais nocautes (KO) para os genes que codificam essa molécula de adesão e avaliou-se a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal com estímulo de Carragenina (500µg/cav).

Na figura 25, observa-se o efeito já esperado do pré-condicionamento isquêmico, o qual inibe significativamente a migração nos animais selvagens ($^b p < 0,05$). Já nos animais nocautes para ICAM-1, houve manutenção da migração de neutrófilos no grupo desafiado por Carragenina e não houve diminuição da migração nos animais nocautes quando estes foram pré-condicionados antes da indução inflamatória.



Animais selvagens foram divididos em controles e pré-condicionados assim como os nocautes para ICAM-1, em seguida foi realizada a indução inflamatória com Carragenina ($500\mu\text{g}/\text{cav}$). O lavado peritoneal dos animais foi colhido após 4 horas da aplicação de Carragenina (Cg) e avaliado em Counter a quantidade de neutrófilos na cavidade peritoneal nos grupos acima. Com isso, observa-se a manutenção da migração em animais nocautes assim como nos nocautes pré-condicionados. Sugere-se então que a ausência de ICAM-1 não é evento fundamental para a inibição da migração, e o PCI não leva a diminuição desta. Adicionar a $p < 0,05$ vs grupo Sham. $p > 0,05$ vs grupo PCI (ICAM-1-/-). Para análise estatística, utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de t-Student.

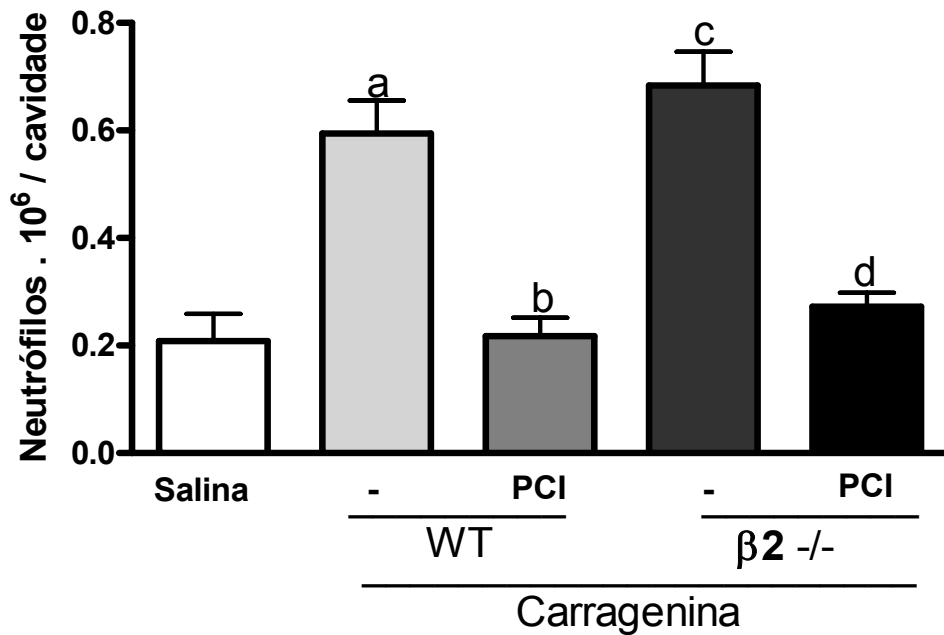
FIGURA 25- Migração de neutrófilos em animais nocautes para ICAM-1: Manutenção da migração nos nocautes.

Fonte: Pesquisa direta

4.9 Migração de neutrófilos em animais nocautes para β 2-integrina: Inibição da migração nos nocautes

Nesse experimento, avaliou-se novamente a participação de proteínas de adesão presente nas células, contudo, optou-se por utilizar como ferramenta farmacológica para a avaliação o uso de animais nocautes (KO) para os genes que codificam essa molécula de adesão e avaliou-se a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal com estímulo de Carragenina (500 μ g/cav).

Na figura 26, observa-se o efeito já esperado do pré-condicionamento isquêmico, o qual inibe significativamente a migração nos animais selvagens (^bp<0,05). Em concordância com o grupo anterior, nos animais nocautes para β 2-integrina, houve migração de neutrófilos no grupo desafiado por Carragenina, e quando os animais nocautes foram pré-condicionados, houve diminuição significativada migração nos animais nocautes (^dp<0,05).



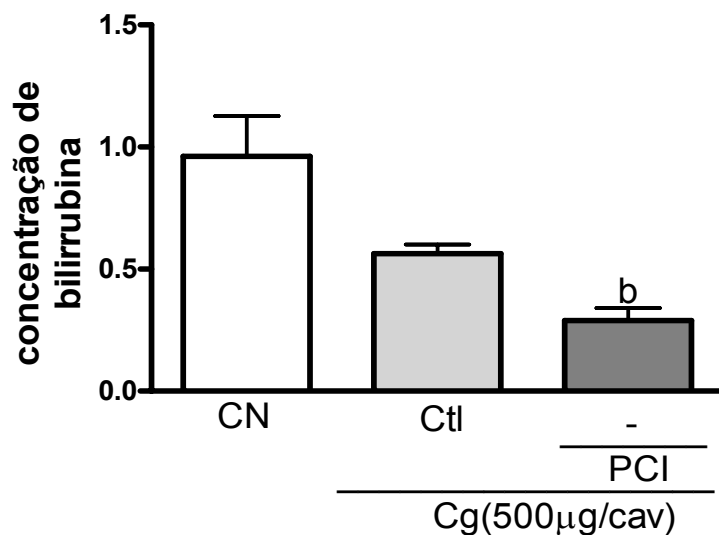
Animais selvagens foram divididos em controles e pré-condicionados assim como os nocautes para $\beta 2$ -integrina, em seguida foi realizada a indução inflamatória com Carragenina (500 μ g/cav). O lavado peritoneal dos animais foi colhido após 4 horas da aplicação de Carragenina (Cg) e avaliado em Counter a quantidade de neutrófilos na cavidade peritoneal nos grupos acima. Com isso, observa-se a manutenção da migração em animais nocautes assim como nos nocautes pré-condicionados. Sugere-se então que a ausência de $\beta 2$ -integrina não é evento fundamental para a inibição da migração, embora o PCI leve a diminuição desta. Adicionar a ^{a,b,c,d}p < 0,05 vs grupo Sham. Para análise estatística, utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de t-Student.

FIGURA 26- Migração de neutrófilos em animais nocautes para $\beta 2$ -integrina: Inibição da migração nos nocautes.

Fonte: Pesquisa direta

4.10 Dosagem de bilirrubina no plasma de animais pré-condicionados: Redução da concentração de bilirrubina

Na figura 27, avaliou-se a dosagem de bilirrubina no sangue de animais que receberam estímulo inflamatório com Carragenina e em seguida alguns foram pré-condicionados. Pode-se observar que no grupo pré-condicionado, obtivemos dosagem significativamente menor que o grupo controle, o qual foi apenas estimulado com Carragenina (^bp<0,05).



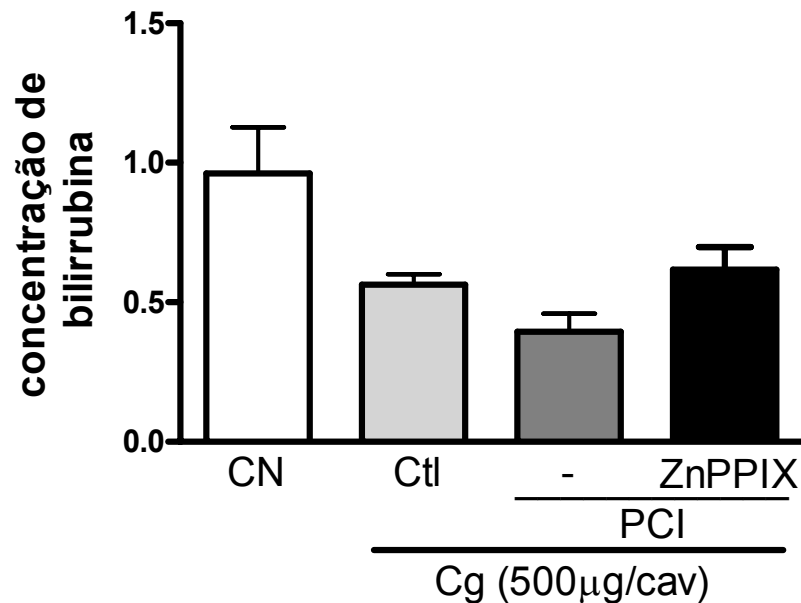
Animais foram divididos em controles e pré-condicionados. Alguns foram pré-condicionados e nos controles e pré-condicionados foi realizada a indução inflamatória com Carragenina (Cg) (500µg/cav). Então, foi coletado sangue dos animais dos grupos e submetido a centrifugação para a coleta de plasma. A dosagem de bilirrubina foi realizada por espectrofotometria. Observou-se diminuição importante da dosagem de bilirrubina em relação ao controle e controle negativo (CN). Sugere-se que o PCI leva a diminuição da produção de bilirrubina, provavelmente por deslocamento do equilíbrio da reação do metabolismo do Heme pela maior produção de CO pela regulação positiva de HO-1. $p < 0,05$ vs grupo Ctl. Para análise estatística, utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de t-Student.

FIGURA 27- Dosagem de bilirrubina no plasma de animais pré-condicionados: Redução da concentração de bilirrubina.

Fonte: Pesquisa direta

4.10.1 Dosagem de bilirrubina no plasma de animais pré-condicionados e pré-tratados com inibidor de HO-1: Prevenção da redução da concentração de bilirrubina

Na figura 28, avaliou-se a participação da via da HO-1 no mecanismo do PCI a distância sobre a concentração de bilirrubina no plasma do animal. Observa-se que o grupo pré-tratado e pré-condicionado antes do estímulo inflamatório manteve o nível de bilirrubina no plasma semelhante ao grupo que não foi pré-condicionado, e significativamente maior que o grupo PCI (^bp<0,05).



Animais foram divididos em controles, pré-condicionados e pré-tratados/pré-condicionados. Foi realizada a indução inflamatória com Carragenina (Cg) (500µg/cav) nos grupos Ctl, Sham e ZnPPIX, nesse último foi feito o pré-tratamento com inibidor de HO-1. Então, foi coletado sangue dos animais dos grupos e submetido a centrifugação para a coleta de plasma. A dosagem de bilirrubina foi realizada por espectrofotometria. Observou-se manutenção da concentração de bilirrubina no grupo pré-tratado, diminuição importante da dosagem de bilirrubina nos pré-condicionados em relação ao controle e controle negativo (CN). Sugere-se que a manutenção da concentração de bilirrubina no grupo ZnPPIX, devido a inibição da via de síntese de CO. Adicionar a $p < 0,05$ vs Sham $ap < 0,05$ vs grupo Ctl. Para análise estatística, utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de t-Student.

