

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

Participação das quimiocinas MIP-1 α e MIP-2 no recrutamento de neutrófilos na inflamação de origem imune.

Mecanismos envolvidos na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por KC e MIP-2

Cleber Douglas Lucinio Ramos

**Ribeirão Preto
2006**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

“Participação das quimiocinas MIP-1 α e MIP-2 no recrutamento de neutrófilos na inflamação de origem imune.”

“Mecanismos envolvidos na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por KC e MIP-2 ”

Cleber Douglas Lucinio Ramos

**Ribeirão Preto
2006**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

“Participação das quimiocinas MIP-1 α e MIP-2 no recrutamento de neutrófilos na inflamação de origem imune.”

“Mecanismos envolvidos na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por KC e MIP-2 ”

Tese apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para a obtenção de título de Doutor em Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha

Ribeirão Preto
2006

Ramos, Cleber Douglas Lucinio

Participação das quimiocinas MIP-1 α e MIP-2 no recrutamento de neutrófilos na inflamação de origem imune. Mecanismos envolvidos na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por KC e MIP-2.

Ribeirão Preto, 2006

148p

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Departamento de Farmacologia.

Orientador: Cunha, Fernando de Queiroz.

1. Neutrófilos – 2. OVA – 3. Quimiocinas – 4. Inflamação – 5. Migração.

Trabalho realizado no laboratório de inflamação do departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro da CAPES, FAPESP, CNPq e PRONEX.

*À minha esposa Lidiane Gaban
Por estar sempre presente
Em todos os momentos de minha vida
Tanto nos momentos de alegria
Como na superação dos obstáculos
Além do imenso apoio
na realização deste trabalho!*

*Aos meus pais e minha irmã
Pela presença constante em minha vida
E pelo apoio na
realização de meus sonhos*

*“Um caminho de mil quilômetros começa com o
primeiro passo.”
Lao Tse*

Mudam-se os tempos, mudam-se as vontades,
Muda-se o ser, muda-se a confiança;
Todo o mundo é composto de mudança,
Tomando sempre novas qualidades.

Continuamente vemos novidades,
Diferentes em tudo da esperança;
Do mal ficam as mágoas na lembrança,
E do bem, se algum houve, as saudades.

O tempo cobre o chão de verde manto,
Que já coberto foi de neve fria,
E em mim converte em choro o doce canto.

E, afora este mudar-se cada dia,
Outra mudança faz de mor espanto:
Que não se muda já como soía.

Luís de Camões

*Você não pode mudar o passado...
... Mas pode mudar o amanhã
com os seus atos de hoje.*

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Fernando Cunha**, pela sua orientação durante meu desenvolvimento profissional desde o período de iniciação científica até o doutoramento. Agradeço também pela amizade, confiança e paciência, bem como sua orientação e ensinamentos que muito contribuíram com meu amadurecimento científico e profissional.

Ao **Prof. Dr. João Santana**, pelos ensinamentos em imunologia, acompanhando-me como assessor por todo o decorrer de meu doutoramento e direta participação em meu trabalho. Agradeço também pela pronta disponibilidade em participar de minha banca examinadora.

À **Profª Drª Glória E. P. de Souza**, pelo carinho e atenção nas correções deste trabalho e pela disponibilidade durante o decorrer deste curso.

Aos membros da banca, **Prof. Dr Ronaldo A. Ribeiro** e **Profª Drª Sônia Jancar Negro**, por terem prontamente aceito o convite para participarem de minha banca examinadora.

Ao **Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira**, pela disponibilidade, amizade e ensinamentos.

Ao **Prof. Dr. Carlos Parada** pelo auxílio e participação em minha jornada.

À amiga **Profª Drª Karla S. Fernandes**, pelo companheirismo e pela amizade no desenvolvimento deste trabalho.

Ao amigo **Prof. Dr. Cláudio Canetti**, pelas valorosas contribuições que me permitiram dar continuidade no desenvolvimento de seu trabalho de doutorado.

