



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Amanda Regina da Fé

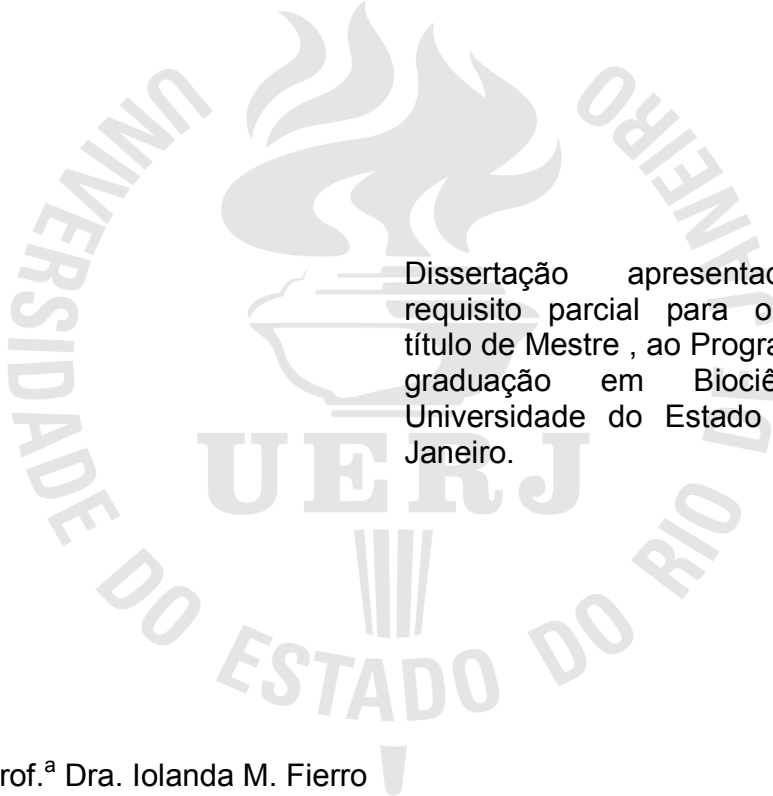
Modulação da ativação de monócitos por lipoxinas

Rio de Janeiro

2009

Amanda Regina da Fé

Modulação da ativação de monócitos por lipoxinas



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Iolanda M. Fierro

Rio de Janeiro

2009

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

F288 Fé, Amanda Regina da.
Modulação da ativação de monócitos por lipoxinas / Amanda Regina da Fé. - 2009.
54 f.

Orientadora: Iolanda Margherita Fierro.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Lipoxinas - Teses. 2. Monócitos - Teses. 3. Agentes antiinflamatórios - Teses. 4. Inflamação – aspectos imunológicos - Teses. I. Fierro, Iolanda Margherita. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 615.7396

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Amanda Regina da Fé

Modulação da ativação de monócitos por lipoxinas

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 05 de março de 2009.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Angela Corrêa de Freitas Almeida
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof^a. Dra. Claudia Farias Benjamim
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof^a. Dra. Angela Corrêa de Freitas Almeida
Universidade Federal de Sergipe

Rio de Janeiro

2009

Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e viver com ousadia. Pois o triunfo pertence a quem se atreve e a vida é muito bela para ser insignificante.

(Charles Chaplin)

Não importa o tamanho da montanha, ela não pode tapar o sol.

(Provérbio chinês)

Só sei que nada sei.

(Sócrates)

RESUMO

FÉ, Amanda Regina da. Modulação da ativação de monócitos por lipoxinas. 2009. 54 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

Lipoxinas (LXs) são metabólitos do ácido araquidônico com reconhecidas atividades antiinflamatórias e pró-resolução. Apesar do grande número de trabalhos publicados descrevendo o papel das LXs e seus análogos em leucócitos e outros tipos celulares envolvidos em doenças inflamatórias, pouco é sabido a respeito dos mecanismos de ação que desencadeiam estas respostas. Neste trabalho investigamos o papel do 15-epi-16-(*para*-flúor)-fenoxi-lipoxina A₄ (ATL-1), um análogo sintético da 15-epi-lipoxina A₄, sobre diversos processos de ativação de monócitos. Caracterizamos, pela primeira vez, o receptor da lipoxina A₄ (ALX) na linhagem monocítica U937, através da avaliação de sua expressão gênica e protéica e de sua funcionalidade analisando a ativação de ERK-2, o que torna esta célula uma ferramenta apta para estudo dos mecanismos de ação das LXs e seus análogos sobre os monócitos. Além disso, demonstramos que o ATL-1 aumenta a expressão da enzima heme oxigenase (HO) -1 em células U937 via ativação da p38 MAP quinase (MAPK) e diminui a secreção da *Monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), uma quimiocina envolvida com o recrutamento de monócitos para o foco inflamatório, em células U937 estimuladas com LPS. A inibição da secreção de MCP-1 foi revertida pela utilização do SB203580, sugerindo que este efeito é dependente da ativação da via p38 MAPK. O presente estudo elucidou alguns dos mecanismos envolvidos na ativação de monócitos pelas lipoxinas que podem levar a novas abordagens para o controle de diversas doenças nas quais o componente inflamatório é importante.

Palavras-chave: Lipoxinas. Monócitos. Heme-oxigenase.

ABSTRACT

Lipoxins (LXs) are arachidonic acid metabolites with well recognized anti-inflammatory and pro-resolution activities. Despite the large number of studies describing the role of LXs and their analogs in leukocytes and other cell types involved in inflammatory diseases, little is known about the mechanisms of action that trigger these responses. This work investigated the role of 15-epi-16-(*para*-fluoro)-phenoxy-lipoxin A₄ (ATL-1), a synthetic analog of 15-epi-lipoxin A₄ on various processes of monocyte activation. We characterized, for the first time, the lipoxin A₄ receptor (ALX) in the monocytic lineage U937, through the assessment of its gene expression and protein and its functionality through the activation of ERK-2, which makes this cell line a suitable tool to study the mechanisms of action of LXs and their analogs on the monocytes. Furthermore, we demonstrated that ATL-1 increases the expression of the enzyme heme oxygenase (HO)-1 in the U937 cells via activation of p38 MAP kinase (MAPK) and decreases the secretion of Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), a chemokine involved in the recruitment of monocytes to the inflammatory focus in LPS-stimulated U937 cells. MCP-1 secretion inhibition by ATL-1 was reverted by SB203580 indicating that this effect is dependent on the activation of p38 MAPK pathway. This study clarifies some of the mechanisms involved in the activation of monocytes by lipoxins which may lead to new approaches for the control of different pathologies where the inflammatory component is relevant.

Keywords: Lipoxin. Monocytes. Heme oxygenase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Biossíntese das lipoxinas e <i>aspirin-triggered-lipoxins</i> (ATL).....	12
Figura 2-	Sítios de biotransformação de LXs.....	13
Figura 3-	Vias de sinalização MAPKs.....	16
Figura 4-	Degradação do heme mediada pela heme oxigenase-1.....	20
Figura 5-	Fatores que estimulam MCP-1 e algumas patologias associadas com sua expressão.....	22

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Células U937 expressam o receptor ALX.....	32
Gráfico 2-	ATL-1 induz a fosforilação de ERK-2 em células U937.....	33
Gráfico 3-	ATL-1 ativa a via da p38 MAPK em células U937.....	34
Gráfico 4-	ATL-1 induz a expressão de HO-1 em células U937.....	35
Gráfico 5-	A indução da expressão da HO-1 pelo ATL-1 em células U937 é dependente da ativação da via da p38 MAPK.....	36
Gráfico 6-	ATL-1 inibe a produção de MCP-1 por células U937 estimuladas com LPS via p38 MAPK.....	38
Gráfico 7-	Esquema do mecanismo de ação do ATL-1.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

AA - ácido araquidônico
AhR - receptor aril hidrocarboneto
ALX - receptor da lipoxina A₄
ATL - *aspirin-triggered lipoxins*
ATL-1 – 15-epi-16-(*para*-flúor)-fenoxi-lipoxina A₄
COX – ciclooxigenase
ERK - quinase regulada por sinal extracelular
fMLP- formil-metionil-leucil-fenilalanina
FPR – receptor do fMLP
FPRL1 - receptor FPR *like* 1
GM-CSF – fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
GPCR - receptor transmembrana acoplado à proteína G
HO – heme oxigenase
IL - interleucina
JNK - c-Jun quinase N-terminal
LO – lipoxigenase
LPS - lipopolissacarídeo
LT - leucotrieno
LX - lipoxina
MAPK - proteína quinase ativada por mitógeno
MCP-1 - *monocyte chemoattractant protein-1*
MEK - MAP quinase quinase
MEKK - MAP quinase quinase quinase
MIP - *macrophage inflammatory protein*
PLA₂ - fosfolipase A₂
PG – prostaglandina
TNF – fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	11
1	MAP QUINASES	16
2	HEME OXIGENASE-1	19
3	<i>MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN-1</i>	21
4	OBJETIVOS	23
4.1	Objetivo geral	23
4.2	Objetivos específicos	23
5	MATERIAIS E MÉTODOS	24
5.1	Reagentes	24
5.2	Soluções	25
5.3	Linhagem celular	29
5.4	Cultura de células	29
5.5	Ensaio de RT-PCR	29
5.6	Obtenção do extrato celular	30
5.7	Western Blot	30
5.8	Dosagem de MCP-1	31
5.9	Análise estatística	31
6	RESULTADOS	32
6.1	Células U937 expressam o receptor ALX	32
6.2	ATL-1 induz a fosforilação de ERK-2 em células U937	33
6.3	ATL-1 ativa a via da p38 MAPK em células U937	34
6.4	ATL-1 induz a expressão de HO-1 em células U937	35
6.5	A indução da expressão da HO-1 pelo ATL-1 em células U937 é dependente da ativação da via da p38 MAPK	36
6.6	ATL-1 inibe a produção de MCP-1 por células U937 estimuladas com LPS via p38 MAPK	37
7	DISCUSSÃO	39
8	CONCLUSÃO	43

REFERÊNCIAS	44
--------------------------	-----------

INTRODUÇÃO

Lipoxinas

O ácido araquidônico (AA) é encontrado esterificado a fosfolipídios de membrana e é liberado sob a ação da fosfolipase A₂ (PLA₂) (Christopher e col., 1981). O AA não esterificado pode ser biotransformado pela enzima ciclooxigenase (COX), dando origem a prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TX) (Vane e col., 1998), ou pode ser oxigenado pela enzima lipoxigenase (LO), originando leucotrienos (LTs) (Brash, 1999) e lipoxinas (LXs) (Serhan 2005). PGs e LTs são mediadores lipídicos que atuam aumentando a inflamação diferente das LXs, que foram os primeiros eicosanóides derivados do AA com reconhecidas atividades antiinflamatória e pró-resolução (Serhan e col., 2008).

Síntese

As LXs são trihidroxitetraenos bioativos produzidos endogenamente sob estímulos como injúria e/ou infecção a partir de interações célula-célula, via múltiplas rotas biossintéticas que trabalham independentemente ou em conjunto (Serhan, 2005). Em mamíferos, há duas diferentes rotas de biossíntese de LX que ocorrem durante interações entre isoformas da LO (Figura 1). Na primeira, ocorre a inserção do oxigênio molecular no carbono 15 do AA pela 15-LO presente em células epiteliais, gerando o ácido 15S-hidroperoxieicosatetraenóico (15S-H(p)ETE) ou a sua forma álcool reduzida, o ácido 15S-hidroxiieicosatetraenóico (15S-HETE) (Serhan e col., 1984). Estes podem servir como substrato para a 5-LO em neutrófilos levando à formação dos trihidroxitetraenos LXA₄ e LXB₄. A segunda via ocorre, predominantemente, nos vasos e envolve a interação de leucócitos com plaquetas. A biossíntese é iniciada com a liberação de LTA₄, formado pela 5-LO a partir do AA em leucócitos ativados, o qual é convertido por plaquetas, via 12-LO, a LXA₄ e LXB₄ (Edenius e col., 1988).

Uma terceira via de síntese envolve a Aspirina, a COX-2 e a 5-LO (Figura 1). Células epiteliais e endoteliais, em resposta a diversos estímulos, expressam COX-2 que é acetilada pela Aspirina. Neste processo, a biossíntese de prostanóides é

inibida e a COX-2 acetilada transforma o AA no intermediário 15(R)-HETE, que é, então, convertido pela 5-LO, em PMN, aos 15-epímeros das LXs, 15-epi-LXA₄ e 15-epi-LXB₄, também chamados *aspirin-triggered lipoxins* (ATLs) (Clària & Serhan, 1995).

Mais recentemente foi demonstrado que a Atorvastatina e a Pioglitazona induzem a formação de 15-epi-LXA₄ no miocárdio de ratos (Birnbaum e col., 2006). Estes fármacos aumentam a fosforilação da 5-LO na serina⁵²³ promovendo sua interação com a COX-2 na fração citosólica e levando à produção da 15-epi-LXA₄ (Ye, e col., 2008).

A rota de formação das LXs irá depender, portanto, das células e enzimas envolvidas. Além disso, citocinas como a interleucina (IL)-4 e a IL-13, que promovem um aumento da expressão e da atividade da 5-LO (Nassar e col., 1994; Sigal & Conrad, 1994), o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), que modula a atividade da 5-LO (Pouliot e col., 1994; Ring e col., 1996) e a IL-1β e o fator de necrose tumoral (TNF)-α, que induzem a expressão da COX-2 (Leslie e col., 1994) são cruciais para a formação de LXs e ATL.

