

- Motilidade celular

25.001

INVOLVEMENT OF THE RHO-KINASE/MLCK PATHWAY ON HUMAN MONOCYTE CHEMOTAXIS INDUCED BY ATL-1, AN ASPIRIN-TRIGGERED LXA₄ SYNTHETIC ANALOG. Simões, R. L.; Fierro, I. M. Farmacologia e Psicobiologia UERJ

Objetivo:

Monocytes are hematopoietic cells that, in 48 hours, constitute the predominant cellular type at the inflammatory sites and are involved in different biologic events such as cancer and angiogenesis. Lipoxins (LX) are lipid mediators, arachidonic acid metabolites, able to activate monocytes, inducing chemotaxis of these cells. We have previously demonstrated that 15-epi-16-(*para*-fluoro)-phenoxy-lipoxin A₄ (ATL-1), a stable 15-epi-lipoxin A₄ analog, induces monocyte chemotaxis in a concentration-dependent fashion, via the G-protein-linked LXA₄ receptor (ALXR). In this study, we sought to investigate the signaling pathways downstream this event.

Métodos e Resultados:

Human peripheral blood monocytes were isolated by density centrifugation methods with a purity of >90%. After exposure of the cells to ATL-1 (100 nM) for 15 min, myosin light chain kinase (MLCK) phosphorylation was evident, as observed by immunoprecipitation and western blot assays. This effect was inhibited by PD98059 (10 μM) and Y-27632 (10 μM), specific inhibitors of MEK1/2 and Rho-kinase, respectively. Using a modified Boyden chamber, we demonstrated that the specific MLCK inhibitor, ML-7 (300 nM), and Y-27632 (10 μM) abrogated monocyte chemotaxis stimulated by the analog, confirming the central role of this pathway in ATL-1 action. Furthermore, we showed, by cytochemistry assay, that actin cytoskeleton reorganization induced by ATL-1 was also blocked by pretreatment of the cells with Y-27632 (10 μM).

Conclusões:

Together, these results indicate that ATL-1 acts as a potent monocyte chemoattractant via Rho-kinase and MLCK. The present study clarifies some of the mechanisms involved in the activation of monocytes by lipoxins and opens new avenues for investigation of these checkpoint controllers of inflammation.

25.002

AÇÃO DE INIBIDORES DE MIOSINA II SOBRE A MOTILIDADE DE FIBROBLASTOS MUTANTES PARA MIOSINA VA. Borges, J.; Ishikawa, H. **; Borges, A. **; Espreafico, E. M. Biologia Celular e Molecular USP

Objetivo:

Miosina Va, uma miosina não convencional, está implicada em diversas funções celulares, estando melhor caracterizada sua relação com o transporte de vesículas intracelulares. Pesquisas envolvendo sua participação em outros eventos, como na migração celular, são raras. Para verificar a participação da miosina Va na migração celular, utilizamos N-Benzyl-p-toluenesulfonamide (BTS), um inibidor da atividade ATPásica de membros da superfamília de miosinas e ML9 (1-(5-chloronaphthalene-1-sulfonyl)-1H-hexahydro-1,4-diazepine), um inibidor específico conhecido por afetar a quinase que fosforila a cadeia leve de miosina II (MLCK).

Métodos e Resultados:

Utilizamos 2,3-butanedione monoxime (BDM), inibidor bem caracterizado de miosina II, mas que não age sobre a atividade atpásica de outras miosinas. Estes três inibidores foram testados, através de ensaios de scraping, em uma linhagem de fibroblastos humanos mutantes para o gene que codifica para miosina Va e em uma linhagem de fibroblastos humanos com uma expressão normal desta proteína.

Conclusões:

Fibroblastos tratados com ML9, BDM ou BTS apresentaram-se fusiformes com lamelipodios e filopodios pouco evidentes, características associadas com diminuição da capacidade migratória. Todas as linhagens celulares analisadas tiveram sua migração afetada após o emprego de ML9, BTS e BDM. Células mutantes para miosina Va apresentaram uma inibição total da migração celular quando mantidas em meio de cultura ao qual foi adicionado BDM (10 mM). Por outro lado, fibroblastos não mutantes para miosina Va tratados com esta droga mantiveram parte de sua

capacidade migratória, quando comparados com células não tratadas com BDM, indicando que miosina Va possa ter um papel na migração destas células *in vitro*.