Aos companheiros de laboratório, **Michel, Diego, Zeca, Waldiceu, Thiagão, Luiz Fernando, Thiago Cunha, Fernando Spiller, Henrique Lemos, André, Daniel, Igor**

Às companheiras de laboratórios, **Sandra Fukada, Suzana, Dani Sachs, Celina, Cris, Dani Seco, Andressa, Ana Tereza, Renata, Tânia, Marcinha, Paulinha, Mani, Joice, Beth, Vanessa, Sandra Mara, Djane, Thais**

Aos amigos de hoje e sempre, **Fabricio Rio-Santos, Nicolau E. Heloy Neto, Pedro Roosevelt, Sandra H.P. de Oliveira, Marta Chagas, Tarcília A. da Silva, Márcia Valéria, Jane Souto, Alessandra Cheraim, Joice Cunha, Osmar Cardoso, Tânia Santodomingo, Marco Andrey, Cláudia Benjamin.**

Aos companheiros de pós-graduação, **Cláudia, Valkiria, Patrícia, Marcelo, Fabrício Mineiro, Carlos, Janaina, Renato, Valéria, Quintino, Ingrid, Denis, Fabrício Calvo, João Walter, Sabrinah, Débora, Márcio**. Agradeço a todos pelo companheirismo no curso.

Aos técnicos do laboratório, **Fabíola Mestriner, Giuliana, Kátia, Diva, Ieda e Serginho**. Obrigado por toda e qualquer cooperação em meu trabalho!

Aos funcionários do departamento de Farmacologia, **Acácio, Sônia, Fátima, Ramon, Eliana, Inês, Eleni, Afonso, Marquinhos, Zé Carlos, Orlando e Tadeu**.

Aos docentes do departamento de Farmacologia, os quais sempre dispostos a auxiliar-me em qualquer que fosse minha dúvida, muito me ajudaram no amadurecimento científico. Em especial ao **Prof. Dr. Willian Alves do Prado**, ao **Prof. Dr. Fernando Morgan A. Corrêa**, ao **Prof. Dr. Francisco S. Guimarães**, ao **Prof. Dr. Alexandre P. Conrado**, ao **Prof. Dr. José Eduardo Tânus dos Santos** os quais participaram diretamente de minha formação científica.

Aos meus amigos dos momentos de lazer, **Lawrence (Cupim), Juliano (Godô), Silas (Plínio ou Igor), Edgar (Eddie), Marcelo, Marco (Jubileu), Dori, Emerson e Silvinha, Alexandre e Aline**.

À **CAPES, FAPESP, CNPq e Pronex** pelo apoio financeiro, sem o qual este trabalho não seria possível.

À você **leitor** por estar prestigiando este trabalho. Agradeço pelo teu interesse.

Agradeço a **Ele**, o qual esteve presente em todos os momentos, sempre a conduzir meus passos.

Enfim, a todos que de alguma maneira seja direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Deixo aqui os meus mais sinceros agradecimentos!

ABREVIATURAS

AA: Ácido araquidônico
APC: Células apresentadoras de antígeno
ANOVA: Análise de variância
Ca²⁺: Cálcio
CFA: Adjuvante de Freud completo
ConA: Concanavalina A
C5a: Quinto fragmento do sistema complemento ativado
DTH: Hipersensibilidade do tipo tardia
EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA: Ensaio imunossorbente de ligação enzimática
ENA: Peptídeo ativador de neutrófilos derivado de células epiteliais
ELR: Glutamato-leucina-arginina
GM-CSF: Fator estimulador de colônia de granulócito e monócito
GRO: Gene relacionado a oncogene
i.p.: intraperitoneal
ICAM-1: Molécula de adesão intracelular 1
IL: Interleucina (S)
IFN- γ : Interferon- γ
kg: quilograma (s)
L: litro (s)
LPS: Lipopolissacarídeo
LTB₄: Leucotrieno B₄
LO: Lipoxigenase
L-selectina: Selectina leucocitária
MCP: Proteína quimiotática para monócitos
MIP: Proteína inflamatória de macrófagos
MK886: Inibidor da síntese de leucotrieno B₄
MHC: Complexo de histocompatibilidade principal
MHC-I: Moléculas do MHC de classe I
MHC-II: Moléculas do MHC de classe II
mg: miligrama (s)
mL: mililitro (s)

ng: nanograma
OPD: o-fenilenediamina dihidroclorato
OVA: Ovoalbumina
p55: Receptor do TNF- α
PAF: Fator de agregação plaquetária
PBS: Tampão salina fosfato
PECAM: Molécula de adesão celular endotelial e plaquetária
PLA₂: Fosfolipase A2
PMNs: Polimorfonucleares
P-selectina: Selectina plaquetária
pg: picograma (s)
RANTES: Citocina regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais
s.c.: subcutâneo
Th: Linfócito T helper
TNF: Fator de necrose tumoral
TNFR: Receptor do fator de necrose tumoral
VCAM-1: Molécula de adesão vascular 1
v.o: via oral
 μ L: microlitro
 μ g: micrograma