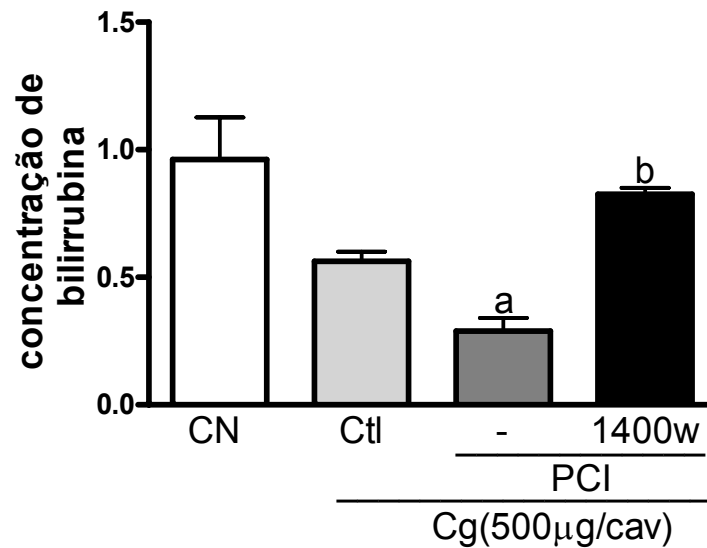
FIGURA 28- Dosagem de bilirrubina no plasma de animais pré-condicionados e pré-tratados com inibidor de HO-1: Prevenção da redução da concentração de bilirrubina

Fonte: Pesquisa direta

4.10.2 Dosagem de bilirrubina no plasma de animais pré-condicionados e pré-tratados com inibidor de iNOS: Prevenção da redução da concentração de bilirrubina

Na figura 29, avaliou-se a participação do Óxido Nítrico dependente de iNOS no mecanismo do PCI a distância sobre a concentração de bilirrubina no plasma do animal.

Observa-se que o grupo pré-tratado com inibidor de iNOS e pré-condicionado antes do estímulo inflamatório manteve o nível de bilirrubina no plasma semelhante ao grupo que não foi pré-condicionado, e significativamente maior que o grupo PCI (^bp<0,05) Com isso, percebe-se uma importante interação da via do NO com a via de metabolização do HEME.



Animais foram divididos em controles, pré-condicionados e pré-tratados/pré-condicionados. Foi realizada a indução inflamatória com Carragenina (Cg) (500 μ g/cav) nos grupos Ctl, Sham e 1400W, nesse último foi feito o pré-tratamento com inibidor de iNOS. Então, foi coletado sangue dos animais dos grupos e submetido a centrifugação para a coleta de plasma. A dosagem de bilirrubina foi realizada por espectrofotometria. Observou-se manutenção da concentração de bilirrubina no grupo pré-tratado, diminuição importante da dosagem de bilirrubina nos pré-condicionados em relação ao controle e controle negativo (CN). Sugere-se que a manutenção da concentração de bilirrubina no grupo 1400W, devido a inibição da via de síntese do NO no PCI, reforçando a ideia de interação com a via do CO. Adicionar a $p < 0,05$ vs Sham $ap < 0,05$ vs grupo Ctl. Para análise estatística, utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de t-Student.

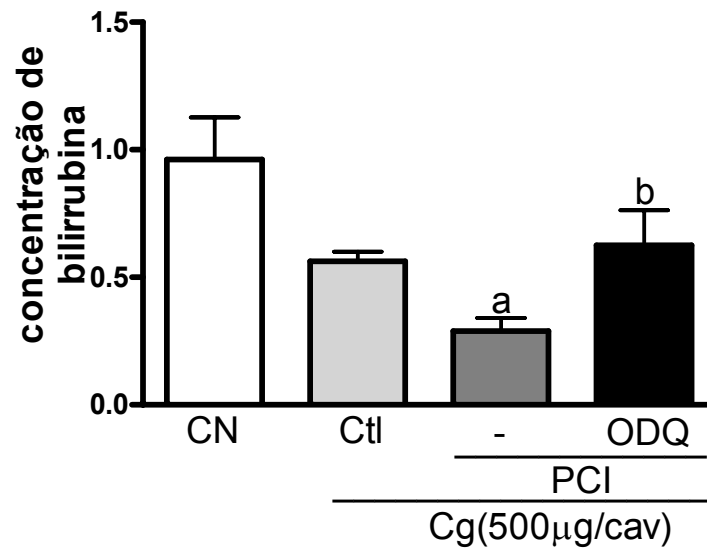
FIGURA 29- Dosagem de bilirrubina no plasma de animais pré-condicionados e pré-tratados com inibidor de iNOS: Prevenção da redução da concentração de bilirrubina.

Fonte: Pesquisa direta

4.10.3 Dosagem de bilirrubina no plasma de animais pré-condicionados e pré-tratados com inibidor de GCs: Prevenção da redução da concentração de bilirrubina

Na figura 30, avaliou-se a participação da Guanilato Ciclase solúvel (GCs) no mecanismo do PCI a distância sobre a concentração de bilirrubina no plasma do animal.

Observa-se que o grupo pré-tratado com inibidor de GCs e pré-condicionado antes do estímulo inflamatório manteve o nível de bilirrubina no plasma semelhante ao grupo que não foi pré-condicionado, e significativamente maior que o grupo PCI (^bp<0,05) Como um importante mediador de via final, a guanilato ciclase se mostrou importante na diminuição da concentração de bilirrubina no grupo PCI.



Animais foram divididos em controles, pré-condicionados e pré-tratados/pré-condicionados. Foi realizada a indução inflamatória com Carragenina (Cg) (500 μ g/cav) nos grupos Ctl, Sham e ODQ, nesse último foi feito o pré-tratamento com inibidor de GCs. Então, foi coletado sangue dos animais dos grupos e submetido a centrifugação para a coleta de plasma. A dosagem de bilirrubina foi realizada por espectrofotometria. Observou-se manutenção da concentração de bilirrubina no grupo pré-tratado, diminuição importante da dosagem de bilirrubina nos pré-condicionados em relação ao controle e controle negativo (CN). Sugere-se que a manutenção da concentração de bilirrubina no grupo ODQ, devido a inibição da via final do PCI que interage necessariamente com a via do Heme. bp<0,05 vs Sham ap<0,05 vs grupo Ctl. Para análise estatística, utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de t-Student.

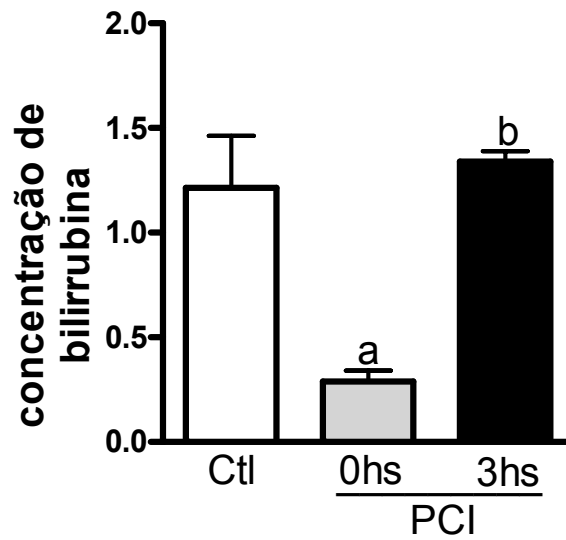
FIGURA 30- Dosagem de bilirrubina no plasma de animais pré-condicionados e pré-tratados com inibidor de GCs:Prevenção da redução da concentração de bilirrubina.

Fonte: Pesquisa direta

4.11 Variação da concentração de bilirrubina com o tempo

Avaliou-se a concentração de bilirrubina em plasma de animais controles e pré-condicionados. De forma que os animais pré-condicionados foram avaliados seriadamente em horários diferentes: logo após a reperfusão do membro e 180 minutos após.

Na figura 31, observa-se intensa e significativa alteração dos níveis de bilirrubina no plasma de animais logo após o pré-condicionamento e controle (^a $p < 0,05$). Também percebe-se importante diferença nas concentrações de bilirrubina logo após a reperfusão e 3 horas após esta (^b $p < 0,05$).



Realizou-se a dosagem da concentração de bilirrubina após a indução do pré-condicionamento isquêmico em tempos variados. Observou-se a redução significativa da concentração de bilirrubina logo após o período de reperfusão (30min), contudo houve a plena reversão da concentração ao nível do controle após 3 horas do evento. Para análise estatística utilizou-se o teste t-Student seguido do teste de Bonferroni (Adicionar a $p < 0,05$).

FIGURA 31- Análise de concentração de bilirrubina vs tempo: Variação da concentração de bilirrubina com o tempo

Fonte: Pesquisa direta

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O pré-condicionamento isquêmico (PCI) consiste em um evento endógeno que é ativado por períodos curtos de isquemia seguidos de reperfusão, os quais levam a uma proteção anti-isquêmica e anti-inflamatória local e a distância.

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa já demonstraram a aplicação do efeito anti-inflamatório local e a distância do pré-condicionamento isquêmico em diversos modelos (SOUZA FILHO et al., 2009; 2010). Contudo, persiste a necessidade de maiores esclarecimentos a respeito dos mecanismos e mediadores através dos quais o pré-condicionamento isquêmico atua.

Neste estudo, foram avaliados possíveis mecanismos de ação do efeito anti-inflamatório do pré-condicionamento isquêmico a distância utilizando modelos clássicos de inflamação em um sítio distante.

O modelo de pré-condicionamento isquêmico utilizado foi já validado por outros pesquisadores como um modelo simples, fácil e de boa reprodutibilidade: um torniquete com faixa elástica posicionado no membro posterior direito (SOUZA FILHO et al., 2009; 2010).

A migração de leucócitos para uma região de intensa atividade inflamatória é uma consequência presente em todos os processos inflamatórios agudos (MULLER, 2002), variando a intensidade da resposta inflamatória a depender da agressão e do grau de desenvolvimento e status imunológico do hospedeiro (ALEXANDER, HILTON, 2004).

Sabe-se que o objetivo primário da migração celular para o sítio de injúria é debelar a causa primária que desencadeou a resposta inflamatória, contudo o que se vê é uma exacerbação e amplificação do processo lesivo levando a uma maior morbi-mortalidade e intensificação dos eventos posteriores. Logo, a inibição da migração celular é de fundamental importância para a resolução da inflamação local.

Nosso trabalho tem como objetivo identificar os principais mecanismos e mediadores envolvidos na inibição da migração de neutrófilos pela ação anti-inflamatória do pré-condicionamento isquêmico remoto. Sabe-se que a migração de leucócitos é etapa chave na resposta inflamatória local e sistêmica (MOSERet al., 2004).