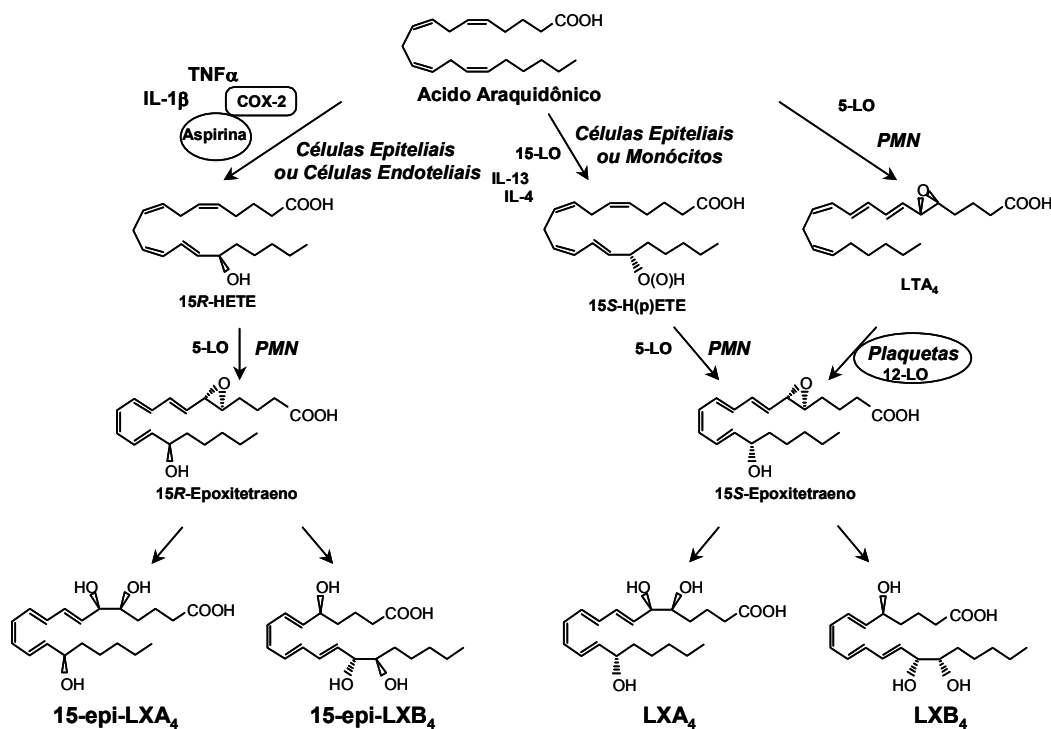


Figura 1. Biossíntese das lipoxinas e *aspirin-triggered lipoxins* (ATL) (adaptada de Fierro & Serhan, 2001).

Inativação

As LXs são biossintetizadas em resposta a estímulos específicos, agem localmente e sofrem rápida inativação enzimática. A principal via de inativação destes lipídeos é a desidrogenação, originando as 15-oxo-LXs, seguida pela redução da dupla ligação adjacente ao grupamento cetona (Clish e col., 2000). As LXs podem sofrer também ω -oxidação no carbono 20 (Serhan e col., 1993; Clish e col., 2000) (Figura 2).

Os ATLs são menos convertidos a seus 15-oxo metabólitos e, *in vivo*, a sua meia-vida é mais prolongada, em comparação com a LXA₄ nativa, aumentando seus efeitos biológicos (Serhan e col., 1995). Devido à rápida transformação e inativação das LXs e ATLs *in vivo*, foram sintetizados análogos capazes de resistir a esse metabolismo, mantendo a integridade estrutural e ações biológicas das moléculas precursoras (Parkinson, 2006).

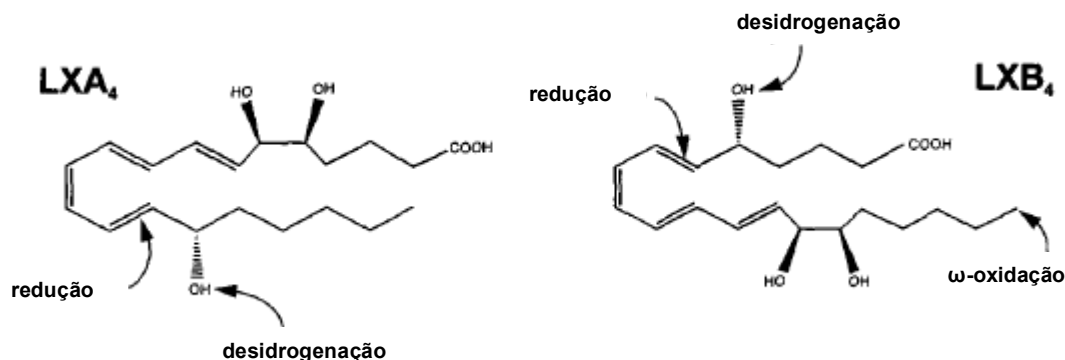


Figura 2. Sítios de biotransformação de LXs (adaptada de Maddox & Serhan, 1996).

Receptor

O receptor para a LXA₄, denominado ALX, foi inicialmente caracterizado em neutrófilos humanos (Fiore e col., 1992) e identificado como um receptor órfão do tipo GPCR (receptor acoplado à proteína G). Este receptor apresenta um alto grau de homologia estrutural com o FPR (receptor do fMLP [formil-metionil-leucil-fenilalanina]) (Boulay e col., 1990) e, por isso, foi denominado FPR-*like*-1 (FPRL1) (Murphy e col., 1992). O primeiro agonista identificado para o FPRL1/ALX foi o peptídeo bacteriano fMLP (Ye e col., 1992), porém seu efeito biológico só é

desencadeado em altas doses do agonista, sugerindo que o fMLP não é, fisiologicamente, um ligante relevante. O ALX é encontrado na membrana celular acoplado à proteína G_i sendo, portanto, sensível à toxina *Pertussis*.

Além do ALX, foi também descrito, em uma linhagem de hepatoma murino, que a LXA_4 pode atuar como ligante para um alvo intracelular, o receptor aril hidrocarboneto (AhR), um fator de transcrição ativado por ligante. Esta ligação ativa o AhR, o que promove a indução da enzima CYP1A1, que tem como substrato a LXA_4 , sugerindo que a LXA_4 pode estimular o seu próprio metabolismo (Schaldach e col., 1999). Machado e colaboradores (2006) também mostraram que a LXA_4 ativa o AhR em células dendríticas, levando à inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias via ativação de SOCS (*suppressor of cytokine signaling proteins*)-2.

Efeitos biológicos

A LXA_4 e seus análogos regulam a resposta de leucócitos, *in vitro* e *in vivo*, através da ativação de vias de sinalização específicas para cada tipo celular (Chiang e col., 2006). Em neutrófilos, a interação LXA_4 -ALX inibe a quimiotaxia, aderência e transmigração (Serhan e col., 1995), inibe as interações neutrófilo-célula epitelial e neutrófilo-célula endotelial (Papayianni e col., 1996), bloqueia a produção de ânion superóxido por células estimuladas com LPS e inibe a produção de peroxinitrito e a produção de IL-8, um potente quimiotático para neutrófilos (Jozsef e col., 2002). Em monócitos e macrófagos, as LXs desencadeiam efeitos que são contrastantes quando comparados aos neutrófilos. Maddox & Serhan (1996) e Maddox e colaboradores (1997) mostraram que as LXs e seus análogos induzem a quimiotaxia de monócitos para o local da injúria e adesão destas células à laminina com aumento da mobilização de Ca^{2+} intracelular. Estes efeitos são independentes da geração de ânion superóxido e não promovem citotoxicidade, além de serem sensíveis ao tratamento com a toxina *Pertussis*. Nosso grupo demonstrou que a quimiotaxia de monócitos em resposta ao ATL-1, um análogo sintético da 15-epi-lipoxina A_4 , ocorre através da reorganização do citoesqueleto de actina dependente de RhoA e da quinase de cadeia leve da miosina (MLCK) (Simões & Fierro, 2005). Ainda em monócitos, a LXA_4 e seus análogos reduzem a secreção de IL-8 por células de pacientes com asma (Bonnans e col., 2002). Em macrófagos, estes lipídeos estimulam a fagocitose de neutrófilos apoptóticos de maneira não flogística

(Godson e col., 2000). A LXA₄ inibe ainda a quimiotaxia de eosinófilos (Bandeira-Melo e col., 2000), a secreção de TNF- α por células T ativadas, através do bloqueio da ativação de ERK (Ariel e col., 2003) e modula a expressão de CCR5 em neutrófilos (Ariel e col., 2006), além de inibir a produção de IL-12 por células dendríticas ativadas (Aliberti e col., 2002).

Além de seu papel sobre leucócitos, promovendo a modulação da resposta imune inata e adaptativa, a presença do receptor ALX já foi descrita em outros tipos celulares (Chiang e col., 2006). Estudos realizados pelo nosso grupo mostraram que o ATL-1, em células endoteliais, inibe a angiogênese induzida pelo VEGF (fator de crescimento vascular endotelial) (Cezar-de-Mello e col., 2008) e a produção de espécies reativas de oxigênio mediada pela ativação da enzima NAD(P)H oxidase, protegendo contra o desenvolvimento e a progressão de doenças cardiovasculares (Nascimento-Silva e col., 2007). Além disso, este análogo induz a expressão da heme oxigenase (HO)-1, uma enzima com papel antiinflamatório e antioxidante (Nascimento-Silva e col., 2005). Em enterócitos, a LXA₄ e análogos inibem a expressão e secreção de IL-8 induzidas por TNF e pela *Salmonella Typhimurium* (Gewirtz e col., 1998); e, em fibroblastos, inibem a produção de IL-6, IL-8 e metaloproteinase de matriz (MMP)-3 induzida por IL-1 β (Sodin-Semrl e col., 2000) e a proliferação induzida pelo fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) (Wu e col., 2006).

1 MAP QUINASES

A ativação de receptores de superfície celular desencadeia sinais intracelulares com o envolvimento de diversas vias. Entre as mais bem estudadas vias de sinalização está a cascata de fosforilação que culmina na ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK). As MAPK regulam uma variedade de processos fisiológicos como o crescimento celular, diferenciação e morte celular por apoptose (Melissa e col., 2008). Três vias MAPK foram caracterizadas com detalhes (Figura 3): a via das quinases reguladas por sinal extracelular (ERK1/2), a via da c-Jun quinase N-terminal/proteína quinase ativada por estresse (JNK/SAPK) e a via da p38 (p38 α , p38 β , p38 γ e p38 δ). Existe, ainda, uma quarta via MAPK descrita, a quinase regulada por sinal extracelular 5 (ERK5) (Hayashi & Lee, 2004) (Figura 3).

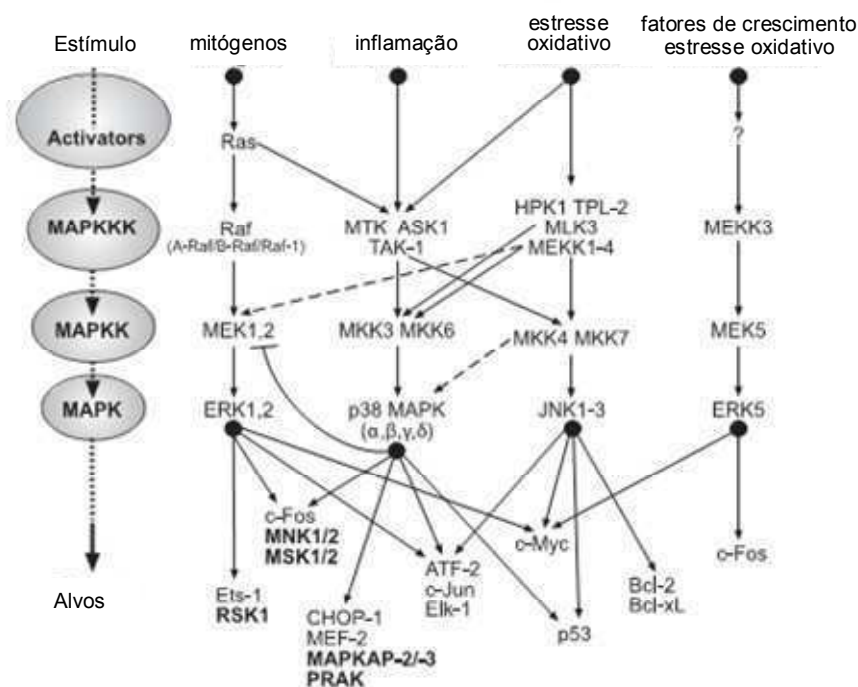


Figura 3. Vias de sinalização MAPKs (adaptada de Melissa e col., 2008).

Durante a cascata de sinalização clássica, as MAPK são fosforiladas por quinases específicas, denominadas MAP quinase quinases (MAPKK ou MEK), que constituem uma família com especificidade dual, podendo fosforilar tanto resíduos de tirosina como resíduos serina/treonina. AS MEK, por sua vez, são ativadas por MAP quinase quinase quinases (MAPKKK ou MEKK) através da ativação de diversos receptores por fatores de crescimento ou quimioatrantes. As MAP quinases estão, em geral, ao final da cascata de sinalização, fosforilando proteínas-alvo, algumas proteínas nucleares, agindo como fatores de transcrição (Cowan, 2003).