ÍNDICE

Agradecimentos.....	8
Abreviaturas.....	11
Introdução.....	19
1. A migração de neutrófilos.....	19
2. Participação de células residentes no recrutamento de neutrófilos.....	22
2.1. Macrófagos.....	22
2.2. Mastócitos.....	23
2.3. Linfócitos T CD ₄ ⁺	24
2.4. Linfócitos T CD ₈ ⁺	26
2.5. Linfócitos B.....	27
3. Fatores quimioatraentes para neutrófilos.....	28
3.1. Quimiocinas.....	33
4. Participação de quimiocinas em modelos de inflamação de origem imune.....	37
Objetivos.....	40
Material e Métodos.....	42
1. Animais.....	43
2. Preparo de soluções, drogas e reagentes.....	43
2.1 Tampão de salina-fosfato (PBS).....	43
2.2 PBS/EDTA.....	43
2.3 Líquido de Turk.....	43
2.4 Corante Panótico Rápido.....	43
2.5 Azul de Tripan.....	44
2.6 Tampação de lise.....	44
2.7 RPMI incompleto.....	44
2.8 RPMI completo.....	44
2.9 RPMI suplementado.....	45
2.10 Ovoalbumina (OVA).....	45

2.12 Quimiocinas e anticorpos.....	45
A. Participação de quimiocinas na migração de neutrófilos induzida por OVA.....	46
A.1. Sensibilização e desafio com OVA.....	46
A.2. Determinação da migração de neutrófilos.....	46
A.2.1. Contagem total.....	47
A.2.2. Contagem diferencial.....	47
A.3. Análise da efetividade do procedimento de imunização com OVA.....	47
A.3.1. Cultura de esplenócitos	47
A.3.2. Titulação de IgG anti-OVA.....	48
A.4. Determinação da participação de mastócitos na migração de neutrófilos induzida por OVA em camundongos imunizados.....	48
A.4.1. Depleção de mastócitos pelo tratamento crônico com o composto 48/80	48
A.4.2. Depleção de mastócitos pela injeção prévia de água destilada	49
A.5. Análise da expressão de RNAm para quimiocinas e receptores de quimiocinas	49
A.5.1. Extração de RNA	49
A.5.2. Ensaio de proteção de RNase (RPA)	50
A.5.3. Determinação da expressão de RNAm para as quimiocinas KC e MIP-2 e para o receptor CXCR2	50
A.6. Efeito dos anticorpos α -RANTES, α -MIP-1 β , α -MIP-2 ou α -KC sobre a migração de neutrófilos induzida por OVA	51
A.7. Participação do TNF α e do LTB $_4$ na migração de neutrófilos induzida por MIP-1 α	51
A.8. Envolvimento dos receptores CCR1, CCR5 e CXCR2 na migração de neutrófilos induzida por OVA	51
A.9. Participação do TNF α e do LTB $_4$ na migração de neutrófilos induzida pela MIP-2.....	52

A.10. Efeito do tratamento com drogas antiinflamatórias na migração de neutrófilos induzida por MIP-2	52
A.11. Envolvimento da MIP-1 α na migração de neutrófilos induzida pela MIP-2	52
A.12. ELISA	53
 B. Mecanismos envolvidos no recrutamento de neutrófilos induzido por KC	54
B.1. Migração de neutrófilos induzida por KC	54
B.2. Participação do TNF α , da IL-1 e do LTB $_4$ na migração de neutrófilos induzida por KC	54
B.3. Efeito do tratamento com drogas antiinflamatórias na migração de neutrófilos induzida por KC	55
B.4. Determinação da participação de células residentes na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por KC ou MIP-2	55
B.4.1. Depleção de mastócitos pelo tratamento crônico com o composto 48/80	55
B.4.2. Depleção de mastócitos pela injeção prévia de água destilada	55
B.4.3. Aumento da população de macrófagos pela injeção de tioglicolato	56
B.4.2. Liberação de fator quimioatraente para neutrófilos por macrófagos estimulados com KC ou MIP-2	56
 3. Análise estatística	57
 Resultados	58
A. Participação de quimiocinas na migração de neutrófilos induzida por OVA	59
A.1. Migração de neutrófilos induzida por OVA em animais imunizados	59