O pré-condicionamento isquêmico (PCI), há tempos, vem demonstrando ter importante ação experimental e potencial aplicabilidade clínica (MURRYet al., 1986).

Depois de alguns anos, o pré-condicionamento teve uma importante evolução conceitual quando foi descoberta uma nova modalidade de PCI denominada remoto, na qual os possíveis fatores responsáveis pela ação do PCI são ativados a distância (MCCLANAHAN et al., 1993).

Diferentemente do anterior, o que muito se fala do benefício dessa modalidade é não haver injúria ao tecido local pela compressão isquêmica já que este não será diretamente pré-condicionado, uma importante conclusão tirada dessa nova concepção de PCI é que os fatores envolvidos na ação são ativados na circulação sanguínea e atuam tanto local como sistemicamente.

Contudo, somente há pouco tempo este evento endógeno foi reconhecido como mecanismo verdadeiramente anti-inflamatório (HARKIN et al., 2002). Diante de período de reperfusão seguinte a um evento de PCI, há uma produção em excesso de oxigênio levando a produção de radicais livres, ocorre dano endotelial, indução de mediadores inflamatórios e injúria parenquimatosa. Assim é razoável entendermos tal evento com muita semelhança com uma resposta inflamatória.

Até então, o pré-condicionamento isquêmico se configurava como um importante mecanismo endógeno anti-isquêmico e até hoje é a abordagem mais discutida quando se fala em pré-condicionamento isquêmico. Como prova dessa tendência, temos já importantes ensaios clínicos em desenvolvimento para esclarecer a atividade do pré-condicionamento (KLONER, 2009; GHOSH; GALINANES, 2003).

Contudo, existem importantes trabalhos experimentais que fundamentam com muita propriedade a ação anti-inflamatória do PCI remoto, inclusive discutindo possíveis mecanismos pelos quais essa atividade é mediada (HARKIN et al., 2002; SHIMIZU et al., 2008; SOUZA FILHO et al., 2009).

Nesta pesquisa, foi abordada a migração celular como evento central para o entendimento da ação anti-inflamatória do PCI remoto. Foi verificado que fatores de superfície tanto endotelial como de membrana celular de neutrófilos são determinantes para o processamento da cadeia inflamatória onde o recrutamento celular se torna indispensável para o desenvolvimento da resposta inflamatória.

No estudo desenvolvido por Souza Filho et al. (2009), discuti-se possíveis mecanismos da resposta inflamatória pelo qual foram avaliadas os seguintes modelos de lesão: edema de pata, cistite hemorrágica e lesão gástrica. Apreende-se

deste salientar a importante participação da migração de neutrófilos no desenvolvimento da reação inflamatória nos modelos clássicos estudados.

No edema de pata induzido por Carragenina, sabe-se que grande parte da resposta inflamatória é mediada por migração de leucócitos polimorfonucleares. No modelo de cistite hemorrágica, sabe-se que a migração de neutrófilos também tem importante participação.

Quanto à lesão gástrica induzida por indometacina, o principal mecanismo de toxicidade dessa droga no epitélio gástrico é a inibição de prostaglandinas, via inibição das ciclo-oxigenases devido à inibição de eventos de defesa do epitélio mediados por essa via (WALLACE et al., 1997). A indução de neutropenia ou utilização de soro anti-neutrófilo também inibe a lesão gástrica induzida por AINES. Diante do exposto acima, estudar a migração celular torna-se indispensável para esclarecer o mecanismo anti-inflamatório do PCI.

Foi demonstrado, pelo nosso laboratório também, que diante da indução do PCI a distância, não há alteração significativa dos níveis de interleucinas pró e anti-inflamatórias suficientes para explicar tamanha inibição da migração celular de neutrófilos, uma vez que esta é inibida de modo marcante impossibilitando a reação inflamatória. Há estudos na literatura que mostram dados que vão de encontro com nossos achados em relação à alteração dos níveis de interleucinas (LEE et al., 2002). Porém, ainda é discutível a real importância da alteração apresentada nas concentrações sanguíneas dessas interleucinas.

Diante deste importante resultado, direcionamos o foco de nossa investigação científica a outros mediadores participantes do processo da cinética leucocitária, não apenas às concentrações dos níveis de quimiocinas, mas também as demais participantes, como: proteínas de adesão endoteliais e celulares, receptores de membrana nos neutrófilos, quinases transmembranas e quimioatratantes celulares.

Inicialmente, para o bom andamento da pesquisa, foi necessário validar a ação anti-inflamatória do pré-condicionamento isquêmico a distância em camundongos, pois até então os resultados do nosso grupo eram realizados apenas em camundongos Wistar.

Foi induzida uma resposta inflamatória no abdome de camundongos Swiss por carragenina e avaliada o pré-condicionamento isquêmico a distância, aplicando o modelo de torniquete no membro inferior direito em um determinado grupo de animais antes do indutor inflamatório.

Observou-se uma importante prevenção da migração de neutrófilos no grupo de animais pré-condicionados estimulados com Carragenina (Cg) em relação aos animais que apenas receberam o indutor inflamatório. A reação inflamatória induzida por Carragenina induz um acúmulo progressivo de exsudato rico em proteínas e contendo um grande número de neutrófilos, ratificando a significativa ação do PCI na migração de neutrófilos (LO et al., 1982).

Atualmente, a atuação do PCI a distância como mecanismo anti-inflamatório é praticamente indiscutível, diferentemente do seu mecanismo de ação, o qual apresenta inúmeras teorias nas quais diversos dados são por vezes conflitantes.

Apesar dessa falta de dados concretos quanto ao mecanismo de ação, um dos principais mecanismos envolvidos na ação do pré-condicionamento isquêmico a distância discutidos hoje está relacionado com a modulação do evento por gases produzidos em um curto período de tempo na vigência do período de reperfusão, e dentre aqueles podemos destacar o NO e o CO.

A relação entre a ação inibitória do PCI a distância e esses gases foi avaliada com o uso de drogas inibidoras específicas de enzimas responsáveis pela síntese de NO e CO, respectivamente, Aminoguanidina, um inibidor seletivo da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e ZnPPIX, um inibidor específico de Heme Oxigenase 1(HO-1), também induzível pela atividade inflamatória.

Nos animais pré-condicionados sem pré-tratamento, verificou-se a ação inflamatória significativamente prevenida a despeito do estímulo inflamatório. Já, nos animais que foram pré-tratados com os inibidores enzimáticos e pré-condicionados antes do estímulo inflamatório, obtivemos uma inibição significativa da ação anti-inflamatória do PCI a distância, bem caracterizada no lavado peritoneal desses animais no qual havia migração de neutrófilos semelhante ao grupo controle.

Tais achados ratificam não só que a ação do PCI a distância é efetiva, como também demonstram que a produção de NO e CO são etapas importantes no mecanismo de ação anti-inflamatória do pré-condicionamento. (TAVARES-MURTA et al., 2001; 2002).

A atividade anti-inflamatória do Óxido Nítrico ainda não está bem elucidada, contudo dados vem demonstrando tratar-se de o NO proveniente de iNOS ou eNOS, modular a interação leucócitos-endotélio, observando-se isto a partir do uso de moduladores de NO, com os quais há importantes alterações de migração de

neutrófilos para o sítio de inflamação (BENJAMIM et al., 2002; KUBES et al., 1999; LELAMALI; WAND, 2001).

Sabe-se a partir de alguns estudos da ação modulatória do NO sobre citocinas pró-inflamatórias, estas são orquestradoras da resposta inflamatória no organismo. Neste sentido, também pode-se sugerir a modulação negativa do PCI isquêmico de citocinas como a interleucina-1 (IL-1) através da estimulação da produção de NO (GUIDOT; HYBERTSON, 1996; HICKEY et al., 1997; SIMON et al., 2010).

Já o Monóxido de Carbono veio, mais recentemente, apresentar potentes ações anti-inflamatórias no organismo. A Heme oxigenase é uma enzima microsomal que catalisa a degradação do heme em monóxido de carbono (CO), biliverdina (BVD) e ferro livre (ABRAHAM et al., 1988). A heme-oxigenase 1 é a isoforma induzível dessa enzima expressa em uma variedade de células durante a resposta inflamatória (FREITAS et al., 2006; TENHUNEN et al., 1969; OSHIRO et al., 1999; ALCARAZ et al., 2003).

Nos últimos anos, vários estudos têm demonstrado que a HO-1 é capaz de modular o processo inflamatório. Baixas concentrações de heme podem ter atividade anti-inflamatória via supra-regulação da Heme-oxigenase e estimulação da formação de metabólitos desta, levando a redução de migração celular, liberação de mediadores pró-inflamatórios e expressão de moléculas de adesão (HAYASHI et al., 1999; ZEGDI et al., 2002; VICENTE et al., 2003).

Diante dos achados anteriores, procuramos avaliar os mecanismos da ação do PCI agora *in vivo* com uma técnica onde os animais se mantinham anestesiados durante o período de avaliação da migração celular. Foi realizada a avaliação da migração pela técnica de microscopia intravital.

Foi organizado o experimento em grupos de animais com o mesmo desenho do anterior, ou seja, os animais pré-condicionados e pré-tratados previamente com os inibidores enzimáticos, assim como os controles foram submetidos ao exame de visualização direta da cavidade abdominal.

Nos resultados, pode-se observar dados compatíveis com os achados dos experimentos anteriores. Os parâmetros de avaliação desse experimento são o rolamento e a adesão dos leucócitos no leito vascular de vênulas de 3ª ordem. Foi encontrado que no grupo de animais pré-condicionados tanto o rolamento quanto a

adesão de células à parede dos vasos estavam significativamente diminuídos diferentemente do grupo controle.

Já no grupo de animais submetidos ao pré-tratamento com 1400W, um inibidor específico de iNOS, e com ZnPPiX prévio ao PCI, houve manutenção significativa de ambos os eventos tanto do rolamento quanto da adesão leucocitária, semelhante ao grupo controle. Diante dessa importante constatação, pode-se inferir que o PCI a distância interfere na migração celular como também fica claro que este evento age em fatores relacionados às fases de rolamento e adesão leucocitária.

Outra importante inferência constatada desse experimento é que a via de produção do NO como a via do CO são significantes na ação inibitória dos movimentos de rolamento e adesão leucocitária. Com isso, considerando a possibilidade de ativação da HO-1 e Inos pelo pré-condicionamento isquêmico, nossos dados, demonstram que a ação do PCI é inibida pelo uso de inibidores de HO-1 e Inos assim, corroboram outros dados da literatura que mostram que a inibição da via da Heme-oxigenase leva a um aumento da migração de leucócitos depois de um insulto inflamatório (ALENTI; IANARO,2000; WILLS et al., 1996; VICENTE et al.,2003; FREITAS et al., 2006).