A via da ERK, proteínas de peso molecular 42/44 kDa, é ativada em resposta a mitógenos, fatores de crescimento e ésteres de forbol, e está associada com o crescimento, proliferação e sobrevivência celulares (Ballif & Blenis, 2001; Rubinfeld & Seger, 2005; Meloche & Pouyssegur, 2007). Depois de ativadas, a ERK1/2 podem fosforilar quinases citoplasmáticas ou translocar para o núcleo e ativar fatores de transcrição ou fosforilar quinases nucleares (Roux & Blenis, 2004; Zebisch e col., 2007).

Estudos relatam uma relação direta entre a ativação de ERK e a migração de monócitos (Simões & Fierro, 2005; Noma e col., 2008). Montecucco e colaboradores (2009) mostraram que as estatinas (sinvastatina ou atorvastatina) inibem, através da ativação da ERK 1/2, a secreção das quimiocinas *monocyte chemoattractant protein* (MCP)-1, *macrophage inflammatory protein* (MIP)-1 α e MIP-1 β , o aumento da expressão da molécula de adesão *inter-cellular adhesion molecule* (ICAM)-1 e a migração de monócitos induzidos pela proteína C reativa. A ativação de ERK também está envolvida com a produção de diversas citocinas inflamatórias por monócitos como o TNF- α (Lee e col., 2006), a IL-21 (Fuqua e col., 2008) e a IL-8 (Edling e col., 2008), entre outras.

A via da p38 MAPK pode ser ativada em resposta ao estresse ambiental e citocinas inflamatórias (Raman e col., 2007), além de alguns mitógenos como eritropoietina, *colony stimulating growth factor* (CSGF)-1 e GM-CSF (Roux & Blenis, 2004). A fosforilação desta quinase desencadeia a ativação de fatores de transcrição ou promove a ativação de outras quinases. Esta via está envolvida com a indução da apoptose em diferentes modelos (Li e col., 2003; Efimova e col., 2004) porém, também com o crescimento e sobrevivência de células cancerígenas (Johansson e col., 2000; Junttila e col., 2007). Os mecanismos moleculares que determinam se a p38

MAPK irá promover ou inibir a proliferação e sobrevivência celulares podem estar ligados ao estado de transformação da célula ou depender da natureza do sinal de ativação da p38. Esta via também está envolvida com a regulação da expressão de moléculas inflamatórias como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 (Lee e col., 1994; Cuenda & Rousseau, 2007), COX-2 (Dean e col., 1999) e a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Ajizian e col., 1999) por monócitos e macrófagos estimulados com LPS. Contudo, em monócitos, estudos mostram o envolvimento da via da p38 com a indução da enzima heme oxigenase (HO)-1, mediando, assim, efeitos antiinflamatórios (Naidu e col., 2008; Hsu e col., 2008).

2 HEME OXIGENASE-1

A enzima heme oxigenase (HO) catalisa a degradação do heme, produzindo ferro livre (Fe^{2+}), monóxido de carbono (CO) e biliverdina, que é rapidamente convertida a bilirrubina em uma reação catalisada pela biliverdina redutase (BVR) (Loboda, 2008) (Figura 4). Em mamíferos, duas isoformas desta enzima foram identificadas: a forma induzida HO-1 e a forma constitutiva HO-2 (Maines e col., 1986). A HO-1, uma proteína de 32 kDa, é também conhecida como a proteína de estresse HSP32 (Keyse & Tyrrell, 1989). Sua regulação em mamíferos é dependente da ativação transcricional do gene HO-1 (Yoshida e col., 1988), que ocorre em resposta a estímulos que causam estresse oxidativo como o seu próprio substrato, o heme, metais pesados, citocinas, lipopolissacarídeo (LPS), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), fatores de crescimento e luz ultra-violeta (UV) (Loboda e col., 2008). A HO-2, uma proteína de 36 kDa, tem uma expressão constante que pode ser aumentada por um número limitado de fatores como a dexametasona em células epiteliais primárias de humanos (Donnelly & Barnes, 2001) ou a corticosterona em cérebro de fetos de ratos (Maines e col., 1996). Porém, dependendo do tipo celular e microambiente, sua expressão pode ser aumentada ou diminuída em resposta à hipóxia (Han e col., 2005).

A indução da HO-1 e o papel de seus produtos têm sido estudados em muitos tipos celulares. Por exemplo, o CO pode exercer um potente efeito antiinflamatório, provavelmente por ativação da p38 (Ryter e col., 2002). Otterbein e colaboradores (2000) mostraram que o CO inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e $\text{MIP-1}\beta$ por macrófagos estimulados com LPS, e induz a expressão de IL-10, uma citocina antiinflamatória. Além disso, inibe a proliferação de células T (Song e col., 2004; Pae e col., 2004) e células musculares lisas (Morita e col., 1997) e previne a apoptose de células endoteliais (Otterbein e col., 2000; Brouard e col., 2002), células musculares lisas (Liu e col., 2002), fibroblastos (Petrache e col., 2000), osteoblastos (Chae e col., 2006) e células β do pâncreas (Gunther e col., 2002). A bilirrubina pode agir como antioxidante (Stocker e col., 1987) e apresenta atividades antiinflamatórias, por exemplo, em um modelo em ratos, diminuindo a expressão de P- e E-selectinas induzida por LPS no sistema vascular, levando a uma diminuição do rolamento e adesão de leucócitos *in vivo*

(Hayashi e col., 1999). Estudos clínicos comprovam que níveis altos de bilirrubina no soro estão associados a um menor risco de o indivíduo desenvolver aterosclerose (Ollinger e col., 2007). O ferro livre estimula a síntese de ferritina, promovendo um efeito antioxidante (Loboda e col., 2008).

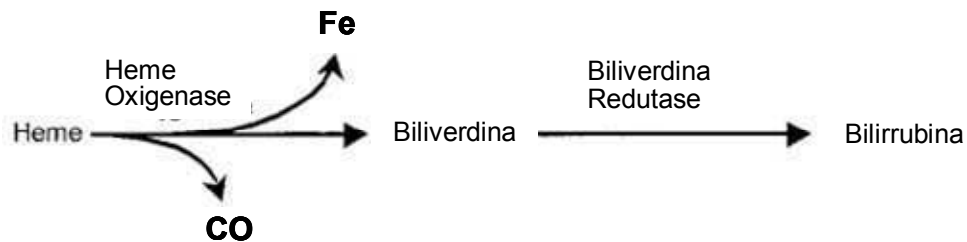


Figura 4. Degradação do heme mediada pela heme oxigenase-1 (adaptada de Morse & Choi, 2002).

Ogborne e colaboradores (2005) mostraram que o ácido α -lipóico, um antioxidante, induz a expressão da HO-1 em monócitos, resposta que é mediada pela via da p38 MAK e pelo *nuclear factor-erythroid-2-related factor* (Nrf2). Também é sabido que a curcumina, um polifenol com propriedades antioxidantes, induz a HO-1 através da ativação de p38 e Nrf2 via proteína quinase C (PKC) em monócitos humanos (Rushworth e col., 2006), um efeito também observado após o tratamento das células com LPS (Rushworth e col., 2005). Além disso, Hsu e colaboradores (2008) mostraram que a expressão da HO-1 induzida pela curcumina em monócitos humanos ocorre via p38 α , PKC α/δ e PI3-quinase, além de envolver espécies reativas de oxigênio (ROS) *upstream* a ERK1/2 e p38 α . Estes mesmos autores mostram que a indução de HO-1 promove a inibição, ao menos em parte, da expressão de IL-1 e IL-6 induzida por LPS. Mais recentemente foi demonstrado que o éster de forbol PMA induz a expressão gênica da HO-1 em monócitos via ativação de p38 MAPK e CK-2 (Naidu e col., 2008). Utilizando a linhagem monocítica U937, Shokawa e colaboradores (2006) mostraram que a indução da HO-1 pode resultar em uma inibição da expressão gênica de MCP-1 induzida por lisofosfatidilcolina.

3 MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN-1 (MCP-1)

A quimiocina MCP-1 é um potente agente quimiotático para monócitos e macrófagos e, por isso, um dos fatores-chaves envolvidos com a iniciação da resposta inflamatória. Além disso, está relacionada à adesão firme de monócitos ao endotélio vascular facilitando sua migração através do mesmo (Jiang e col., 1992; Gerszten e col., 1999). Esta quimiocina promove a quimiotaxia e a migração transendotelial de monócitos por interagir com o receptor 2 de quimiocinas CC (CCR2), presente na membrana dessas células (Melgarejo e col., 2008).

A MCP-1 é secretada por diversos tipos celulares, incluindo as células endoteliais, fibroblastos, células musculares lisas da vasculatura, monócitos e células T (Conti & DiGioacchino, 2001) sob estímulos como TNF- α , fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) e fatores de estresse (Melgarejo e col., 2008), e está associada a diversas patologias (Figura 5), incluindo aterosclerose (Shin et al., 2002) artrite (Taylor et al., 2000) e câncer (O'Hayre et al., 2008), nas quais, vem sendo sugerido que o influxo de macrófagos nos tecidos promove a exacerbação destas doenças.

Alguns agentes antiinflamatórios têm sido estudados na inibição da síntese e expressão gênica da MCP-1. Porém, pouco é sabido a respeito do papel das LXs sobre a modulação da secreção desta quimiocina por monócitos ativados.

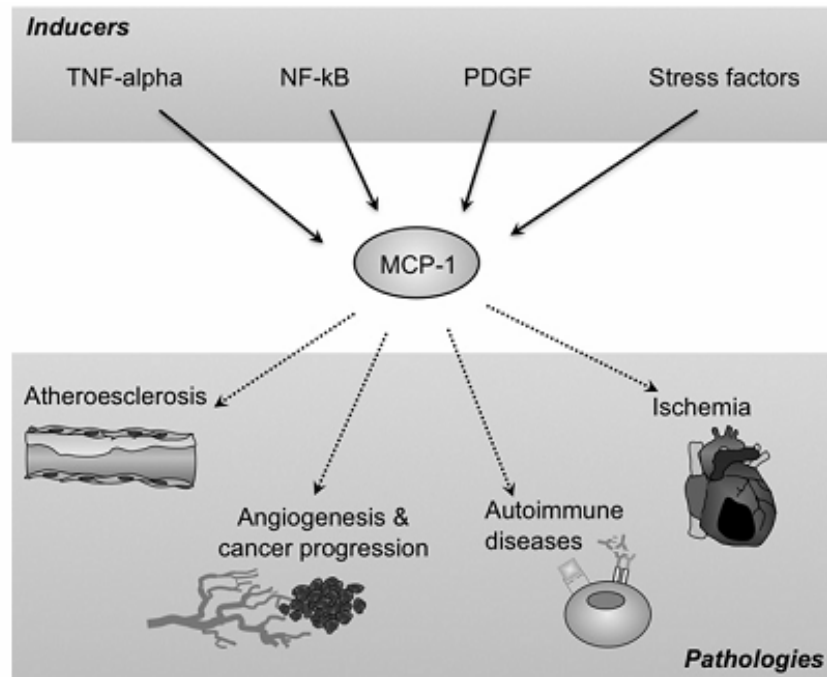


Figura 5. Fatores que estimulam MCP-1 e algumas patologias associadas com sua expressão (Melgarejo e col., 2008)

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar o papel do 15-epi-16-(*para*-flúor)-fenoxi-lipoxina A₄ (ATL-1), um análogo sintético da 15-epi-lipoxina A₄, sobre diferentes processos de ativação de monócitos.

4.2 Objetivos específicos

Estudar os mecanismos pelos quais o ATL-1 exerce seus efeitos sobre os monócitos, investigando, principalmente:

- A ativação de proteínas da família das MAP quinases;
- A indução da enzima heme oxigenase-1;
- A produção da quimiocina MCP-1.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Reagentes

- 15-epi-16-(*para*-flúor)-fenoxi-lipoxina A₄ (ATL-1) – doação do Dr. John Parkinson da Berlex Bioscience.
- Meio de cultura RPMI, Trizol e First Strand Buffer – Invitrogen Corporation.
- Soro fetal bovino – Cultilab.
- Anticorpos - anti-HO-1 – Assay Designs; anti-ERK-2, anti-p-ERK-2, anti-p38, anti-p-p38, anti-actina – Santa Cruz Biotechnology; anti-FPRL-1 – Gen Way Biotech.
- Estreptavidina – Caltag Laboratories.
- Penicilina, estreptomicina, HEPES, fluoreto de fenil metil sulfonil (PMSF), albumina bovina, vermelho de fenol, aprotinina, leupeptina e LPS (*Escherichia Coli* 0111:B4) – Sigma Chemical Co.
- NaHCO₃, EDTA, NaOH, NaCl, CaCl₂, álcool isopropílico,, Na₂PO₄ e ácido cítrico – Vetec Química Fina Ltda.
- Triton X-100, Tris, glicerol, β-mercaptoetanol, azul de bromofenol, acrilamida, bis-acrilamida, APS, glicina, TEMED, padrão de peso molecular e ECL Plus – GE Healthcare UK Limited Amershan Place.
- MgCl₂, KCl e H₂O₂ – Merck.
- Dna Polimerase GoTaq – Promega.