A.2. Envolvimento de linfócitos no recrutamento de neutrófilos induzido por OVA	59
A.3. Mastócitos modulam negativamente a migração de neutrófilos induzida por OVA em camundongos imunizados ..	61
A.4. IL-10 controla a migração de neutrófilos induzida por OVA em animais imunizados	61
A.5. OVA não induz migração de neutrófilos em camundongos deficientes da molécula de adesão ICAM	61
A.6. Participação de quimiocinas na migração de neutrófilos induzida por OVA em camundongos imunizados .	62
A.7. A Migração de neutrófilos induzida por OVA em camundongos imunizados é dependente de MIP-1 α	63
A.8. Envolvimento da MIP-1 α na liberação de TNF α e LTB $_4$ após o desafio com OVA animais imunizados	63
A.9. Envolvimento do TNF α e do LTB $_4$ na migração de neutrófilos induzida por MIP-1 α	64
A.10. A migração de neutrófilos induzida por OVA em camundongos imunizados depende da interação entre MIP-1 α e o receptor CCR1	65
A.11. A migração de neutrófilos em camundongos imunizados e desafiados com OVA é dependente de MIP-2 ...	65
A.12. A migração de neutrófilos induzida por MIP-2 ou por OVA é dependente do receptor CXCR2	66
A.13. MIP-2 participa da migração de neutrófilos induzida por OVA em animais imunizados através da liberação seqüencial de MIP-1 α , TNF α e LTB $_4$	67
 B. Mecanismos envolvidos na migração de neutrófilos induzida por KC e MIP-2	 68
B.1. KC induz migração de neutrófilos dependentemente da liberação de TNF α , LTB $_4$ e IL-1	68

B.2. KC induz migração de neutrófilos dependentemente da liberação de TNF α , LTB ₄ e IL-1	69
Discussão	106
Resumo	123
Summary	125
Referências Bibliográficas	127

INTRODUÇÃO

1. A migração de neutrófilos

Nos estágios iniciais da maioria dos processos inflamatórios, os neutrófilos são os primeiros leucócitos a serem recrutados para o sítio de agressão celular. Estes leucócitos geralmente permanecem de 12 a 24 horas no local de injúria tecidual, seguidamente inicia-se um processo de morte programada (apoptose), sendo posteriormente fagocitado por macrófagos. A partir da 10^a h surgem progressivamente eosinófilos, macrófagos e linfócitos, permanecendo por cerca de uma semana no local injuriado. Caso o agente agressor não seja removido, ocorre a perpetuação e cronificação do processo.

Atualmente, está bem determinado que a mobilização adequada e em tempo hábil dos leucócitos da microcirculação para o foco inflamatório é um fenômeno essencial para a defesa do organismo. Uma das etapas fundamentais para que ocorra a migração de neutrófilos é a liberação de substâncias quimioatraentes que irão formar um gradiente de concentração entre a área lesada e as vênulas pós-capilares, favorecendo a adesão dos neutrófilos com as células endoteliais e dando início ao rolamento desses leucócitos pelo endotélio vascular. Deste modo, neutrófilos ativados apresentam inicialmente um rolamento pelo endotélio vascular mediado por ligações fracas entre moléculas de adesão da família das selectinas, favorecendo a redução da velocidade com que esses leucócitos passam pelo vaso. Este processo é mediado por interações específicas, embora fracas, entre as selectinas encontradas tanto nos neutrófilos (L-selectina) como nas células endoteliais (P e E-selectina). Seguindo a este evento, ligações entre integrinas complementares dos neutrófilos e do endotélio favorece uma interação de maior afinidade e, conseqüentemente, uma forte adesão entre as células endoteliais e os neutrófilos. Neste processo, glicoproteínas denominadas β_2 -integrinas se ligam à moléculas da superfamília das imunoglobulinas, como o VCAM-1, PECAM-1 e ICAM-1. Uma vez aderidos ao endotélio, os neutrófilos migram para os tecidos subjacentes por espaços abertos entre as células endoteliais (diapedese) ou por dentro de fissuras formadas nas próprias células endoteliais (migração transendotelial) (Zimmerman *e cols.*, 1992; Huttenlocher *e cols.*, 1995; Radi *e cols.*, 2001; Ley, 2002).