Com esses dados, sugere-se a participação de moléculas de adesão na ação do PCI, assim resolvemos investigar os possíveis mediadores envolvidos na inibição local da migração propriamente dita no sítio leucócitos-endotélio: Avaliou-se a expressão de proteínas de adesão tanto celulares (integrinas) nos animais pré-condicionados assim como nos animais previamente tratados com bloqueadores de iNOS, HO-1 e GCs e nos seus respectivos controles.

Deste modo, tendo em vista uma avaliação completa e precisa desses componentes moleculares, foram medidas a expressão de moléculas de adesão celular por citometria de fluxo mensurada a expressão de β 2-integrina no sangue dos animais, com os grupos de animais controle como nos submetidos ao PCI quanto ao pré-tratamento prévio ao PCI a distância.

Na expressão de β 2-integrina, observou-se importante queda da expressão desta no grupo PCI em comparação ao controle e importante manutenção da expressão de β 2-integrina semelhante aos níveis do controle nos grupos pré-tratados. Importantes estudos já demonstraram a modulação de selectinas pelo NO, inclusive em humanos (ARMSTEAD et al., 1997).

Os grupos pré-tratados nesse experimento receberam 1400W, ZnPPIX e ODQ, este é um importante inibidor de guanilato ciclase solúvel, enzima mediador de via final na migração celular.

Com esse resultado, foi observado uma diminuição da expressão das moléculas de adesão no grupo de animais submetidos ao PCI a distância e o nível de expressão mantido nos grupos experimentais pré-tratados indicando que os três compostos foram capazes de prevenir a inibição da expressão de proteínas de adesão pelo pré-condicionamento a distância, inferindo assim que a ação de iNOS, HO-1e GCs são fundamentais para o desenvolvimento da ação a distância do pré-condicionamento isquêmico mediado via proteínas de adesão: β 2-integrinas. Com esses resultados, pode-se sugerir que β 2-integrinas participam do mecanismo inibitório do pré-condicionamento isquêmico remoto.

Foi demonstrado que o CO modula a migração de neutrófilos devido à diminuição da interação endotélio-neutrófilos por regular negativamente a expressão de ICAM-1/CD54 no endotélio da microcirculação e interessante por um mecanismo dependente de GCs (AHLUWALIA; FOSTER,2004; DAL-SECCO,2010).

Com isso, podemos atribuir a manutenção dos níveis de ICAM-1 nos animais pré-tratados com ZnPPIX e ODQ ao bloqueio da regulação da ICAM-1 pelo CO, seja diretamente inibindo a heme-oxigenase, ou na via final inibindo a Guanilato ciclase solúvel. Atualmente sabe-se da estreita relação da via modulatória da inflamação mediada pelo NO e CO (KUBES et al., 1991; DAL SECCO et al., 2003; 2006; FREITAS et al., 2006).

Além disso, foi demonstrado que a atividade da Heme-oxigenase está envolvida com o efeito inibitório do NO na expressão de ICAM-1. No caso em questão o NO modula a expressão de ICAM-1 por um mecanismo dependente de CO (DAL SECCO et al.,2006; 2010).

Diante desse dado, poderíamos entender e validar nosso dado que está corroborado parcialmente pelo fato de que em todos os grupos pré-tratados com ZnPPIX, ODQ e 1400W. Não há plena conclusão sobre esse dado porque o pré-tratamento com tais drogas foram realizados em separado, não configurando a relação de dependência entre os mediadores.

Dados anteriores (DAL SECCO et al.,2010), apontam nenhuma alteração com relação ao nível do controle na expressão de β 2-integrina (CD18) quando induzida por uso de LPS e animais pré-tratada com ZnPPIX. Tal dado, está em relativo

desacordo com nossos dados que demonstram alteração significativa alteração dos níveis de expressão de β 2-integrina (CD11b) entre os animais controle, os que foram aplicado LPSe animais pré-tratados com ZnPPiX, este foi reproduzido nos grupos pré-tratados com 1400W e ODQ.

Discute-se a possibilidade de, devido a grande variedade de integrinas, haver uma discrepância natural entre tais dados. Sabe-se que há diversas b-integrinas: CD11a/CD18 CD11b/CD18, CD11c/CD18, levando com isso há diversas possibilidades de expressão alterada(SATO et al., 1999; SMITH; 1993; LUSCINSKAS et al., 1991; FAGERHOLM et al., 2006).

Foram utilizados também animais nocautes (KO) para as mesmas moléculas de adesão na busca de investigar mais detalhadamente a relação da modulação dessas no evento isquêmico em animais pré-condicionados submetidos a um insulto inflamatório.

A participação da molécula de adesão endotelial, ICAM-1 e integrinas, foi inicialmente avaliada com a simples migração celular com estudo do lavado peritoneal em animais nocautes para essas moléculas, foi avaliado o lavado proveniente de animais pré-condicionados e de animais não pré-condicionados, e foi observado importantes diferenças entre esses grupos.

Nos animais pré-condicionados selvagens, como já era esperado, inibiu-se a migração celular o que não ocorreu no seu controle. Já com relação aos nocautes, houve migração celular nos nocautes para ICAM-1, e essa migração se manteve nos animais nocautes para ICAM-1 pré-condicionados. Tais dados sugerem que a ICAM-1 não é uma molécula de adesão essencial para o processamento da migração celular, corroborando os dados de Secco et al. em 2006.

Contudo, na presença de ICAM-1, sugere-se que há um efeito modulatório negativo em conjunto com o óxido nítrico em relação a adesão e transmigração que seria muito importante para a efetiva inibição da migração leucocitária mediada pela produção de óxido nítrico em resposta ao pré-condicionamento.

Quanto aos animais nocautes para β 2-integrina, houve um comportamento semelhante dos nocautes aos dos animais selvagens: Nos pré-condicionados, houve inibição da migração significativamente diferente dos selvagens tanto nos nocautes quanto nos animais controle.

Diante do fato de que ocorreu a inibição da expressão de CD11b nos animais pré-condicionados, esperava-se a manutenção da migração dos nocautes para essa molécula, o que não ocorreu.

Retomando ao dado anterior, onde nos nocautes para ICAM-1 mantiveram a migração mesmo em pré-condicionados, tal dado nos demonstra diminuída significância ao componente celular das moléculas no fenômeno de migração de neutrófilos.

Posto isso, pode-se analisar a migração de células nos nocautes para β 2-integrina e corrobora-se essa idéia, pois mesmo diante da ausência dessa molécula celular, não houve alteração no comportamento inibitório do pré-condicionamento isquêmico.

Na literatura, apesar de existir dados que apontam a importante participação das proteínas de adesão no processo transmigratório (LIBEREK et al., 2004), utilizando modelos de ligadura e punção cecal como agente agressor em animais nocautes, não houve qualquer inibição da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal destes animais, o que pode reforçar a sugestão de que nos animais nocautes ocorre mecanismos adaptativos compensatórios (CROCKETT et al., 2004).

Apesar de sabidamente importante (ANDERSON; SPRINGER, 1987; SMITH, 1993) para a migração de células, a ausência dessa molécula nos nocautes pode ter sido suprida de maneira significativa por outras integrinas e de moléculas de adesão complementares a essas já bem documentadas (MORISAKI et al., 2002; 2001; SOARES et al., 2004), dado inclusive ao fato de ter ocorrido migração no nocaute não pré-condicionado.

Diante do mecanismo de pré-condicionamento isquêmico nos nocautes para β 2-integrina, houve inibição de migração, pois aconteceu inibição do componente endotelial, representado pela ICAM-1 e, além disso, pode ter havido uma inibição de integrinas da mesma família da β 2-integrina que foram supra-expressão no animal nocaute, assumindo o papel da representante em questão (STEEBER et al., 1999).

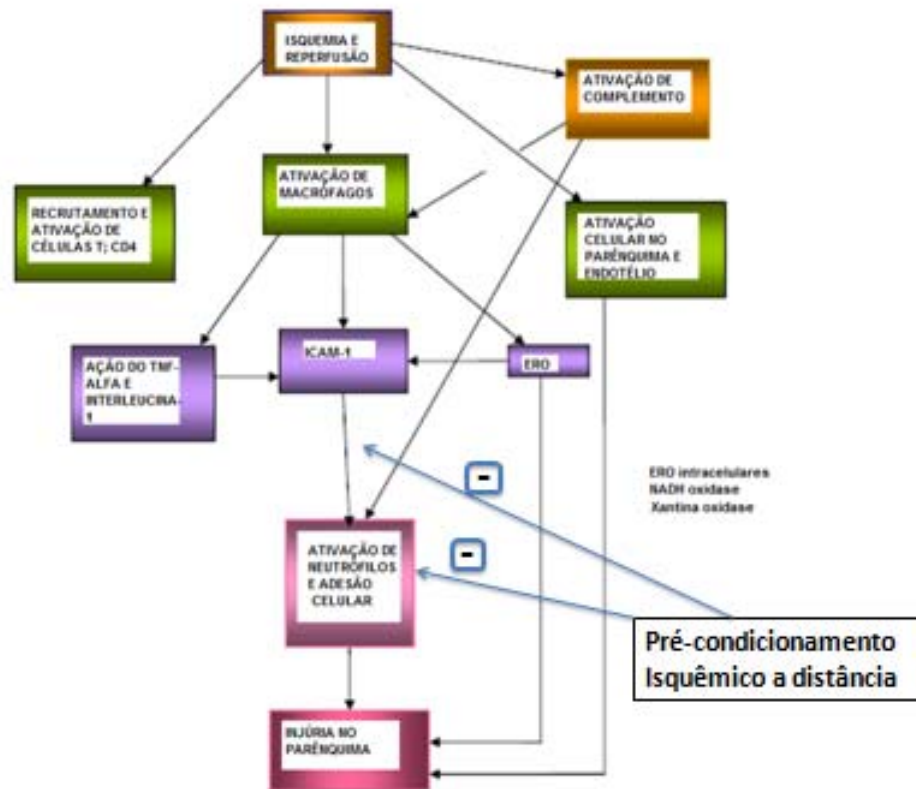
Tendo em vista as alterações do tráfego leucocitário na vigência do pré-condicionamento isquêmico remoto, sem significativa alteração nos níveis de interleucinas pró e anti-inflamatórias, tomamos também como objeto de estudo o neutrófilo propriamente dito, já que a interação células-ambiente não tinha sido alterada à custa de alteração dos níveis de interleucinas.

Os neutrófilos foram isolados do animal após as respectivas intervenções dos grupos experimentais com pré-condicionamento e pré-tratamento com aqueles mesmos inibidores (1400W, ODQ e ZnPPiX), nos respectivos grupos. Uma vez isolados, estes neutrófilos foram desafiados com uma concentração padrão de quimiotático (KC), este é semelhante à interleucina-8, responsável pela quimiotaxia de neutrófilos nesses animais onde podiam ultrapassar uma membrana neutrófilo-permeável indo ao encontro do estímulo quimiotático.