5.2 Soluções

- **Meio RPMI**

RPMI-1640.....	10,4 g/L
NaHCO ₃	2,0 g/L
HEPES.....	5,2 g/L
Penicilina.....	0,06 g/L
Estreptomicina.....	0,1 g/L
Soro fetal bovino.....	10% v/v

- **Tampão de Lise (pH=6,4)**

HEPES.....	50 mM
MgCl ₂	1 mM
EDTA.....	10 mM
Triton X-100.....	1% v/v
Aprotinina.....	1µg/mL
Leupeptina.....	1µg/mL
SBTI.....	1µg/mL
DMSO	1µL/mL
DNase.....	1µg/mL

Tampão de amostra

Tris-HCl.....	20 mM
SDS.....	1%
β-mercaptoetanol.....	5% v/v
Glicerol.....	10% v/v

Azul de bromofenol.....0,001%

- **Tampão do gel de separação (pH=8,8)**

Tris-HCl.....1,5 M

SDS.....0,4%

H₂O.....q.s.p. 200 mL

- **Tampão do gel de entrada (pH=6,8)**

Tris-HCl.....0,5 M

SDS.....0,4%

H₂O.....q.s.p. 200 mL

- **Acrilamida**

Acrilamida.....30%

H₂O.....q.s.p. 200 mL

- **Bis-acrilamida**

Bis-acrilamida.....1,6%

H₂O.....q.s.p. 200 mL

- **APS 10%**

APS.....20 mg

H₂O.....q.s.p. 2 mL

- **Tampão de corrida**

Tris-HCl.....2,5 mM

Glicina.....192 mM

SDS.....0,1%

H₂O.....q.s.p. 1 L

- **Tampão de eletrotransferência**

Tris-HCl.....48 mM
Glicina.....39 mM
H₂O.....q.s.p. 1 L

- **PBS**

NaCl.....150 mM
NaH₂PO₄.....10 mM
H₂O.....q.s.p. 1L

- **T-PBS**

Tween-20.....0,05% v/v
PBS.....q.s.p. 400 mL

- **Solução de bloqueio**

Albumina bovina.....2%
T-PBS.....q.s.p. 50 mL

- ***Stripping Buffer* (pH=6,7)**

Tris-HCl.....62,5 mM
SDS 10%.....20% v/v
β-mercaptoetanol100 mM
H₂O.....q.s.p. 200 mL

- **Gel de entrada - poliacrilamida**

Tampão do gel de entrada.....	940 µL
Acrilamida 30%.....	1,59 mL
Bis-acrilamida.....	280 µL
H ₂ O destilada.....	1,97 mL
APS (10%).....	12,5 µL
TEMED.....	3,75 µL

- **Gel de separação (12%) - poliacrilamida**

Tampão do gel de separação.....	2,0 mL
Acrilamida 30%.....	3,18 mL
Bis-acrilamida.....	1,59 mL
H ₂ O.....	1,23 mL
APS 10%.....	50 µL
TEMED.....	5 µL

- **Tampão citrato-fosfato (pH=5)**

Ácido cítrico.....	0,2 N
Na ₂ HPO ₄ (pH=9,1).....	0,1 N

Adicionar Na₂HPO₄ ao ácido cítrico até atingir pH=5,0.

Adicionar 5 µL de H₂O₂ (30%)/10 mL de tampão no momento do uso.

5.3 Linhagem celular

Foram utilizadas células monocíticas humanas da linhagem U937 (Rio de Janeiro Cell Bank).

5.4 Cultura de células

As células foram cultivadas em estufa com CO₂ a 5%, em temperatura de 37°C, em meio de cultura RPMI-1640 completo e repicadas a cada 2-3 dias. A viabilidade celular (97-98%) foi avaliada através da exclusão por azul de Tripán.

5.5 Ensaio de RT-PCR

O RNA total de células U937 (2×10^6) foi extraído com o reagente Trizol®, seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. O RNA foi ressuspenso em água tratada com DEPC 0,1% (p/v) e posteriormente estocado a 4°C. A quantificação do RNA total foi feita em espectrofotômetro na absorvância de 260 nm. O DNA complementar foi sintetizado a partir do RNA total através de uma reação de transcrição reversa. Foram adicionados 2 µg de RNA e 100 ng de oligonucleotídeo dT em tubo eppendorf, aquecidos a 70°C por 5 minutos e rapidamente resfriados em gelo. Em seguida, uma solução contendo 10µL de tampão RT 5x (*first strand buffer*), 0,5 mM de cada dNTP, 20 U de inibidor de ribonuclease, água DEPC 0,1% (p/v) e 200 U de transcriptase reversa foram adicionados a cada amostra em um volume final de 25 µL. A reação de transcrição reversa foi feita por 60 minutos a 42°C e por 15 minutos a 70°C. A amplificação de ALX e GAPDH foi realizada utilizando 5 µL de cDNA em PCRs contendo tampão PCR 1x, 0,2 mM de dNTP, 2 mM de MgCl₂, 100 ng dos primers senso e anti-senso para cada amplificação de cDNA de ALX e GAPDH, 1 U DNA polimerase Gotaq e água DEPC 0,1% (p/v) para completar um volume de 50 µL. RT-PCR semi-quantitativo foi realizado com o primer senso para ALX (5'-AATATCCCTGACCCCATCCTCA-3') e o primer anti-senso para ALX (5'-CACCAGGTGCTGCTGGCAAG-3'). Reações controle foram realizadas com os primers senso para GAPDH (5'-GGCCTCCAAGGAGTAAGACC-3'), e anti-senso para GAPDH (5'-AGAGGTCTACATGGCAACTG-3'), que são específicos para o RNAm da enzima constitutiva GAPDH humana. As amostras foram amplificadas em

um ciclador térmico e as condições para PCR foram 95°C/30 segundos para desnaturação, 52°C/1 minuto para pareamento e 72°C/26 segundos para extensão em 27 ciclos. Os produtos de RT-PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5% sob exposição à luz UV utilizando um transiluminador. Os produtos do PCR foram obtidos utilizando o sistema GenAmp PCR 2400 (Perkin Elmer).

5.6 Obtenção do extrato celular

As células (2×10^6) foram colocadas em placas de 24 poços em meio de cultura RPMI-1640 e incubadas por diferentes tempos a 37°C e 5% de CO₂, na presença ou ausência de ATL-1, veículos ou diferentes inibidores. Após a incubação, as células foram lisadas em tampão de lise e o conteúdo de proteínas do extrato total foi determinado pelo método de Bradford (1976).

5.7 Western blot

O lisado celular e o meio condicionado foram desnaturados em tampão de amostra e aquecidos em água (100°C) por 3 minutos. As amostras foram submetidas a gel SDS-PAGE e as proteínas foram então transferidas para membranas de PVDF. O padrão de peso molecular foi corrido em paralelo para estimar o peso molecular das proteínas. As membranas foram bloqueadas com solução de bloqueio por meia hora sob agitação. As membranas foram incubadas *overnight* (aproximadamente 18 horas) a 4°C com os anticorpos primários específicos. Após lavagens com T-PBS, as membranas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com o respectivo anticorpo secundário conjugado à biotina. Após novas lavagens com T-PBS, as membranas foram incubadas com estreptavidina conjugada à peroxidase por 1 hora a temperatura ambiente. Novas lavagens foram realizadas e as membranas foram incubadas com solução ECL por 5 minutos e expostas a filme. Após a revelação dos filmes e visualização das bandas, os mesmos foram digitalizados e as bandas foram analisadas por densitometria usando o software Scion Image (Scion Co, MD, EUA).

5.8 Dosagem de MCP-1

A quimiocina MCP-1 foi dosada no sobrenadante de células U937 estimuladas com LPS (10 ng/mL) e/ou tratadas com etanol (0,02%), DMSO (0,5%) (veículos), ATL-1 (100 nM), estanho protoporfirina (SnPP) (10 μ M) e SB203580 utilizando um kit comercialmente disponível (PeproTech inc.) A dosagem foi feita conforme as instruções do fabricante. Uma placa de 96 poços foi coberta com 100 μ L/poço do anticorpo de captura (0,5 μ g/mL) e incubada *overnight* em temperatura ambiente. Após este período, a placa foi lavada 4 vezes com 300 μ L/poço de tampão de lavagem (PBS-Tween 20 0,05%) e bloqueada com 100 μ L/poço de tampão de bloqueio (BSA 1% em PBS) por 2 horas a temperatura ambiente. Foram realizadas novas lavagens e, posteriormente, a curva padrão e as amostras foram adicionadas em um volume de 100 μ L/poço. A placa foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi lavada e incubada com 100 μ L/poço do anticorpo de captura (0,5 μ g/mL) por 2 horas a temperatura ambiente. A placa foi lavada mais 4 vezes e incubada com 100 μ L/poço de Avidina-HRP (1:2000 em PBS-BSA 0,1%) por 30 minutos a temperatura ambiente. A placa foi novamente lavada e incubada com 100 μ L/poço da solução contendo o substrato (O-phenylenediamine (OPD) 0,4 mg/mL de tampão citrato-fosfato) protegida da luz e lida a cada 5 minutos em leitor de ELISA (modelo 550 BioRad) em um comprimento de onda de 490 nm. Todas as dosagens foram feitas em triplicata.

5.9 Análise estatística

A significância foi obtida através do teste de variância (ANOVA), seguida pela análise com o teste t-Bonferroni, sendo $p < 0,05$ considerado como estatisticamente significativo.

6 RESULTADOS

6.1 Células U937 expressam o receptor ALX

A presença do receptor ALX já foi descrita em diversos tipos celulares de origem mielóide (neutrófilos, monócitos, macrófagos, eosinófilos, linfócitos) bem como em alguns de origem não-mielóide (células endoteliais, células epiteliais, fibroblastos, enterócitos e células mesangiais) (Chiang e col., 2006).

Neste trabalho utilizamos células da linhagem monocítica U937 e demonstramos, pela primeira vez, a presença do ALX nestas células, através da análise da expressão transcricional por RT-PCR (Figura 6A) e da expressão protéica por western blot (Figura 6B).

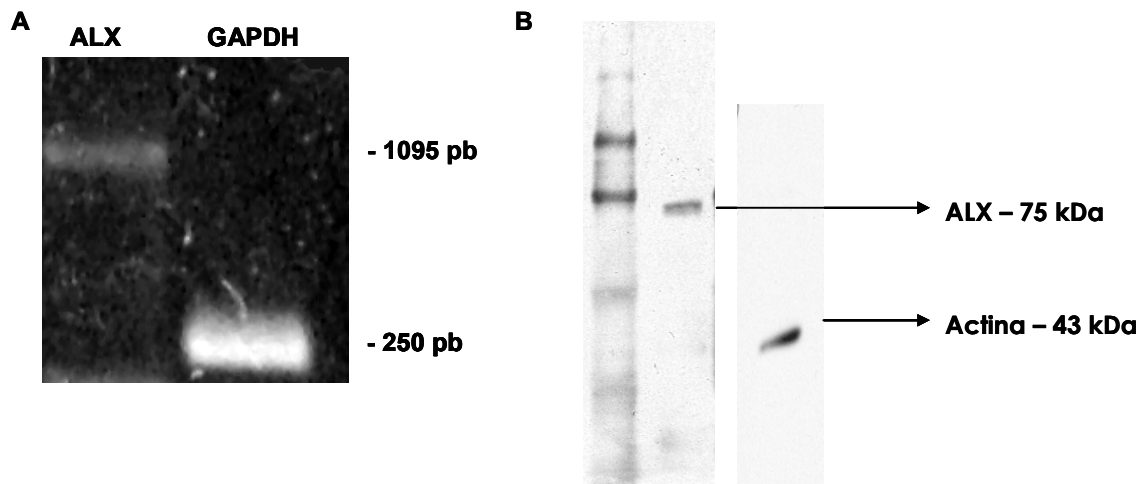


Figura 6. Células U937 expressam o receptor ALX. Células U937 (2×10^6 /poço) foram cultivadas em meio RPMI completo, em placas de 24 poços. O RNA total foi extraído e amplificado por RT-PCR utilizando-se primers específicos para ALX e GAPDH (A) e o lisado total foi analisado por western blot utilizando-se anticorpos específicos para o ALX e actina (B). Os resultados são representativos de três experimentos idênticos e independentes.

6.2 ATL-1 induz a fosforilação de ERK-2 em células U937

Já foi demonstrado pelo nosso grupo, em trabalhos anteriores, que o análogo sintético da 15-epi-lipoxina A₄ ATL-1 induz a fosforilação de ERK-2 em monócitos humanos de sangue periférico (Simões & Fierro, 2005). Para caracterizarmos a funcionalidade do receptor ALX nas células U937, investigamos se este análogo desencadearia a mesma resposta nestas células. As células foram incubadas por 15 minutos na presença de ATL-1 (1-100 nM). O tratamento com o análogo induziu a fosforilação de ERK-2, caracterizando, assim, o receptor nesta linhagem celular (Figura 7).