Como resultado inicial, tivemos que os animais pré-condicionados não migraram em direção ao estímulo do KC significativamente diferente do grupo controle. Pode-se inferir que os neutrófilos de animais pré-condicionados apresentam alguma alteração estrutural que impossibilita a adequada migração celular destes para o foco quimiotático. Quando submeteu-se os grupos previamente tratados com inibidores de iNOS, HO-1 e Guanilato Ciclase solúvel tivemos os resultados mais interessantes.

Os animais pré-condicionados apresentam alguma alteração nos seus neutrófilos, que tomamos como novo norte de investigação em busca de esclarecer as alterações celulares. Grupos têm mostrado diferentes alterações celulares mediadas pelo PCI a distância, como a expressão de receptores de cinina em neutrófilos humanos (SAXENA et al., 2009).

Os grupos de neutrófilos de animais pré-tratados tiveram suas migrações plenamente mantidas diferenciando-se em nada do grupo controle, o que nos leva a sugerir que as alterações estruturais dessas células não só são mediadas pelo pré-condicionamento isquêmico, mas a produção de NO e CO são fundamentais para que tais alterações se apresentem nestas células, sob um mecanismo dependente de energia na forma de GDP.



ESQUEMA 2- Proposição do efeito inibitório do pré-condicionamento isquêmico sobre a migração de neutrófilos. Inibição de proteínas de adesão (ICAM-1) e inibição direta da ativação de neutrófilos, com isso inibição da adesão celular

Fonte: Adaptado de TAPURIA N et al. Remote Ischemic Preconditioning: A novel protective method from Ischemia Reperfusion Injury – A review, **J Surg Res.** 150: 304-330, 2008

Na busca de um maior entendimento, foi realizada a dosagem da expressão de GRK2 por imunofluorescência com microscopia confocal. A GRK2 é uma proteína quinase ligada ao receptor de proteína G e tem como função fosforilar os resíduos de GPCRs ativados que se projetam intracelularmente. E estes GPCRs serão os responsáveis pela sinalização intracelular com a fosforilação da proteína G desencadeando inúmeras vias de sinalização intracelular.

A variação de expressão de GRK2 pode indicar a ativação ou internalização de determinados receptores transmembrana. Sabe-se que um dos principais receptores de interleucinas quimioatratadoras de neutrófilos é o CXCR2, e este é dependente de GRK2 numa relação inversa.

Quanto maior a expressão de GRK2, menor será a expressão de CXCR2 na membrana celular, pois a atividade dessa quinase leva a uma internalização do receptor em questão.

Deste modo, quando foi realizada a mensuração da expressão de GRK2 nos neutrófilos, pode-se avaliar indiretamente a expressão de receptores de quimiotáticos dependentes de GRK2 (PENELA et al., 2003).

Observamos nos resultados a diminuição importante da expressão de GRK2 no grupo pré-condicionado, contrastando significativamente com o grupo controle e os grupos pré-tratados previamente ao PCI com inibidores de iNOS, HO-1 e GCs.

A partir desses resultados, é sugerido que o PCI a distância leva a um aumento da expressão de GRK2, indicando uma diminuição da expressão de CXCR2 no grupo pré-condicionado.

Houve a manutenção dos níveis de GRK2 nos grupos pré-tratados semelhante ao grupo controle, esse dado sugere que o pré-tratamento com os inibidores previniu a atividade do PCI na sinalização intracelular pela GRK2, não interferindo nos níveis de CXCR2 expressos na membrana celular, assim viabilizando a manutenção da migração dos neutrófilos, já que estes seriam capazes de reconhecer o estímulo quimiotático ativado no momento de uma dada resposta inflamatória (ARRAES; FREITAS, 2006; RIOS-SANTOS et al., 2010).

Tal suposto mecanismo explicaria a manutenção da migração celular por parte dos neutrófilos dos grupos experimentais pré-tratados com os inibidores de NO, CO assim como GCs. Foi constatado que em animais utilizando modelo de sepse, ocorria importante falha na migração relacionada exatamente com a produção de

NO e aquele era revertida no uso do inibidor específico para NO (BENJAMIM; SILVA, 2000; 2002; CROSARA-ALBERTO; DARINI, 2002).

Seguindo o raciocínio proposto, foi avaliada a expressão de CXCR2 nos animais controle e pré-condicionados, assim como nos animais dos grupos pré-tratados com aqueles inibidores. Foi constatada uma diminuição significativa da expressão de CXCR2 no grupo de animais pré-condicionados em relação ao grupo de animais controle.

Já foi visto em outras condições como na sepse letal que a expressão desse receptor também está significativamente diminuída, demonstrando a importância da perpetuação e do agravamento da condição mórbida quando tal receptor está inibido (CUMMINGS et al., 1999; DAL-SECCO et al., 2008; ZHANG, 2001).

A importância do receptor CXCR2 também foi bem caracterizada em modelo de artrite inflamatória em animais onde foi utilizado um anticorpo anti-CXCR2/CXCR1. Como importante resultado, obteve-se significativa redução da lesão inflamatória nos animais pré-tratados com os anticorpos, com importante diminuição de neutrófilos para o foco da inflamação. Demonstrando com clareza a indispensável participação desse receptor na mediação da lesão e migração celular (MIN et al., 2010).

A expressão do receptor de interleucinas CXCR pode ser internalizado depois de algum tempo de expressão na membrana celular, sendo assim questiona-se a possibilidade de internalização desse receptor antes do registro de sua expressão na citometria de fluxo. Sabe-se que a expressão de GRK2 e de CXCR2 acontecem em tempos diferentes, com isso, é possível ter achados não compatíveis por questões metodológicas, ainda que a dinâmica molecular entre mediadores estivesse ajustada.

Diante de importantes resultados na literatura da significância atual da via da Heme-oxigenase para a migração leucocitária, foi também analisado os níveis da concentração de bilirrubina em animais submetidos ao PCI e em animais pré-tratados previamente ao PCI com os inibidores já vastamente explorados nessa pesquisa.

A bilirrubina é um produto final da via metabólica do Heme. O catabolismo do Heme tem lugar principalmente em células macrofágicas do baço, fígado e medula óssea e inicia-se com a ação catalítica do sistema microssomático do Heme; este

sistema catalisa a rotura entre os anéis pirrólicos I e II do heme, formando-se biliverdina ($\text{heme} + 3 \text{O}_2 + 3 \text{NADPH} \rightarrow \text{biliverdina} + \text{CO} + 3 \text{NADP}^+ + 3\text{H}_2\text{O} + \text{Fe}^{3+}$).

A biliverdina é, por sua vez, reduzida a bilirrubina; esta reação é dependente do NADPH e é catalisada pela redutase da biliverdina ($\text{biliverdina} + \text{NADPH} \rightarrow \text{bilirrubina} + \text{NADP}^+$). Fizemos um time course os níveis de bilirrubina no sangue de animais pré-condicionados e obtivemos o seguinte resultado:

Houve uma importante queda dos níveis de bilirrubina nos animais pré-condicionados imediatamente ao evento de indução isquêmica, posteriormente as concentrações de bilirrubina seguiam uma curva ascendente até os níveis de controle após 3 horas da indução do PCI.

Tal comportamento vem ao encontro do estudo realizado por Lai et al. em 2006, onde é demonstrado o efeito protetor da heme-oxigenase-1 em fígados de camundongos do pré-condicionamento isquêmico a distância.

Bioquimicamente, a redução dos níveis de bilirrubina na vigência da indução isquêmica abaixo dos níveis de controle nos sugere a possibilidade de uma desestabilização de um sistema em equilíbrio que é o metabolismo do Heme.

Com a ativação do PCI a distância, houve uma regulação positiva de heme-oxigenase levando a um aumento da metabolização do Heme em biliverdina e por conseguinte em bilirrubina, isso explica a queda importante de bilirrubina basal na isquemia, pois há um deslocamento de equilíbrio para a esquerda devido a um maior consumo de substratos da reação.

Quando os animais eram pré-tratados com inibidores de heme-oxigenase, houve um abrandamento da atividade dessa enzima levando a uma recuperação mais rápida dos níveis de bilirrubina nos grupos pré-tratados em relação ao grupo simplesmente pré-condicionado.

Corroborando dados da literatura (LAI et. al; 2006) que mostram a via da hemeoxigenase foi ativada via pré-condicionamento isquêmico na pata do animal levando inclusive a uma melhora na função hepática do animal no qual o uso de ZnPPIX aboliu o efeito benéfico.

Os grupos pré-tratados com inibidores de iNOS e de Guanilato ciclase tiveram o mesmo comportamento do primeiro grupo citado de pré-tratamento, reforçando a idéia da intrínseca relação de dependência entre CO, NO e GCs.

Em suma podemos concluir deste trabalho que o efeito inibitório do pré-condicionamento isquêmico sobre a migração de neutrófilos em sítio distante

depende da liberação de CO e NO, respectivamente via heme-oxigenase e óxido nítrico sintase induzível, modulando a expressão de ICAM-1, CD11b e GRK2.

Além do mais, pode-se apreender que o PCI a distância leva a inibição da expressão dos receptores CXCR2, responsáveis em grande parte pela quimiotaxia dos neutrófilos para uma resposta inflamatória.