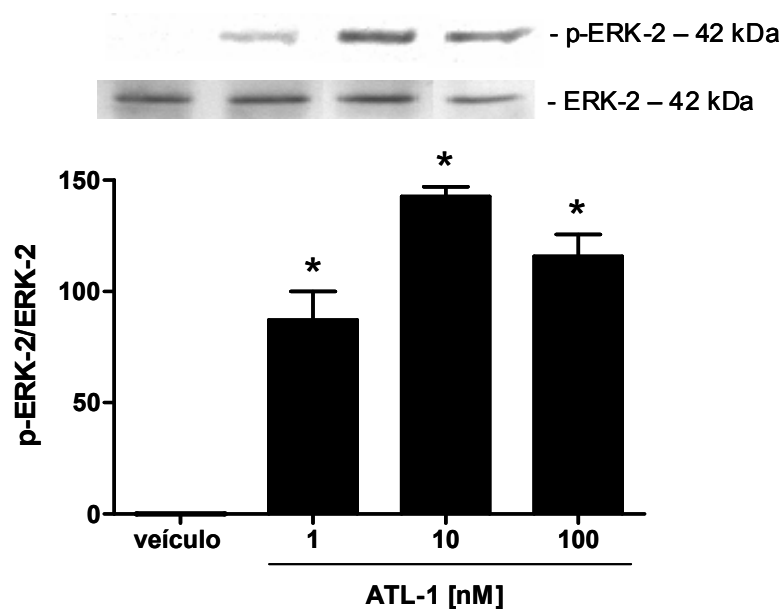


Figura 7. ATL-1 induz a fosforilação de ERK-2 em células U937. Células U937 (2×10^6 /poço) foram cultivadas em meio RPMI sem soro em placas de 24 poços e tratadas com ATL1 (1-100 nM) ou 0,02% de etanol (veículo) por 15 minutos. O lisado total foi analisado por western blot utilizando-se anticorpos específicos para p-ERK-2 e ERK-2. Os *blots* foram analisados por densitometria. Os valores de média e desvio padrão, expressos como porcentagem relativa ao grupo controle (veículo), são representativos de três experimentos idênticos e independentes. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle.

6.3 ATL-1 ativa a via da p38 MAPK em células U937

A via da p38 MAPK está envolvida em diferentes funções nos monócitos (Melissa e col., 2008). A fim de avaliarmos a modulação da ativação de monócitos pelo ATL-1, decidimos investigar uma via que seria iniciada pela ativação desta proteína quinase. A incubação das células U937 com o ATL-1 (1-100 nM) por 15 minutos induziu a fosforilação de p38, sendo significativa no grupo tratado com 100 nM em comparação com o controle (veículo) (Figura 8).

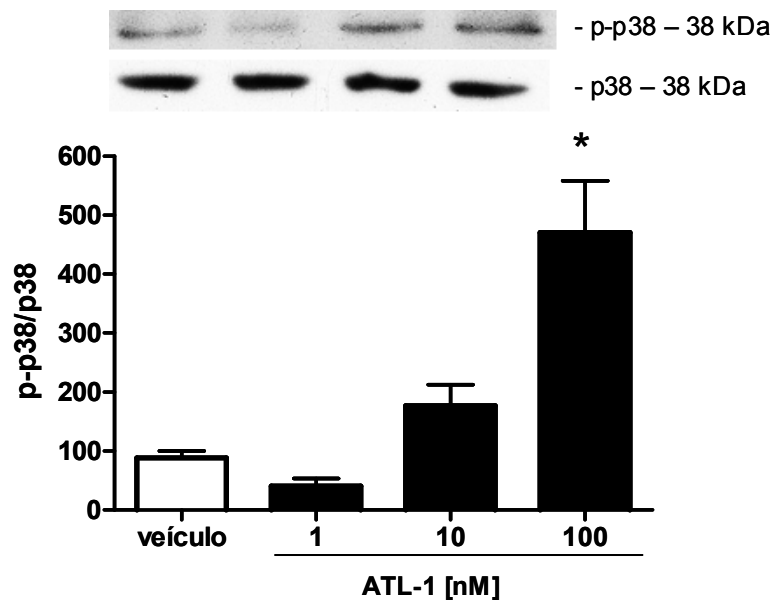


Figura 8. ATL-1 ativa a via da p38 MAPK em células U937. Células U937 (2×10^6 /poço) foram cultivadas em meio RPMI sem soro em placas de 24 poços e tratadas com ATL1 (1-100 nM) ou 0,02% de etanol (veículo) por 15 minutos. O lisado total foi analisado por western blot utilizando-se anticorpos específicos para p-p38 e p38. Os *blots* foram analisados por densitometria. Os valores de média e desvio padrão, expressos como porcentagem relativa ao grupo controle (veículo), são representativos de três experimentos idênticos e independentes. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle.

6.4 ATL-1 induz a expressão de HO-1 em células U937

A enzima HO-1 participa da modulação da resposta imune-inflamatória devido a suas propriedades antioxidativas e antiinflamatórias (Otterbein e col. 2000; Stocker e col., 1987; Loboda e col., 2008). Investigamos se o ATL-1 poderia induzir a expressão da HO-1 em células U937. Observamos que após 12 horas de incubação, o ATL-1 (1-100 nM) induziu a expressão da enzima nessas células (Figura 9). Não observamos qualquer resposta em tempos de incubação mais curtos (1-6 horas) (dados não mostrados).

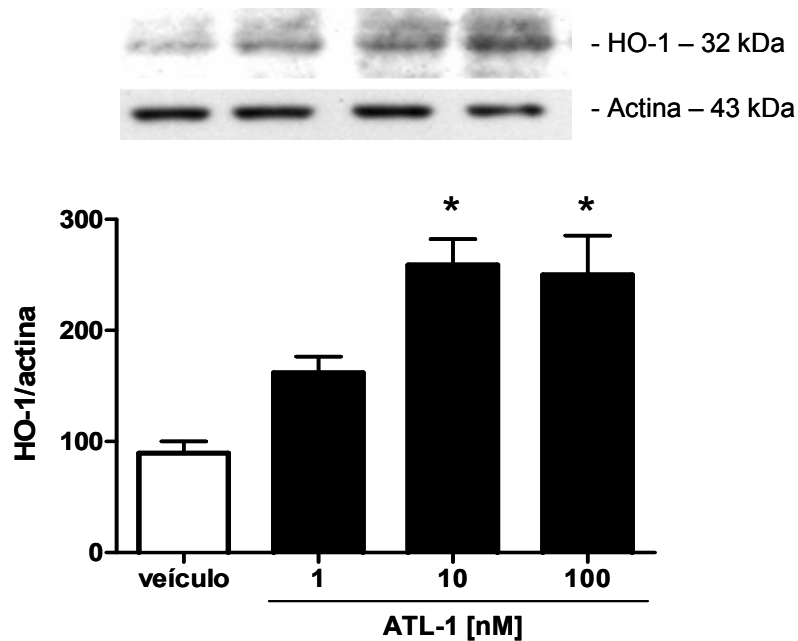


Figura 9. ATL-1 induz a expressão de HO-1 em células U937. Células U937 (2×10^6 /poço) foram cultivadas em meio RPMI sem soro em placas de 24 poços e tratadas com ATL1 (1-100 nM) ou 0,02% de etanol (veículo) por 12 horas. O lisado total foi analisado por western blot utilizando-se anticorpos específicos para HO-1 e actina. Os blots foram analisados por densitometria. Os valores de média e desvio padrão, expressos como porcentagem relativa ao grupo controle (veículo), são representativos de três experimentos idênticos e independentes. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle.

6.5 A indução da expressão da HO-1 pelo ATL-1 em células U937 é dependente da ativação da via da p38 MAPK

Diversos trabalhos mostram o envolvimento da via da p38 MAPK com a indução da HO-1 em monócitos (Ogborne e col., 2005; Rushworth e col., 2006; Naidu e col., 2008).

A fim de investigar se a indução da expressão da HO-1 pelo ATL-1 em células U937 envolvia a ativação da p38, as células foram pré-tratadas com o inibidor específico desta quinase, o SB203580 (5 μ M), e incubadas por 12 horas na presença do ATL-1 (100 nM). Conforme mostrado na figura 10, a indução da HO-1 é dependente da ativação da p38 MAPK.

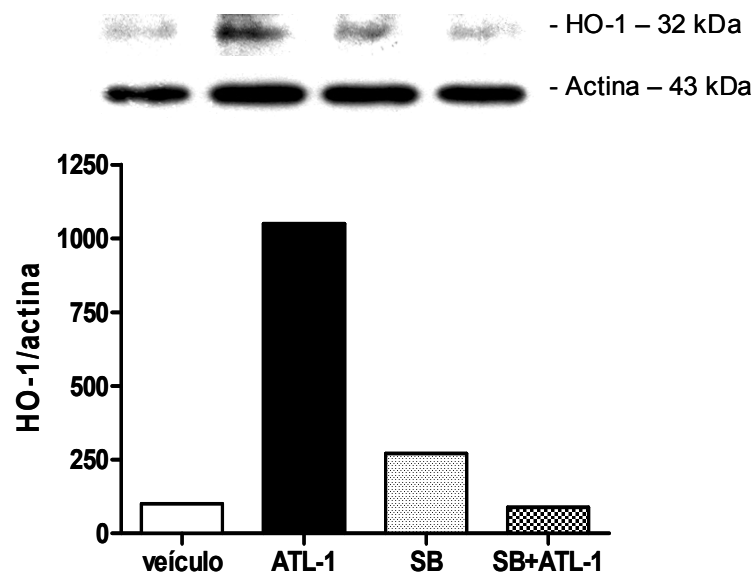


Figura 10. A indução da expressão da HO-1 pelo ATL-1 em células U937 é dependente da ativação da via da p38 MAPK. Células U937 (2×10^6 /poço) foram cultivadas em meio RPMI sem soro em placas de 24 poços, pré-tratadas ou não com SB203580 por 30 minutos e tratadas com ATL1 (100 nM) ou 0,02% de etanol (veículo) por 12 horas. O lisado total foi analisado por western blot utilizando-se anticorpos específicos para HO-1 e actina. Os *blots* foram analisados por densitometria. O gráfico representa um único experimento.

6.6 ATL-1 inibe a produção de MCP-1 por células U937 estimuladas com LPS via p38 MAPK

O efeito antiinflamatório das LXs é mediado, em parte, através da inibição da produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (Aliberti e col., 2002; Bonnans e col., 2002; Ariel e col., 2003). Avaliamos, então, se o ATL-1 (100 nM) poderia modular a secreção da quimiocina MCP-1 por células U937 estimuladas com LPS (10 ng/mL) por 24 horas. A figura 11 mostra que o tratamento com o análogo inibiu a secreção de MCP-1.

A participação da via da p38 MAPK em respostas antiinflamatórias em monócitos foi recentemente descrita (Lee e col., 2006). Utilizando o composto SB203580 (5 μ M) mostramos que a inibição da secreção de MCP-1 promovida pelo ATL-1 envolve a via da p38 MAPK (Figura 11).

Estudos anteriores mostraram o envolvimento da enzima HO-1 com a inibição da expressão gênica de MCP-1, em monócitos tratados com lisofosfatidilcolina (Shokawa e col., 2006) e da secreção desta quimiocina por macrófagos estimulados com LPS (Roach e col., 2008). Investigamos, então, a participação da HO-1 no efeito inibitório do ATL-1 sobre a secreção de MCP-1 por células U937 estimuladas com LPS. Para isso utilizamos um inibidor desta enzima, a estanho-protoporfirina IX (SnPPiX) (10 μ M). O pré-tratamento das células não reverteu o efeito inibitório do análogo (Figura 11).

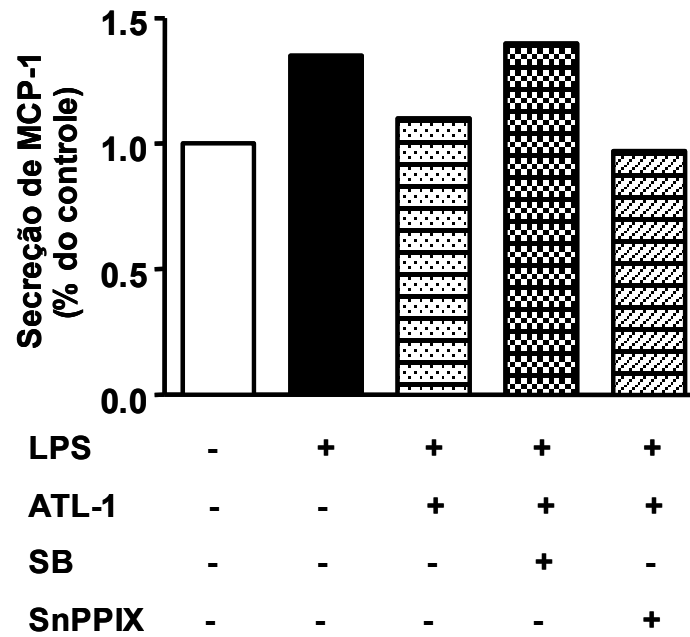


Figura 11. ATL-1 inibe a produção de MCP-1 por células U937 estimuladas com LPS via p38 MAPK. Células U937 (1×10^6 /poço) foram cultivadas em meio RPMI sem soro em placas de 24 poços e pré-tratadas com SB203580 ($5 \mu\text{M}$) ou SnPPIX ($10 \mu\text{M}$) por 30 minutos e depois incubadas com ATL1 (100 nM) por mais 30 minutos. Em seguida as células foram estimuladas com LPS (10 ng/mL) por 24 horas e o sobrenadante utilizado para dosagem da quimiocina MCP-1 pelo método de ELISA de acordo com o protocolo do fabricante (PeproTech inc.). Os resultados foram expressos como porcentagem do controle (células tratadas apenas com meio de cultura) e representam dois experimentos idênticos.