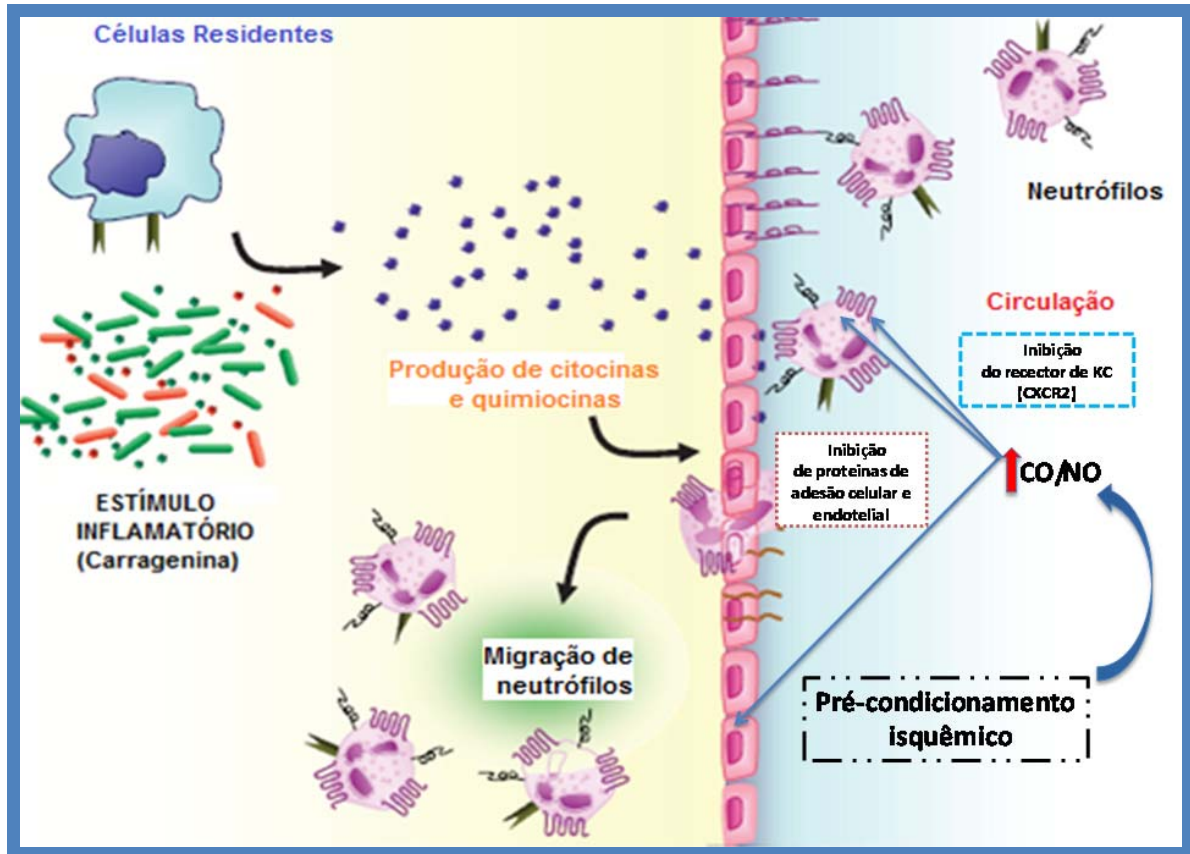


FIGURA 32- Efeito inibitório do PCI a distância sobre a migração de neutrófilos para o sítio inflamatório via receptores em neutrófilos e proteínas de adesão em resposta a estímulo quimiotático.

Fonte: Adaptado de ALVES-FILHO JC, FREITAS A, SPILLER F, SOUTO FO, CUNHA FQ: The role of Neutrophils in severe sepsis. *Shock*, Vol 30, Supplement 1, pp. 3-9, 2008.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

A partir dos dados aqui apresentados pode-se concluir que:

No efeito inibitório do pré-condicionamento isquêmico sobre a migração de neutrófilos em sítio distante, há envolvimento do NO via ativação de iNOS e do CO via heme-oxigenase-1, os quais parecem agir modulando a expressão de ICAM-1, CD11b, GRK2 e CXCR2.

7 REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

ABRAHAM, NG; LIN, JH; MITRIONE SM, Schwartzman ML, Levere RD, Shibahara S: Expression of heme oxygenase gene in rat and human liver. **Biochem Biophys Res Commun** 150:717Y722, 1988.

Addison P, Neligan P, Forrest C, Zhong A, Perri L, Pang CY Acute adenosine treatment is effective in augmentation of ischemic tolerance in muscle flaps in the pig: an update. **Plast Reconstr Surg** 111(2):842–845, 2003.

Addison PD, Neligan PC, Ashrafpour H, Khan A, Zhong A, Moses M, Forrest CR, Pang CY Noninvasive remote ischemic preconditioning for global protection of skeletal muscle against infarction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 285(4):H1435–H1443, 2003.

Ahluwalia, P. Foster, R.S. Scotland, P.G. McLean, A. Mathur, M. Perretti, S. Moncada, A.J. Hobbs, 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, 2004.

Alcaraz MJ, Fernandez P, Guillen MI: Anti-inflammatory actions of the heme oxygenase-1 pathway. **Curr Pharm Des** 9:2541Y2551, 2003.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG: Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem J** 357:593Y615, 2001.

alenti A, Ianaro A, Maffia P, Sautebin L, Di Rosa M: Nitric oxide inhibits leucocyte migration in carrageenin-induced rat pleurisy. **Inflamm Res** 49: 411Y417, 2000.

Alexander WS, Hilton DJ. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. **Annu Rev Immunol.**; 22:503-29, 2004

Alves-Filho JC, Benjamim C, Tavares-Murta BM, Cunha FQ: Failure of neutrophil migration toward infectious focus in severe sepsis: a critical event for the outcome of this syndrome. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 100(suppl 1): 223Y226, 2005.

ALVES-FILHO JC, FREITAS A, SPILLER F, SOUTO FO, CUNHA FQ: The role of Neutrophils in severe sepsis. **Shock**, Vol 30, Supplement 1, pp. 3-9, 2008.

Alves-Filho JC, Tavares-Murta BM, Barja-Fidalgo C, Benjamim CF, Basile-Filho A, Arraes SM, Cunha FQ: Neutrophil function in severe sepsis. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets** 6:151Y158, 2006.

Anderson DC, Springer TA: Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1, and p150,95 glycoproteins. **Annu Rev Med** 38:175Y194, 1987.

ANTELMÍ, I.; KALIL, R.; LOPES, N. H.; FORLENZA, L. M.; BARDUCO, M. S.; PIVA DE ALBUQUERQUE, C.; TRANCHES, B.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. Evaluation of

ischemic preconditioning on collateral circulation, ventricular function and clinical outcome in acute myocardial infarction. **Arq.Bras.Cardiol.**, v. 66, n. 1, p.11-14, 1996.

Arai M, Tejima K, Ikeda H et al Ischemic preconditioning in liver pathophysiology. **J Gastroenterol Hepatol** 22(Suppl 1):S65–S67, 2007.

Arraes SM, Freitas MS, da Silva SV, de Paula Neto HA, Alves-Filho JC, Auxiliadora Martins M, Basile-Filho A, Tavares-Murta BM, Barja-Fidalgo C, Cunha FQ: Impaired neutrophil chemotaxis in sepsis associates with GRK expression and inhibition of actin assembly and tyrosine phosphorylation. **Blood** 108:2906Y2913, 2006.

Baggiolini M: Chemokines and leukocyte traffic. **Nature** 392:565Y568, 1998.

Benjamim CF, Ferreira SH, Cunha FQ: Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. **J Infect Dis** 182:214Y223, 2000.

Benjamim CF, Silva JS, Fortes ZB, Oliveira MA, Ferreira SH, Cunha FQ: Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. **Infect Immun** 70:3602Y3610, 2002.

Bokoch GM: Chemoattractant signaling and leukocyte activation. **Blood** 86:1649Y1660, 1995.

Brombacher F, Kastelein RA, Alber G. Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses. **Trends Immunol.**; 24(4):207-12. 2003

C.W. Smith, Endothelial adhesion molecules and their role in inflammation, **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 71 76–87, 1993.

Carpagnano GE, Spanevello A, Sabato R, Depalo A, Palladino GP, Bergantino L, Foschino Barbaro MP. Systemic and airway inflammation in sleep apnea and obesity: the role of ICAM-1 and IL-8. **Transl Res.** Jan; 155(1):35-43. 2010

Carrigan SO, Pink DB, Stadnyk AW. Neutrophil transepithelial migration in response to the chemoattractant fMLP but not C5a is phospholipase D-dependent and related to the use of CD11b/CD18. **J Leukoc Biol.** Dec; 82(6):1575-84. 2007

Carroll CM, Carroll SM, Overgoor ML, Tobin G, Barker JH Acute ischemic preconditioning of skeletal muscle prior to flap elevation augments muscle flap survival. **Plast Reconstr Surg** 100(1):58–65, 1997.

Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. **N Engl J Med.** 9; 354(6):610-2, 2006

Crosara-Alberto DP, Darini AL, Inoue RY, Silva JS, Ferreira SH, Cunha FQ: Involvement of NO in the failure of neutrophil migration in sepsis induced by *Staphylococcus aureus*. **Br J Pharmacol** 136:645Y658, 2002.

Cummings CJ, Martin TR, Frevert CW, Quan JM, Wong VA, Mongovin SM, Hagen TR, Steinberg KP, Goodman RB: Expression and function of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 in sepsis. **J Immunol** 162:2341Y2346, 1999.

D. Dal Secco, J.A. Paron, S.H.P. Oliveira, S.H. Ferreira, J.S. Silva, F.Q. Cunha, Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis, *Nitric Oxide*: **Biol. Chem.** 9 153–164, 2003.

D.A. Steeber, M.L.K. Tang, N.E. Green, X.-Q. Zhang, J.E. Sloane, T.F. Tedder, Leukocyte entry into sites of inflammation requires overlapping interactions between the L-selectin and ICAM-1 pathways, **J. Immunol.** 163 2176–2186, 1999.

D.M. Guidot, B.M. Hybertson, R.P. Kitlowski, J.E. Repine, Inhaled NO prevents IL-1-induced neutrophil accumulation and associated acute edema in isolated rat lungs, **Am. J. Physiol.** 271 L225–L229, 1996.

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** 15:77Y86, 2006.

Dal Secco D, 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** 9:153Y164, 2003.

Dal-Secco D, Cunha TM, Freitas A, Alves-Filho JC, Souto FO, Fukada SY, Grespan R, Alencar NM, Neto AF, Rossi MA, Ferreira SH, Hothersall JS, Cunha FQ. Hydrogen sulfide augments neutrophil migration through enhancement of adhesion molecule expression and prevention of CXCR2 internalization: role of ATP-sensitive potassium channels. **J Immunol.** Sep 15; 181(6):4287-98, 2008.

Dong HL, Zhang Y, Su BX, Zhu ZH, Gu QH, Sang HF, Xiong L. Limb remote ischemic preconditioning protects the spinal cord from ischemia-reperfusion injury: a newly identified nonneuronal but reactive oxygen species-dependent pathway. **Anesthesiology.** Apr; 112(4):881-91, 2010.

E.T. Crockett, C. Remelius, K. Hess, H. Al-Ghawi, Gene deletion of P-Selectin and ICAM-1 does not inhibit neutrophil infiltration into peritoneal cavity following cecal ligation-puncture, **BMC Clin. Pathol.** 4 1–13., 2004.

F.W. Luscinskas, M.I. Cybulsky, J.-M. Kiely, C.S. Peckins, V.M. Davis, M.A. Gimbrone Jr., Cytokine-activated human endothelial monolayers support enhanced neutrophil transmigration via a mechanism involving both endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1, **J. Immunol.** 146 1617–1625, 1991.

Fagerholm SC, Varis M, Stefanidakis M, Hilden TJ, Gahmberg CG. Alpha-Chain phosphorylation of the human leukocyte CD11b/CD18 (Mac-1) integrin is pivotal for integrin activation to bind ICAMs and leukocyte extravasation. **Blood.** Nov 15; 108(10):3379-86, 2006.