7 DISCUSSÃO

Os monócitos são células circulantes do sangue periférico envolvidas em uma diversidade de eventos fisiopatológicos, incluindo processos inflamatórios da parede vascular que podem levar à aterosclerose (Görög & Kakkar, 1987). A ativação/migração de monócitos até a parede dos vasos sanguíneos pode ser induzida por diferentes estímulos, incluindo a quimiocina MCP-1, sendo este um importante evento no desenvolvimento da aterosclerose (Ross, 1999). Em sítios ateroscleróticos, os monócitos migram através do endotélio até a camada íntima da vasculatura e diferenciam-se em macrófagos, podendo, então, internalizar lipoproteínas como os ésteres de colesterol e transformar-se em célula espumosas. Os macrófagos ativados liberam mediadores pró-inflamatórios, como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e citocinas pró-inflamatórias piorando o quadro aterosclerótico (Göran e col., 2006).

As LXs e ATL vêm se destacando como mediadores lipídicos que, diferente de outros eicosanóides, possuem ações antiinflamatórias e pró-resolução (Serhan e col., 2008). Apesar do grande número de trabalhos publicados descrevendo o papel das LXs e seus análogos em leucócitos e outros tipos celulares envolvidos em doenças inflamatórias, pouco é sabido a respeito dos mecanismos de ação que desencadeiam estas respostas.

No presente trabalho, caracterizamos, pela primeira vez, o receptor ALX na linhagem monocítica U937, através da avaliação de sua expressão gênica e protéica e de sua funcionalidade analisando a ativação de ERK-2, o que torna esta célula uma ferramenta apta para estudo dos mecanismos de ação das LXs e seus análogos sobre os monócitos.

As MAPK pertencem a uma superfamília de proteínas quinases que regulam diversas funções celulares como crescimento, apoptose, motilidade, diferenciação e resposta a estímulos ambientais (Melissa e col., 2008). Alguns estudos demonstraram o envolvimento da p38 MAPK com o desenvolvimento de doenças inflamatórias. Esta via de transdução de sinal está envolvida com a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 (Lee e col., 1994; Ajizian e col., 1999; Underwood e col., 2000) por monócitos, macrófagos e células endoteliais, e com a indução das enzimas inflamatórias COX-2 (Dean e col., 1999) e iNOS (Ajizian e col., 1999) em monócitos e macrófagos estimulados com LPS,

respectivamente. Porém, estudos mais recentes relatam o envolvimento da via da p38 MAPK com respostas antiinflamatórias em monócitos, como a indução de IL-10, uma citocina antiinflamatória, em células estimuladas com altas concentrações de SAA (proteína amilóide sérica) (Lee e col., 2006). A administração de ATL-1 em camundongos inibe a produção de TNF- α e a morte após injúria/reperfusão, o que está associado com o aumento da produção de IL-10 (Souza e col., 2007). A ativação da via p38 MAPK pelo ATL-1 em monócitos e sua relação com um aumento da produção de IL-10 estão sendo investigadas.

O efeito antiinflamatório das LXs e seus análogos envolvendo a modulação da p38 já foi descrito em alguns tipos celulares. De acordo com nossos resultados, utilizando células mesangiais humanas, McMahon e colaboradores (2000) mostraram a indução da fosforilação da p38 MAPK pela LXA₄. No entanto, em outros tipos celulares, as LXs e ATLS inibem a ativação desta quinase. Nosso grupo demonstrou, anteriormente, que o ATL-1 impede a polimerização do citoesqueleto de actina via inibição da p38 em células endoteliais estimuladas pelo VEGF, inibindo a migração celular e, com isso, a angiogênese (Cezar-de-Mello e col., 2006). Ohira e colaboradores (2004) mostraram que o ATL-1 inibe a fosforilação de p38 em neutrófilos estimulados com fMLP.

A HO-1, uma enzima com importante papel antioxidativo e antiinflamatório desencadeia seu efeito através dos produtos CO, bilirrubina e ferritina gerados a partir do catabolismo do heme (Loboda, 2008). Esta enzima apresenta um potente efeito citoprotetor em vários modelos *in vivo* e *in vitro* (Agnieszka e col, 2008). O aumento da atividade da HO-1 reduz a quimiotaxia de monócitos após sua exposição ao LDL oxidado (Ishikawa e col., 1997) e a inibição desta enzima resulta em um significativo desenvolvimento da lesão aterosclerótica em camundongos, sugerindo que os produtos da atividade da HO-1 podem funcionar como moléculas antiaterogênicas *in vivo* (Ishikawa e col., 2001). Em camundongos *knockout* para HO-1, ou selvagens nos quais sua expressão é diminuída, observa-se um aumento da formação de células espumosas, o que se correlaciona com o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio e grande liberação de citocinas inflamatórias como IL-6, MCP-1 e *keratinocyte-derived chemokine* (KC) (Orozco e col., 2007).

Nosso grupo demonstrou anteriormente que o ATL-1 induz a HO-1 em células endoteliais humanas, e esta indução promove uma redução na expressão de

proteínas de adesão (Nascimento-Silva e col., 2005). Biteman e colaboradores (2007) mostraram que a LXA₄ restaura a expressão da HO-1 em camundongos *knockout* para 12/15-LO e induz a expressão gênica da enzima em células epiteliais de córnea humana. O tratamento com o ATL-1 reduz a injúria pulmonar induzida por LPS em camundongos, sendo este efeito mediado pela indução da HO-1 pelo análogo (Jin e col., 2007). Neste trabalho mostramos que o ATL-1 é capaz de induzir a HO-1 em células U937, de forma dependente da ativação da p38 MAPK, o que é corroborado por alguns trabalhos que relacionam a ativação desta via com a indução da HO-1 em monócitos estimulados por diferentes compostos (Ogborne e col., 2005; Rushworth e col., 2006; Hsu e col., 2008; Naidu e col., 2008). Além disso, podemos sugerir a participação das isoformas p38 α e p38 β , já que estudos mostraram que o composto SB203580, usado neste trabalho, inibe somente estas isoformas, enquanto p38 γ e p38 δ não são afetadas (Cuenda e col., 1995; Davies e col., 2000).

Já foi visto por Shokawa e colaboradores (2006) que a indução da HO-1 por hemina resulta em inibição da expressão gênica de MCP-1 induzida por lisofosfatidilcolina na linhagem monocítica U937. Além disso, a indução da HO-1 em macrófagos reduz a secreção de MCP-1, IL-6, IL-10 e TNF- α estimulada por LPS (Roach e col., 2008). No presente estudo demonstramos que o ATL-1 inibe a secreção de MCP-1 por células estimuladas com LPS, efeito que é dependente da ativação de p38. Entretanto, o pré-tratamento das células com a SnPPIX não foi capaz de reverter esta resposta. A SnPPIX age como um inibidor da HO-1 por competir com o seu substrato, bloqueando a atividade da enzima em diferentes modelos (Nascimento-Silva e col., 2005). Por outro lado, uma outra porfirina, a CoPPIX pode agir como substrato para a HO-1 induzindo a sua atividade (Loboda e col. 2006). Assim, não podemos descartar a possibilidade do envolvimento da HO-1 com a inibição da secreção de MCP-1 induzida pelo ATL-1. Estudos mais aprofundados são necessários com o intuito de avaliarmos se outras concentrações da SnPPIX, ou outras porfirinas como a ZnPPIX, poderiam promover uma resposta diferente da observada. Além disso, a figura 10 mostra que a indução da HO-1 pelo ATL-1 é dependente da ativação da via p38 MAPK, e a inibição da secreção de MCP-1 por ATL-1 foi revertida quando as células foram pré-tratadas com o composto SB203580 (figura 11), indicando mais uma vez que a enzima HO-1 pode estar envolvida com o efeito inibitório do ATL-1 sobre a síntese de MCP-1 por monócitos estimulados com LPS.

A diminuição da secreção de MCP-1, induzida pelo ATL-1 em monócitos, observada em nosso trabalho, está de acordo com outros trabalhos utilizando células epiteliais humanas (Goh e col., 2001) e células mesangiais de rato (Wu e col., 2006). Já está bem descrito que a LXA₄ e seus análogos inibem a produção de várias citocinas e quimiocinas em diversos tipos celulares, como IL-8 por enterócitos (Gewirtz e col., 1998), neutrófilos (Jozsef e col., 2002) e monócitos (Bonnans e col., 2002), TNF- α por células T (Ariel e col., 2003), IL-12 por células dendríticas (Aliberti e col., 2002), IL-6 e IL-8 por fibroblastos (Sodin-Semrl e col., 2000), IL-8, IL-13 e eotaxina por eosinófilos (Starosta e col., 2008). A inibição da MCP-1 é importante na tentativa de reduzir a migração de monócitos até o sítio aterosclerótico, diminuindo a inflamação e, assim, o desenvolvimento e a progressão dessa patologia.

Os resultados apresentados neste trabalho contribuem para um melhor entendimento dos mecanismos de ativação dos monócitos, confirmando o papel antiinflamatório e pró-resolução das lipoxinas e seus análogos e sugerindo novas alternativas terapêuticas para doenças onde o componente inflamatório é importante.

8 CONCLUSÃO

No presente trabalho, nós sugerimos que a inibição da ativação de células U937 pelo ATL-1 ocorre via indução da enzima heme oxigenase-1, de maneira dependente da ativação de p38 MAPK. Nossos resultados proporcionam uma melhor compreensão dos mecanismos intracelulares envolvidos nas ações das LXs sobre os monócitos e contribuem para o desenvolvimento de novas terapias antiinflamatórias.

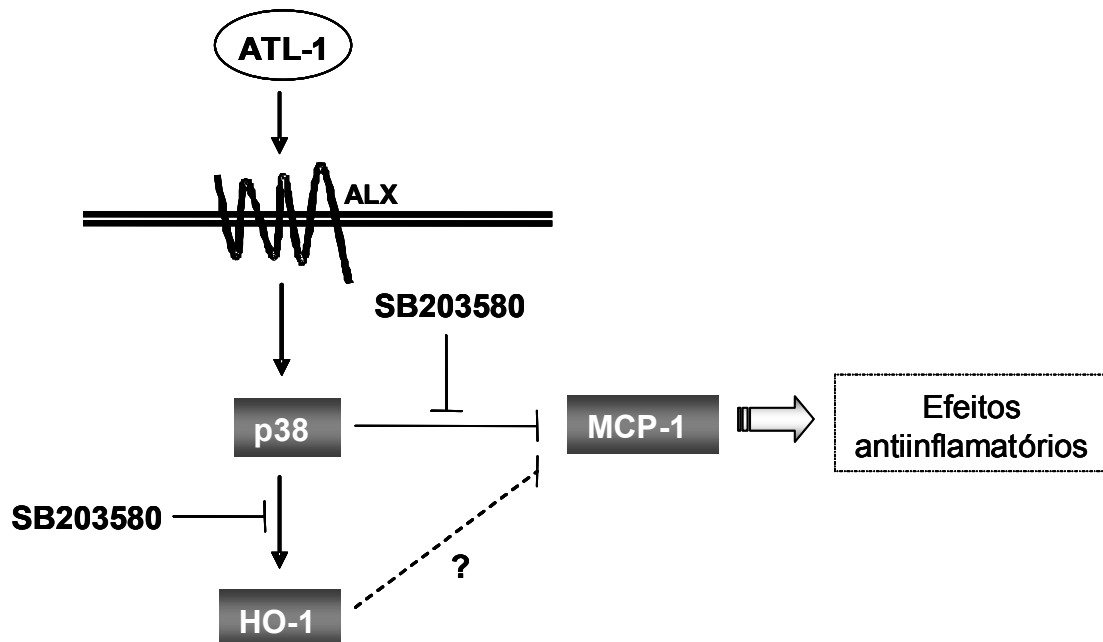


Figura 12. Esquema do mecanismo de ação do ATL-1.

REFERÊNCIAS

- Ajzian SJ, English BK & Meals EA (1999) Specific inhibitors of p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways block inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor accumulation in murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide and interferon-gamma. *J Infect Dis.*, 179(4):939-944.
- Aliberti J, Hieny S, Reis e Sousa C, Serhan CN & Sher A (2002) Lipoxin-mediated inhibition of IL-12 production by DCs: a mechanism for regulation of microbial immunity. *Nat Immunol.*, 3(1):76–82.
- Ariel A, Chiang N, Arita M, Petasis NA & Serhan CN (2003) Aspirin-triggered lipoxin A₄ and B₄ analogs block extracellular signal-regulated kinase-dependent TNF- α secretion from human T cells. *J Immunol.*, 170(12):6266-6272.
- Ariel A, Fredman G, Sun YP, Kantarci A, Van Dyke TE, Luster AD & Serhan CN (2006) Apoptotic neutrophils and T cells sequester chemokines during immune response resolution via modulation of CCR5 expression. *Nat Immunol.*, 7(11):1209-1216.
- Ballif BA & Blenis J (2001) Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals. *Cell Growth Differ.*, 12(8):397-408.
- Bandeira-Melo C, Bozza PT, Diaz BL, Cordeiro RS, Jose PJ, Martins MA & Serhan CN (2000) Cutting edge: lipoxin (LX) A₄ and aspirin-triggered 15-epi-LXA₄ block allergen-induced eosinophil trafficking. *J Immunol.*, 164(5):2267-2271.
- Birnbaum Y, Ye Y, Lin Y, Freeberg SY, Nishi SP, Martinez JD, Huang MH, Uretsky BF & Perez-Polo JR (2006) Augmentation of myocardial production of 15-epi-lipoxin-A₄ by pioglitazone and atorvastatin in the rat. *Circulation*, 114(9):929-935.
- Biteman B, Hassan IR, Walker E, Leedom AJ, Dunn M, Seta F, Laniado-Schwartzman M & Gronert K (2007) Interdependence of lipoxin A₄ and heme-oxygenase in counter-regulating inflammation during corneal wound healing. *FASEB J.*, 21(9):2257-2266.
- Bonnans C, Vachier I, Chavis C, Godard P, Bousquet J & Chanez P (2002) Lipoxins are potential endogenous antiinflammatory mediators in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.*, 165(11):1531–1535.
- Boulay F, Tardif M, Brouchon L & Vignais P (1990) The human N-formylpeptide receptor: characterization of two cDNA isolates and evidence for a new subfamily of G-coupled-protein receptors. *Biochemistry*, 29(50):11123-11133.

Brash AR (1999) Lipoxigenases: Occurrence, functions, catalysis and acquisition of substrate. *J Biol Chem.*, 274(34):23679-23682.

Brouard S, Berberat PO, Tobiasch E, Seldon MP, Bach FH & Soares MP (2002) Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide requires the activation of transcription factor NF-kappa B to protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis. *J Biol Chem.*, 277(20):17950-17961.

Cezar-de-Mello PF, Nascimento-Silva V, Villela CG & Fierro IM (2006) Aspirin-triggered Lipoxin A₄ inhibition of VEGF-induced endothelial cell migration involves actin polymerization and focal adhesion assembly. *Oncogene*, 25(1):122–129.

Cezar-de-Mello PFT, Vieira AM, Nascimento-Silva V, Villela CG, Barja-Fidalgo C & Fierro IM (2008) ATL-1, an analogue of aspirin-triggered lipoxin A₄, is a potent inhibitor of several steps in angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor. *Br J Pharmacol.*, 153(3):956-965.

Chae HJ, Chin HY, Lee GY, Park HR, Yang SK, Chung HT, Pae HO, Kim HM, Chae SW & Kim HR (2006) Carbon monoxide and nitric oxide protect against tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in osteoblasts: HO-1 is necessary to mediate the protection. *Clin Chim Acta*, 365(1-2):270-278.

Chiang N, Arita M & Serhan CN (2005) Anti-inflammatory circuitry: Lipoxin, aspirin-triggered lipoxins and their receptor ALX. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 73(3-4):163-177.

Chiang N, Serhan CN, Dahlén SE, Drazen JM, Hay DW, Rovati GE, Shimizu T, Yokomizo T & Brink C (2006) The lipoxin receptor ALX: potent ligand-specific and stereoselective actions in vivo. *Pharmacol Rev.* 58(3):463-487.

Clària J & Serhan CN (1995) Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(21):9475-9479.

Clish CB, Levy BD, Chiang N, Tai HH & Serhan CN (2000) Oxireductases in lipoxin A₄ metabolic inactivation: a novel role for 15-oxoprostaglandin 13-reductase/leukotriene B₄ 12-hydroxydehydrogenase in inflammation. *J Biol Chem.*, 275(33):25372-25380.

Coburn RF, Williams WJ, White P & Kahn SB (1967) The production of carbon monoxide from hemoglobin in vivo. *J Clin Invest.*, 46(3):346-356.

Conti P & DiGioacchino M (2001) MCP-1 and RANTES are mediators of acute and chronic inflammation. *Allergy Asthma Proc.*, 22(3):133-137.

Crofford LJ, Wilder RL, Ristimäki AP, Sano H, Remmers EF, Epps HR & Hla T (1994) Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues effects of interleukin-1, phorbol ester, and corticosteroids. *J Clin Invest.*, 93(3):1095-1101.

Cuenda A & Rousseau S (2007) p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1773(8):1358-1375.

Davies SP, Reddy H, Caivano M & Cohen P (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J.*, 351(Pt 1):95-105.

Dean JL, Brook M, Clark AR & Saklatvala J (1999). p38 mitogen-activated protein kinase regulates cyclooxygenase-2 mRNA stability and transcription in lipopolysaccharide-treated human monocytes. *J Biol Chem.*, 274(1):264-269.

Diaz BL & Arm JP (2003) Phospholipase A₂. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.*, 69(2-3):87-97.

Donnelly LE & Barnes PJ. (2001) Expression of heme oxygenase in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 24(3):295-303.

Edenius C, Haeggström J & Lindgren JA (1988) Transcellular conversion of endogenous arachidonic acid to lipoxins in mixed human platelet-granulocyte suspensions. *Biochem Biophys Res Commun.*, 157(2):801-807.

Edling Y, Sivertsson L, Andersson TB, Porsmyr-Palmertz M & Ingelman-Sundberg M (2008) Pro-inflammatory response and adverse drug reactions: mechanisms of action of ximelagatran on chemokine and cytokine activation in a monocyte in vitro model. *Toxicol In Vitro*, 22(6):1588-1594.

Efimova T, Broome AM & Eckert RL (2004) Protein kinase C delta regulates keratinocyte death and survival by regulating activity and subcellular localization of a p38delta-extracellular signal-regulated kinase1/2complex. *Mol Cell Biol.*, 24(18):8167-8183.

Fierro IM & Serhan CN (2001) Mechanisms in anti-inflammation and resolution: the role of lipoxins and aspirin-triggered lipoxins. *Braz J Med Biol Res.*, 34(5):555-566.

Fiore S, Maddox JF, Perez HD & Serhan CN (1994) Identification of a human cDNA encoding a functional high affinity lipoxin A₄ receptor. *J Exp Med.*, 180(1):253-260.

Fiore S, Ryeom SW, Weller PF & Serhan CN (1992) Lipoxin recognition sites: specific binding of labeled lipoxin A₄ with human neutrophils. *J Biol Chem.*, 267(23):16168-16176.

Fuqua CF, Akomeah R, Price JO & Adunyah SE (2008) Involvement of ERK-1/2 in IL-21-induced cytokine production in leukemia cells and human monocytes. *Cytokine*, 44(1):101-107.

Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA Jr, Luster AD, Luscinskas FW & Rosenzweig A (1999) MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature*, 398(6729):718-723.

Gewirtz AT, McCormick B, Neish AS, Petasis NA, Gronert K, Serhan CN & Madara JL. (1998) Pathogen-induced chemokine secretion from model intestinal epithelium is inhibited by lipoxin A₄ analogs. *J Clin Invest.* 101(9):1860–1869.

Godson C, Mitchell S, Harvey K, Petasis NA, Hogg N & Brady HR (2000) Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. *J Immunol.*, 164(4):1663-1667.

Goh J, Baird AW, O'Keane C, Watson RW, Cottell D, Bernasconi G, Petasis NA, Godson C, Brady HR & MacMathuna P (2001) Lipoxin A₄ and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A₄ antagonize TNF- α -stimulated neutrophil-enterocyte interactions in vitro and attenuate TNF- α -induced chemokine release and colonocyte apoptosis in human intestinal mucosa ex vivo. *J Immunol.*, 167(5):2772-2780.

Görög P & Kakkar VV (1987) Increased uptake of monocyte-treated low density lipoproteins by aortic endothelium in vivo. *Atherosclerosis*, 65(1-2):99-107.

Günther L, Berberat PO, Haga M, Brouard S, Smith RN, Soares MP, Bach FH & Tobiasch E (2002) Carbon monoxide protects pancreatic beta-cells from apoptosis and improves islet function/survival after transplantation. *Diabetes*, 51(4):994-999.

Han F, Takeda K, Yokoyama S, Ueda H, Shinozawa Y, Furuyama K & Shibahara S (2005) Dynamic changes in expression of heme oxygenases in mouse heart and liver during hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun.*, 338(1):653-659.

Hansson GK, Robertson AK & Söderberg-Nauclér C (2006) Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol.*, 1:297–329.

Hayashi M & Lee JD (2004) Role of the BMK1/ERK5 signaling pathway: lessons from knockout mice. *J Mol Med.*, 82(12):800–808.

Hayashi S, Takamiya R, Yamaguchi T, Matsumoto K, Tojo SJ, Tamatani T, Kitajima M, Makino N, Ishimura Y & Suematsu M (1999) Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. *Circ Res.*, 85(8):663-671.

Hsu HY, Chu LC, Hua KF & Chao LK (2008) Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of curcumin within LPS-stimulated human monocytes. *J Cell Physiol.*, 215(3):603–612.

Ishikawa K, Navab M, Leitinger N, Fogelman AM & Lusis AJ (1997) Induction of heme oxygenase-1 inhibits the monocyte transmigration induced by mildly oxidized LDL. *J Clin Invest.*, 100(5):1209-1216.

Ishikawa K, Sugawara D, Goto J, Watanabe Y, Kawamura K, Shiomi M, Itabe H & Maruyama Y (2001) Heme oxygenase-1 inhibits atherogenesis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Circulation*, 104(15):1831-1836.

Jayawickreme SP, Gray T, Nettesheim P & Eling T (1999) Regulation of 15-lipoxygenase expression and mucus secretion by IL-4 in human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol.* 276(4 Pt 1):L596-L603.

Jiang Y, Beller DI, Frenzl G & Graves DT (1992) Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol.*, 148(8):2423-2438.

Jin SW, Zhang L, Lian QQ, Liu D, Wu P, Yao SL & Ye DY (2007) Posttreatment with aspirin-triggered lipoxin A₄ analog attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice: the role of heme oxygenase-1. *Anesth Analg.* 104(2):369-377.

Johansson N, Ala-aho R, Uitto V, Grénman R, Fusenig NE, López-Otín C & Kähäri VM (2000) Expression of collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) by transformed keratinocytes is dependent on the activity of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Cell Sci.*, 113 Pt2:227–235.

Jozsef L, Zouki C, Petasis NA, Serhan CN & Filep JG (2002). Lipoxin A₄ and aspirin-triggered 5-epi-lipoxin A₄ inhibit peroxynitrite formation, NF-κB and AP-1 activation, and IL-8 gene expression in human leukocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(20):3266–3271.

Junttila MR, Ala-Aho R, Jokilehto T, Peltonen J, Kallajoki M, Grenman R, Jaakkola P, Westermarck J & Kähäri VM (2007) p38alpha and p38delta mitogen-activated protein kinase isoforms regulate invasion and growth of head and neck squamous carcinoma cells. *Oncogene*, 26(36):5267–5279.

Junttila MR, Li SP & Westermarck J (2008). Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J.*, 22(4):954–965.

Keyse SM & Tyrrell RM (1989) Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86(1):99-103.

Lee HY, Kim MK, Park KS, Shin EH, Jo SH, Kim SD, Jo EJ, Lee YN, Lee C, Baek SH & Bae YS (2006) Serum Amyloid A induces Contrary Immune Responses via Formyl Peptide Receptor-Like 1 in Human Monocytes *Mol Pharmacol.* 70(1):241–248.

Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW, Strickler JE, McLaughlin MM, Siemens IR, Fisher SM, Livi GP, White JR, Adams JL & Young PR (1994). A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*, 372(6508):739-746.

Li SP, Junttila MR, Han J, Kähäri VM, & Westermarck J (2003) p38 Mitogen-activated protein kinase pathway suppresses cell survival by inducing dephosphorylation of mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase 1,2. *Cancer Res.*, 63(13):3473–3477.

Liu XM, Chapman GB, Peyton KJ, Schafer AI & Durante W (2002) Carbon monoxide inhibits apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.*, 55(2):396-405.

Loboda A, Jazwa A, Grochot-Przeczek A, Rutkowski AJ, Cisowski J, Agarwal A, Jozkowicz A & Dulak J (2008) Heme Oxygenase-1 and the Vascular Bed: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxid Redox Signal.*, 10(10):1767-1812.

Machado FS, Johndrow JE, Esper L, Dias A, Bafica A, Serhan CN & Aliberti J (2006) Anti-inflammatory actions of lipoxin A₄ and aspirin-triggered lipoxin are SOCS-2 dependent. *Nat Med.*, 12(3):330-334.

Maddox JF & Serhan CN (1996) Lipoxin A₄ and B₄ are potent stimuli for human monocyte migration and adhesion: selective inactivation by dehydrogenation and reduction. *J Exp Med.*, 183(1):137-146.

Maddox JF, Hachicha M, Takano T, Petasis NA, Fokin VV & Serhan CN (1997) Lipoxin A₄ stable analogs are Potent mimetics that stimulate human monocytes and THP-1 Cells via a G-protein-linked lipoxin A₄ Receptor. *J Biol Chem.*, 272(11):6972-6978.

Maines MD, Eke BC & Zhao X (1996) Corticosterone promotes increased heme oxygenase-2 protein and transcript expression in the newborn rat brain. *Brain Res.*, 722(1-2):83-94.

Maines MD, Trakshel GM & Kutty RK. (1986) Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase: only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem.*, 261(1):411-419.

McMahon B, Stenson C, McPhillips F, Fanning A, Brady HR & Godson C (2000) Lipoxin A₄ Antagonizes the Mitogenic Effects of Leukotriene D₄ in human renal mesangial Cells. Differential Activation of MAP Kinases Through Distinct Receptors. *J Biol Chem.*, 275(36):27566-27575.

Melgarejo E, Medina MA, Sánchez-Jiménez F & Urdiales JL (2009) Monocyte chemoattractant protein-1: A key mediator in inflammatory processes. *Int J Biochem Cell Biol.*, 41(5):998-1001.