Fernández L, Heredia N, Grande L, Gómez G, Rimola A, Marco A, Gelpí E, Roselló-Catafau J, Peralta C Preconditioning protects liver and lung damage in rat liver transplantation: role of xanthine/xanthine oxidase. **Hepatology** 36(3):562–572, 2002.

FRASSETTO, S. S.; SCHETINGER, M. R.; WEBBER, A.; SARKIS, J. J.; NETTO, C. A. Ischemic preconditioning reduces peripheral oxidative damage associated with brain ischemia in rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 32, n. 10, p. 1295-1302, 1999.

Freitas A, Alves-Filho JC, Secco DD, Neto AF, Ferreira SH, Barja-Fidalgo C, Cunha FQ: Heme oxygenase/carbon monoxide-biliverdin pathway down regulates neutrophil rolling, adhesion and migration in acute inflammation. **Br J Pharmacol** 149:345Y354, 2006.

Ghosh S, Galiñanes M Protection of the human heart with ischemic preconditioning during cardiac surgery: role of cardiopulmonary bypass. **J Thorac Cardiovasc Surg** 126(1):133–142, 2003.

Hechtman DH, Cybulsky MI, Fuchs HJ, Baker JB, Gimbrone MA Jr: Intravascular IL-8. Inhibitor of polymorphonuclear leukocyte accumulation at sites of acute inflammation. **J Immunol** 147:883Y892, 1991.

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** 11:955Y964, 1997.

Huttenlocher A, Sandborg RR, Horwitz AF: Adhesion in cell migration. **Curr Opin Cell Biol** 7:697Y706, 1995.

Ialenti, A. Ianaro, P. MaYa, L. Sautebin, M. Di Rosa, Nitric oxide inhibits leukocyte migration in carrageenan-induced rat pleurisy. **Inflammation Res.** 49 411–417, 2000.

Imtiyaz HZ, Simon MC. Hypoxia-Inducible Factors as Essential Regulators of Inflammation. **Curr Top Microbiol Immunol**. Jun 2, 2010.

Jannat RA, Dembo M, Hammer DA. Neutrophil adhesion and chemotaxis depend on substrate mechanics. **J Phys Condens Matter**. May 19; 22(19):, 2010.

K. Lelamali, W. Wand, P. Gengaro, C. Edelstein, R.W. Schrier, Effects of nitric oxide and peroxynitrite on endotoxin-induced leukocyte adhesion to endothelium, *J. Cell. Physiol.* 188 337–342, 2001.

K.E. Driscoll, D.G. Hassenbein, B.W. Howard, R.J. Isfort, D. Cody, M.H. Tindal, M. Suchanek, J.M. Carter, Cloning, expression, and functional characterization of rat MIP-2: a neutrophil chemoattractant and epithelial cell mitogen, **J. Leukoc. Biol.** 58 359–364, 1995.

Kansas GS: Selectins and their ligands: current concepts and controversies. **Blood** 88:3259Y3287, 1996.

Katanaev VL: Signal transduction in neutrophil chemotaxis. **Biochemistry** (Mosc) 66:351Y368, 2001.

Kiumehr S, Demehri S, Rabbani S, Amanpour S, Mohagheghi MA, Dehpour AR Preconditioning of the rat random pattern skin flap: modulation by opioids. **Br J Plast Surg** 58(1):58–64, 2005.

Kubes P, Suzuki M, Granger DN: Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proc Natl Acad Sci U S A** 88:4651Y4655, 1991.

Küntscher MV, Kastell T, Altmann J, Menke H, Gebhard MM, Germann G Acute remote ischemic preconditioning II: the role of nitric oxide. **Microsurgery** 22(6):227–231, 2002.

Küntscher MV, Kastell T, Sauerbier M, Nobiling R, Gebhard MM, Germann G Acute remote ischemic preconditioning on rat cremasteric muscle flap model. **Microsurgery** 22(6):221–226, 2002.

Küntscher MV, Schirmbeck EU, Menke H, Klar E, Gebhard MM, Germann G (2002) Ischemic preconditioning by brief extremity **Eur J Plast Surg** 33:147–152 151 ischemia before flap ischemia in a rat model. **Plast Reconstr Surg** 109(7):2398–2404, 2010.

L. Yang, R.M. Froio, T.E. Sciuto, A.M. Dvorak, R. Alon, F.W. Lusinskas, ICAM-1 regulates neutrophil migration and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under Xow, **Blood** 106 584–592, 2005.

Lai IR, Chang KJ, Chen CF, Transient limb ischemia induces remote preconditioning in liver among rats: The protective role of heme oxygenase-1. **Transplantation**; 81:1311. 2006

Laudanna C, Kim JY, Constantin G, Butcher E: Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. **Immunol Rev** 186:37Y46, 2002.

Lefler DJ, Jones SP, Girod WG, Baines A, Grisham MB, Cockrell AS, Huang PL, Scalia R: Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase deficient mice. **Am J Physiol** 276:H1943YH1950, 1999.

Lefler, A.M.; Lefler, D.J. The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion, **CardiovascularRes.** 32 743–751, 1996.

Lekstrom-Himes JA, Gallin JI: Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. **N Engl J Med** 343:1703Y1714, 2000.

Lentsch AB, Ward PA. Regulation of inflammatory vascular damage. **J Pathol.**; 190(3):343-8., 2000

Lim SY, Yellon DM, Hausenloy DJ. The neural and humoral pathways in remote limb ischemic preconditioning. **Basic Res Cardiol.** May 7, 2010.

Lloris-Carsi JM, Cejalvo D, Toledo-Pereyra LH, Calvo MA, Suzuki S Preconditioning: effect upon lesion modulation in warm liver ischemia. **Transplant Proc** 25(6):3303–3304, 1993.

M. Spiecker, H. Darius, K. Kaboth, F. Hubner, J.K. Liao, Differential regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by nitric oxide donors and antioxidants, **J. Leukoc. Biol.** 63 732–739, 1998.

M.B. Furie, M.C.A. Tancinco, C.W. Smith, Monoclonal antibodies to leukocyte integrins CD11a/CD18 and CD11b/CD18 or intercellular adhesion molecule-1 inhibit chemoattractant-stimulated neutrophil transendothelial migration *in vitro*, **Blood** 78 2089–2097, 1991.

M.J. Hickey, K.A. Sharkey, E.G. Sihota, P.H. Reinhardt, J.D. Macmicking, C. Nathan, P. Kubes, Inducible nitric oxide synthase-deficient mice have enhanced leukocyte–endothelium interactions in endotoxemia, **FASEB J.** 11 955–964., 1997.

M.J. Hickey, P. Kubes, Role of nitric oxide in regulation of leukocyte–endothelial cell interactions, **Exp. Physiol.** 82 339–348, 1997.

M.J. Hickey, Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of leukocyte recruitment, **Clin. Sci.** 100 1–12, 2001.

M.J. Paul-Clark, D.W. Gilroy, D. Willis, D.A. Willoughby, A. Tomlinson, Nitric oxide synthase inhibitors have opposite effects on acute inflammation depending on their route of administration, **J. Immunol.** 2 1169–1177, 2001.

M.N. Ajuebor, L. Virág, R.J. Flower, M. Perretti, C. Szabó, Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of neutrophil migration in zymosan-induced inflammation, **Immunol.** 95 625–630, 1998.

M.S. Zadeh, J.P. Kolb, D. Geromin, R. D’Anna, A. Boulmerka, A. Marconi, B. Dugas, C. Marsac, P. D’Alessio, Regulation of ICAM-1/CD54 expression on human endothelial cells by hydrogen peroxide involves inducible NO synthase, **J. Leukoc. Biol.** 67 327–334, 2000.

Maines MD: The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 37:517–554, 1997.

Malech HL, Gallin JI: Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases. **N Engl J Med** 317:687–694, 1987.

Mallick IH, Winslet MC, Seifalian AM. Ischemic preconditioning of small bowel mitigates the late phase of reperfusion injury: heme oxygenase mediates cytoprotection. **Am J Surg**; 199(2):223–31. 2010

Matsumura H, Yoshizawa N, Vedder NB, Watanabe K Preconditioning of the distal portion of a rat random-pattern skin flap. **Br J Plast Surg** 54(1):58–61, 2001.

McFarlane RM, De Young G, Henry R The design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and its prevention. **Plast Reconstr Surg** 35:177–182, 1965.

Min SH, Wang Y, Gonsiorek W, Anilkumar G, Kozlowski J, Lundell D, Fine JS, Grant EP. Pharmacological targeting reveals distinct roles for CXCR2/CXCR1 and CCR2 in a mouse model of arthritis. **Biochem Biophys Res Commun**. Jan 1; 391(1):1080-6, 2010.

Montecucco F, Steffens S, Burger F, Da Costa A, Bianchi G, Bertolotto M, Mach F, Dallegri F, Ottonello L. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) induces integrin CD11b/CD18 (Mac-1) up-regulation and migration to the CC chemokine CCL3 (MIP-1alpha) on human neutrophils through defined signalling pathways. **Cell Signal**. Mar; 20(3):557-68, 2008.

Moreno SE, Alves-Filho JC, Bertozzi 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** 148:1060-1066, 2006.

Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P: Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. **Trends Immunol** 25:75Y84, 2004.

Mounsey RA, Pang CY, Forrest C Preconditioning: a new technique for improved muscle flap survival. **Otolaryngol Head Neck Surg** 107(4):549–552, 1992.

Muller WA: Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. **Trends Immunol** 24:327Y334, 2003.

Mulligan MS, Miyasaka M, Tamatani T, Jones ML, Ward PA: Requirements for L-selectin in neutrophil-mediated lung injury in rats. **J Immunol** 152:832Y840, 1994.

Murry CE, Jennings RB, Reimer KA Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. **Circulation** 74:1124–1136, 1986.

Naughton P, Hoque M, Green CJ, Foresti R, Motterlini R: Interaction of heme with nitroxyl or nitric oxide amplifies heme oxygenase-1 induction: involvement of the transcription factor Nrf2. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)** 48:885Y894, 2002.

Niggli V: Signaling to migration in neutrophils: importance of localized pathways. **Int J Biochem Cell Biol** 35:1619Y1638, 2003.

O. Kosonen, H. Kankaanranta, U. Malo-Ranta, E. Moilanen, Nitric oxide-releasing compounds inhibit neutrophil adhesion to endothelial cells, **Eur. J. Pharmacol.** 382 111–117, 1999.

Ozbalkan Z, Aslar AK, Yildiz Y, Aksaray S: Investigation of the course of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines after burn sepsis. **Int J Clin Pract** 58:125Y129, 2004.