Meloche S & Pouyssegur J (2007) The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1-to S-phase transition. *Oncogene*, 26(22):3227-3239.

Montecucco F, Burger F, Pelli G, Poku NK, Berlier C, Steffens S & Mach F (2009) Statins inhibit C-reactive protein-induced chemokine secretion, ICAM-1 upregulation and chemotaxis in adherent human monocytes. *Rheumatology (Oxford)*, 48(3):233-242.

Morita T, Mitsialis SA, Koike H, Liu Y & Kourembanas S (1997) Carbon monoxide controls the proliferation of hypoxic vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.*, 272(52):32804-32809.

Morse D & Choi AM (2002) Heme Oxygenase-1: The “Emerging Molecule” has Arrived. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 27(1):8-16.

Murphy PM, Ozçelik T, Kenney RT, Tiffany HL, McDermott D & Francke U (1992) A structural homologue of the N-formyl peptide receptor. Characterization and chromosome mapping of a peptide chemoattractant receptor family. *J Biol Chem.*, 267(11):7637-7643.

Naidu S, Wijayanti N, Santoso S, Kietzmann T & Immenschuh S (2008) An atypical NF- κ -B regulated pathway mediates phorbol ester-dependent heme-oxygenase-1 gene activation in monocytes. *J Immunol.*, 181(6):4113–4123.

Nascimento-Silva V, Arruda MA, Barja-Fidalgo C & Fierro IM (2007). Aspirin-triggered lipoxin A₄ blocks reactive oxygen species generation in endothelial cells: a novel antioxidative mechanism. *Thromb Haemost.*, 97(1):88-98.

Nascimento-Silva V, Arruda MA, Barja-Fidalgo C, Villela CG & Fierro IM (2005). Novel lipid mediator aspirin-triggered lipoxin A₄ induces heme oxygenase-1 in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 289(3):C557-C563.

Nassar GM, Morrow JD, Roberts LJ 2nd, Lakkis FG & Badr KF (1994) Induction of 15-lipoxygenase by interleukin-13 in human blood monocytes. *J Biol Chem.*, 269(44):27631-27634.

Noma H, Kato T, Fujita H, Kitagawa M, Yamano T & Kitagawa S (2008) Calpain inhibition induces activation of the distinct signalling pathways and cell migration in human monocytes. *Immunology*, Dec 23. [Epub ahead of print].

O'Hayre M, Salanga CL, Handel TM & Allen SJ (2008) Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment. *Biochem J.*, 409(3):635–649.

Ogborne RM, Rushworth SA & O'Connell MA (2005) Alpha-lipoic acid-induced heme oxygenase-1 expression is mediated by nuclear factor erythroid 2-related factor 2 and p38 mitogen-activated protein kinase in human monocytic cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 25(10):2100-2105.

Ohira T, Bannenberg G, Arita M, Takahashi M, Ge Q, Van Dyke TE, Stahl GL, Serhan CN & Badwey JA (2004) A Stable aspirin-Triggered Lipoxin A₄ Analog Blocks Phosphorylation of Leukocyte-Specific Protein 1 in Human Neutrophils. *J Immunol.*, 173(3):2091-2098.

Ollinger R, Yamashita K, Bilban M, Erat A, Kogler P, Thomas M, Csizmadia E, Usheva A, Margreiter R & Bach FH (2007) Bilirubin and biliverdin treatment of atherosclerotic diseases. *Cell Cycle*, 6(1):39-43.

Orozco LD, Kapturczak MH, Barajas B, Wang X, Weinstein MM, Wong J, Deshane J, Bolisetty S, Shaposhnik Z, Shih DM, Agarwal A, Lusis AJ & Araujo JA (2007) Heme oxygenase-1 expression in macrophages plays a beneficial role in atherosclerosis. *Circ Res.*, 100(12):1703-1711.

- Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, Davis RJ, Flavell RA & Choi AM (2000) Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med.*, 6(4):422-428.
- Pae HO, Oh GS, Choi BM, Chae SC, Kim YM, Chung KR & Chung HT (2004) Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 suppresses T cell proliferation via inhibition of IL-2 production. *J Immunol.*, 172(8):4744-4751.
- Papayianni A, Serhan CN & Brady HR (1996) Lipoxin A₄ and B₄ inhibit leukotriene-stimulated interactions of human neutrophils and endothelial cells. *J Immunol.*, 156(6):2264-2272.
- Parkinson JF (2006) Lipoxin and synthetic lipoxin analogs: An overview of anti-inflammatory functions and new concepts in immunomodulation and inflammation. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 5(2):91-106
- Paul-Clark MJ, Van Cao T, Moradi-Bidhendi N, Cooper D & Gilroy DW (2004). 15-epi-lipoxin A₄ mediated induction of nitric oxide explains how aspirin inhibits acute inflammation. *J Exp Med.*, 200(1):69–78.
- Petrache I, Otterbein LE, Alam J, Wiegand GW & Choi AM (2000) Heme oxygenase-1 inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in cultured fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, 278(2):L312-L319.
- Pouliot M, McDonald PP, Borgeat P & McColl SR (1994) Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor stimulates the expression of the 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) in human neutrophils. *J Exp Med.*, 179(4):1225-1232.
- Raman M, Chen W & Cobb MH (2007) Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*, 26(22):3100–3112.
- Reape T & Groot P (1999) Chemokines and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 147(2):213–225.
- Ring WL, Riddick CA, Baker JR, Munafo DA & Bigby T D (1996) Lymphocytes stimulate expression of 5-lipoxygenase and its activating protein in monocytes in vitro via granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-3. *J Clin Invest.*, 97(5):1293-1301.
- Roach JP, Moore EE, Partrick DA, Damle SS, Silliman CC, McIntyre RC Jr & Banerjee A (2008) Heme oxygenase 1 induction in macrophages by a hemoglobin-based oxygen carrier reduces endotoxin-stimulated cytokine secretion. *Shock*, 31(3):251-257.
- Ross R (1999) Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med.*, 340(2):115-126.

Roux PP & Blenis J (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 68(2):320–344.

Rubinfeld H & Seger R (2005) The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. *Mol Biotechnol.*, 31(12):151-174.

Rushworth SA, Chen XL, Mackman N, Ogborne RM & O'Connell MA (2005) Lipopolysaccharide-induced heme oxygenase-1 expression in human monocytic cells is mediated via Nrf2 and protein kinase C. *J Immunol.*, 175(7):4408-4415.

Rushworth SA, Ogborne RM, Charalambos CA & O'Connell MA (2006) Role of protein kinase C delta in curcumin-induced antioxidant response element-mediated gene expression in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun.*, 341(4):1007-1016.

Ryter SW, Otterbein LE, Morse D & Choi AM (2002) Heme-oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Mol Cell Biochem.*, 234-235(1-2):249-263.

Samuelsson B, Dahlén SE, Lindgren JA, Rouzer CA & Serhan CN (1987) Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science.*, 237(4819):1171-1176.

Schaldach CM, Riby J & Bjeldanes LF (1999) Lipoxin A₄: A New Class of Ligand for the Ah Receptor. *Biochemistry*, 38(23):7594-7600.

Schwab JM & Serhan CN (2006) Lipoxins and new lipid mediators in the resolution of inflammation. *Curr Opin Pharmacol.*, 6(4):414-420.

Serhan CN & Romano M (1995) Lipoxin biosynthesis and actions: role of the human platelet LX-synthase. *J Lipid Mediat Cell Signal.*, 12(2-3):293-306.

Serhan CN & Sheppard KA (1990) Lipoxin formation during human neutrophil-platelet interactions. Evidence for the transformation of leukotriene A₄ by platelet 12-lipoxygenase in vitro. *J Clin Invest.*, 85(3):772-780.

Serhan CN (2005) Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 73 (3-4):141-162.

Serhan CN, Chiang N & Van Dyke TE (2008) Resolving inflammation: Dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol.*, 8(5):349-361.

Serhan CN, Fiore S, Brezinski DA & Lynch S (1993) Lipoxin A₄ metabolism by differentiated HL-60 cells and human monocytes: conversion to novel 15-oxo and dihydro products. *Biochemistry*, 32(25):6313-6319.

Serhan CN, Hamberg M & Samuelsson B (1984) Lipoxins: Novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(17):5335-5339.

- Serhan CN, Maddox JF, Petasis NA, Akritopoulou-Zanze I, Papayianni A, Brady HR, Colgan SP & Madara JL (1995) Design of lipoxin A₄ stable analogs that block transmigration and adhesion of human neutrophils. *Biochemistry*, 34(44):14609-14615.
- Shin WS, Szuba A & Rockson SG (2002) The role of chemokines in human cardiovascular pathology: Enhanced biological insights *Atherosclerosis*, 160(1):91–102.
- Shokawa T, Yoshizumi M, Yamamoto H, Omura S, Toyofuku M, Shimizu Y, Imazu M & Kohno N (2006) Induction of heme oxygenase-1 inhibits monocyte chemoattractant protein-1 mRNA expression in U937 cells *J Pharmacol Sci.*, 100(2):162–166.
- Sigal E & Conrad DJ (1994) Human 15-lipoxygenase: a potential effector molecule for interleukin-4. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.*, 22:309-316.
- Simões RL & Fierro IM (2005) Involvement of the Rho-Kinase/Myosin Light Chain Kinase Pathway on Human Monocyte Chemotaxis Induced by ATL-1, an Aspirin-Triggered Lipoxin A₄ Synthetic Analog. *J Immunol.*, 175(3):1843-1850.
- Sodin-Semrl S, Taddeo B, Tseng D, Varga J & Fiore S (2000) Lipoxin A₄ inhibits IL-1-induced IL-6, IL-8, and matrix metalloproteinase-3 production in human synovial fibroblasts and enhances synthesis of tissue inhibitors of metalloproteinases. *J Immunol.*, 164(5):2660–2666.
- Song R, Mahidhara RS, Zhou Z, Hoffman RA, Seol DW, Flavell RA, Billiar TR, Otterbein LE & Choi AM (2004) Carbon monoxide inhibits T lymphocyte proliferation via caspase-dependent pathway. *J Immunol.*, 172(2):1220-1226.
- Souza DG, Fagundes CT, Amaral FA, Cisalpino D, Sousa LP, Vieira AT, Pinho V, Nicoli JR, Vieira LQ, Fierro IM & Teixeira MM (2007) The Required Role of Endogenously Produced Lipoxin A₄ and Annexin-1 for the Production of IL-10 and Inflammatory Hyporesponsiveness in Mice. *J Immunol.*, 179(12):8533-8543.
- Starosta V, Pazdrak K, Boldogh I, Svider T & Kurosky A (2008) Lipoxin A₄ counterregulates GM-CSF signaling in eosinophilic granulocytes. *J Immunol.*, 181(12):8688-8699.
- Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN & Ames BN (1987) Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*, 235(4792):1043-1046.
- Taylor PC, Peters AM, Paleolog E, Chapman PT, Elliott MJ, McCloskey R, Feldmann M & Maini RN (2000) Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 43(1):38–47.
- Tenhunen R, Marver HS & Schmid R. (1968) The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 61(2):748-755.

Underwood DC, Osborn RR, Bochnowicz S, Webb EF, Rieman DJ, Lee JC, Romanic AM, Adams JL, Hay DW & Griswold DE (2000) SB 239063, a p38 MAPK inhibitor, reduces neutrophilia, inflammatory cytokines, MMP-9, and fibrosis in lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, 279(5):L895-L902.

Vane JR, Bakhle YS & Botting RM (1998) Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 38:97-120.

Wagener FA, Volk HD, Willis D, Abraham NG, Soares MP, Adema GJ & Figdor CG. (2003) Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol Rev.*, 55(3):551-571.

Walsh CE, Waite BM, Thomas MJ & DeChatelet LR (1981) Release and metabolism of arachidonic acid in human neutrophils. *J Biol Chem.*, 256(14):7228-7234.

Wu SH, Wu XH, Lu C, Dong L, Zhou GP & Chen ZQ (2006) Lipoxin A₄ inhibits connective tissue growth factor-induced production of chemokines in rat mesangial cells. *Kidney Int.* 69(2):248-256.

Wu SH, Wu XH, Lu C, Dong L & Chen ZQ (2006) Lipoxin A₄ inhibits proliferation of human lung fibroblasts induced by connective tissue growth factor. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 34(1):65-72.

Ye RD, Cavanagh SL, Quehenberger O, Prossnitz ER & Cochrane CG (1992) Isolation of a cDNA that encodes a novel granulocyte N-formyl peptide receptor. *Biochem Biophys Res Commun.*, 30;184(2):582-589.

Ye Y, Lin Y, Perez-Polo JR, Uretsky BF, Ye Z, Tieu BC & Birnbaum Y (2008) Phosphorylation of 5-lipoxygenase at Ser⁵²³ by protein kinase A determines whether pioglitazone and atorvastatin induce proinflammatory leukotriene B₄ or anti-inflammatory 15-epi-lipoxin A₄ production. *J Immunol.*, 181(5):3515-3523.

Yoshida T, Biro P, Cohen T, Muller RM & Shibahara S (1988) Human heme oxygenase cDNA and induction of its mRNA by hemin. *Eur J Biochem.*, 171(3):457-461.

Zebisch A, Czernilofsky AP, Keri G, Smigelskaite J, Sill H & Troppmair J (2007) Signaling through RAS-RAF-MEK-ERK: from basics to bed side. *Curr Med Chem.*, 14(5):601-623.