P. Kubes, M. Suzuki, D.N. Granger, Nitric oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 88 4651–4655., 1991.

Penela P, Ribas C, Mayor F Jr: Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases. *Cell Signal* 15:973-981, 2003.

Peralta C, Closa D, Hotter G, Gelpí E, Prats N, Roselló-Catafau J Liver ischemic preconditioning is mediated by the inhibitory action of nitric oxide on endothelin. *Biochem Biophys Res Commun* 229(1):264-270, 1996.

Peralta C, Fernández L, Panés J, Prats N, Sans M, Piqué JM, Gelpí E, Roselló-Catafau J Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P-selectin up-regulation in the rat. *Hepatology* 33(1):100-113, 2001.

Pereira MA, Sannomiya P, Leme JG: Inhibition of leukocyte chemotaxis by factor in alloxan-induced diabetic rat plasma. *Diabetes* 36:1307-1314, 1987.

Powner DJ, Pettitt TR, Anderson R, Nash GB, Wakelam MJ. Stable adhesion and migration of human neutrophils requires phospholipase D-mediated activation of the integrin CD11b/CD18. *Mol Immunol*. May; 44(12):3211-21, 2007.

R. De Caterina, P. Libby, H.-B. Peng, V.J. Thannickal, T.B. Rajavashisth, M.A. Gimbrone Jr., W.S. Shin, J.K. Liao, 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, 1995.

R.G. Knowles, S. Moncada, Nitric oxide synthases in mammals, *Biochem.J.* 298:249-258, 1994.

Restifo RJ, Thomson JG The preconditioned TRAM flap: preliminary clinical experience. *Ann Plast Surg* 41(4):343-347, 1998.

Rios-Santos F, Alves-Filho JC, Souto FO, Spiller F, Freitas A, Lotufo CM, Soares MB, Dos Santos RR, Teixeira MM, de Queiroz Cunha F: Downregulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 175: 490-497, 2007.

S. Cuzzocrea, E. Mazzon, G. Calabro, L. Dugo, A. De Sarro, F.A.J. Van de Loo, A.P. Caputi, Inducible nitric oxide synthase-knockout mice exhibit resistance to pleurisy and lung injury caused by carrageenan, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162:1859-1866, 2000.

S. Moncada, R.M.J. Palmer, E.A. Higgs, Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology, *Pharmacol. Rev.* 43:109-142., 1991.

S.W. Lee, Y.S. Hong, C.M. Chun, J.D. Moon, S.J. Kim, I.C. Jung, Y.H. Yoon, B.A. Lee, S.W. Moon, S.H. Choi, C.K. Moon, Anti-inflammatory effects of IL-4 and IL-10 on human polymorphonuclear leukocytes, *J. Korean Med. Sci.* 17, 7-14. 2002

Saito T, Komiyama T, Aramoto H, Miyata T, Shigematsu H Ischemic preconditioning improves oxygenation of exercising muscle *in vivo*. *J Surg Res* 120(1):111-118, 2004.

Salehipour M, Khezri A, Monabbati A et al Ischemic preconditioning protects the dog kidney from ischemia-reperfusion injury. **Urol Int** 79(4):328–331, 2007.

Saxena P, Shaw OM, Misso NL, Naran A, Shehatha J, Newman MA, d'Udekem Y, Thompson Remote Ischemic Preconditioning Stimulus Decreases the Expression of Kinin Receptors in Human Neutrophils. **J Surg Res**. Nov 29, 2009.

Simon SI, Green CE: Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. **Annu Rev Biomed Eng** 7:151-185, 2005.

Smith CW, Marlin SD, Rothlein R, Toman C, Anderson DC: Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion moleculeY1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils *in vitro*. **J Clin Invest** 83:2008Y2017, 1989.

Souza Filho MV, Loiola RT, Rocha EL, Simão AF, Gomes AS,Souza MH, Ribeiro RA Hind limb ischemic preconditioning induces an anti-inflammatory response by remote organs in rats. **Braz J Med Biol Res** 42(10):921–929, 2009.

Souza Filho MV, Loiola RT, Rocha EL, Simão AF, Gomes AS,Souza MH, Ribeiro RA,Remote Ischemic Preconditioning improves the survival of rat random-pattern skin flaps. **Eur J Plast Surg** 33:147-152, 2010.

Speechly-Dick, M. E.; Grover, G. J.; Yellon, D. M. Does ischemic preconditioning in the human involve protein kinase C and the ATP-dependent K⁺ channel? Studies of contractile function after simulated ischemia in an atrial *in vitro* model.**Circ. Res.**, v. 77, p. 1030-1035, 1995.

Spiller F, Orrico MI, Nascimento DC, Czaikoski PG, Souto FO, Alves-Filho JC, Freitas A, Carlos D, Montenegro MF, Neto AF, Ferreira SH, Rossi MA, Hothersall JS, Assrey J, Cunha FQ.Hydrogen Sulfide Improves Neutrophil Migration and Survival in Sepsis via K⁺ATP Channel Activation. **Am J Respir Crit Care Med.**, 2010.

T. Liberek, M. Chmielewski, M. Lichodziejewska-Niemierko, K.Lewandowski, B. Rutkowski, Transmigration of blood leukocytes into the peritoneal cavity is related to the upregulation of ICAM-1 (CD54) and Mac-1 (CD11b/CD18) adhesion molecules, **Perit. Dial.Int.** 24 139–146, 2004.

T.W. Gauthier, K.L. Davenpeck, A.M. Lefer, Nitric oxide attenuates leukocyte–endothelial interaction via P-selectin in splanchnic ischemia-reperfusion, **Am. J. Physiol.** 267 G562–G568, 1994.

Tamion F, Richard V, Renet S, Thuillez C, Intestinal preconditioning prevents inflammatory response by modulating heme oxygenase-1 expression in endotoxic shock model, **American J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.** 293:1308-1314, 2007.

Tapuria N, Kumar Y, Habib MM, Remote Ischemic Preconditioning: A novel protective method from Ischemia Reperfusion Injury – A review, **J Surg Res.** 150: 304-330, 2008.

Tavares-Murta BM, Machado JS, Ferreira SH, Cunha FQ: Nitric oxide mediates the inhibition of neutrophil migration induced by systemic administration of LPS. **Inflammation** 25:247Y253, 2001.

Tavares-Murta BM, Zapparoli M, Ferreira RB, Silva-Vergara ML, Oliveira CH, Murta EF, Ferreira SH, Cunha FQ: Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients. **Crit Care Med** 30:1056Y1061, 2002.

Thielmann M, Kottenberg E, Boengler K, Raffelsieper C, Neuhaeuser M, Peters J, Jakob H, Heusch G. Remote ischemic preconditioning reduces myocardial injury after coronary artery bypass surgery with crystalloid cardioplegic arrest. **Basic Res Cardiol.** 2010.

Thomazzi SM, Souza MH, Melo-Filho AA, Hewlett EL, Lima AA, Ribeiro RA. Pertussis toxin from *Bordetella pertussis* blocks neutrophil migration and neutrophil-dependent edema in response to inflammation. **Braz J Med Biol Res.** 28(1):120-4. 1995

V.E. Armstead, A.G. Minchenco, R.A. Schuhl, R. Hayward, T.O.Nossuli, A.M. Lefer, Regulation of P-selectin expression in human endothelial cells by nitric oxide, **Am. J. Physiol.** 273,H740–H746, 1997.

Vicente AM, Guillen MI, Alcaraz MJ: Modulation of haem oxygenaseY1 expression by nitric oxide and leukotrienes in zymosan-activated macrophages. **Br J Pharmacol** 133:920-926, 2001.

Vicente AM, Guillen MI, Habib A, Alcaraz MJ: Beneficial effects of hemeoxygenaseY1 up-regulation in the development of experimental inflammation induced by zymosan. **J Pharmacol Exp Ther** 307:1030-1037, 2003.

W.K. Alderton, C.E. Cooper, R.G. Knowles, Nitric oxide synthases:structure, function and inhibition, **Biochem. J.** 357, 593–615. 2001.

W.L. BiZ, E.E. Moore, F.A. Moore, C. Barnett, Nitric oxide reduces endothelial expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, **J. Surg. Res.** 63:328–332, 1996.

Wang F, Birch SE, He R, Tawadros P, Szaszi K, Kapus A, Rotstein OD. Remote ischemic preconditioning by hindlimb occlusion prevents liver ischemic/reperfusion injury: the role of High Mobility Group-Box 1. **Ann Surg.** Feb; 251(2):292-9, 2010.

Wang WZ, Anderson G, Firrell JC, Tsai TM.Ischemic preconditioning versus intermittent reperfusion to improve blood flow to a vascular isolated skeletal muscle flap of rats.**J Trauma** 45(5):953–959, 1998.

Willis D, Moore AR, Frederick R, Willoughby DA: Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. **Nat Med** 2:87-90,1996.

Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases.**Rheumatology (Oxford).** 2010

X.W. Zhang, Q. Liu, Y. Wang, H. Thorlacius, CXC chemokines, MIP-2 and KC, induce P-selectin-dependent neutrophil rolling and extravascular migration *in vivo*, **Br. J. Pharmacol.** 133:413–421, 2001.

Y. Sato, K.R. Walley, M.E. Klut, D. English, Y. D'Yachkova, J.C.Hogg, S.F. van Eeden, Nitric oxide reduces the sequestration of polymorphonuclear leukocytes in lung by changing deformability and CD18 expression, **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**159 : 1469–1476, 1999.

Yin DP, Sankary HN, Chong AS, Ma LL, Shen J, Foster P, Williams JW Protective effect of ischemic preconditioning on liver preservation-reperfusion injury in rats.**Transplantation** 66(2):152–157, 1998.

Zahir KS, Syed SA, Zink JR, Restifo RJ, Thomson JG Ischemic preconditioning improves the survival of skin and myocutaneous flaps in a rat model. **Plast Reconstr Surg** 102 (1):140–150, discussion 151-2, 1998.

Zegdi R, Perrin D, Burdin M, Boiteau R, Tenailon A: Increased endogenous carbon monoxide production in severe sepsis. **Intensive Care Med** 28:793-796, 2002.

ZHANG, C.; ROSENBAUM, D. M.; SHAIKH, A. R.; LI, Q.; ROSENBAUM, P. S.; PELHAN, D. J.; ROTH, S. Ischemic preconditioning attenuates apoptotic cell death in the rat retina. **Invest. Ophthalmol.Vis. Sci.**, v. 43, n. 9, p. 3059-3066, 2002.

ZHANG, F.; OSWALD, T.; HOLT, J.; GERZENSHTEIN, J.; LEI, M. P.; LINEAWEAVER, W. C. Regulation of inducible nitric oxide synthase in ischemic preconditioning of muscle flap in a rat model. **Ann. Plast. Surg.**, v. 52, n. 6, p. 609-613, 2004.