No foco inflamatório, os neutrófilos são capazes de fagocitar, matar e digerir microorganismos. Em seus grânulos citoplasmáticos, o neutrófilo possui várias enzimas proteolíticas capazes de lisar praticamente todos os componentes da maioria dos microorganismos. Nos grânulos azurófilos, lisossomos verdadeiros ou grânulos primários, pode-se encontrar a presença de defensinas, lisozimas, mieloperoxidase, elastases, catepsinas,

hidrolases ácidas entre outras enzimas. Nos grânulos específicos ou secundários, podemos encontrar a presença de lisozimas, colagenases, lactoferrina entre outras (Dale, 1984; Lehrer *e cols.*, 1988). Além disso, os neutrófilos possuem um sistema enzimático oxidativo acoplado à membrana plasmática (NADPH oxidase), responsável pelo aumento do metabolismo oxidativo conhecido como “explosão” respiratória. Neste sistema, ocorre uma transferência de elétrons do NADPH intracelular para o oxigênio, reduzindo este último ao ânion superóxido (O_2^-) (Slater, 1984; Bellavite, 1988; Bellavite *e cols.*, 1988; Rubanyi, 1988), o qual pode ser rapidamente convertido a peróxido de hidrogênio e este a radicais hidroxilas, denominados de intermediários reativos do oxigênio (Malech e Gallin, 1987).

Uma outra substância altamente reativa é o óxido nítrico (NO), o qual é muito utilizado no processo de morte de fungos e bactérias pelos neutrófilos (Fierro *e cols.*, 1996; Fierro *e cols.*, 1999). Neutrófilos ativados expressam a enzima sintase de óxido nítrico induzida (NOSi), que leva a produção de óxido nítrico (Carreras *e cols.*, 1994). Uma vez formado, o óxido nítrico pode interagir com o anion superóxido formando peroxinitrito (ONOOH). Esta molécula possui elevada toxicidade celular podendo ser clivada e gerar o dióxido de nitrogênio (NO_2) e o radical hidroxil (OH), sendo este último reativo e tóxico, contribuindo com a exacerbação da lesão tecidual no foco inflamatório (Mulligan *e cols.*, 1991; Matheis *e cols.*, 1992). Deste modo, a presença de neutrófilos em um determinado tecido pode ser deletéria para o organismo, destacando-se as doenças auto-imunes como a síndrome da glomerulonefrite, vasculite imune, doença inflamatória intestinal e artrite reumatóide (Rutgers *e cols.*, 2003; Kristjansson *e cols.*, 2004; Wong e Lord, 2004; Cuzzocrea *e cols.*, 2005b; Xiao *e cols.*, 2005) e, lesões teciduais observadas em doenças com origem não imunológica, tais como na síndrome da angustia respiratória no adulto, injúria da reperfusão miocárdica e enfizema pulmonar (O'donnell *e cols.*, 2004; Puneet *e cols.*, 2005; Saeed *e cols.*, 2005) .

Paradoxalmente, alguns pesquisadores demonstraram que o óxido nítrico também pode apresentar um importante papel antiinflamatório ao inibir a migração e a adesão de neutrófilos ao endotélio vascular. O mecanismo envolvido neste processo ainda não foi bem elucidado, embora haja fortes evidências que esta molécula esteja interferindo com a ativação de β_2 -integrinas, por meio de um processo dependente da liberação de GMPC (Banick *e cols.*, 1997; Kosonen *e cols.*, 1999; Galkina *e cols.*, 2004). Outra atividade atribuída ao óxido nítrico é a capacidade de bloquear a ligação do fator nuclear NF- κ B ao DNA celular, impedindo a síntese da quimiocina IL-8, inibindo desta forma o recrutamento de neutrófilos (Fowler *e cols.*, 1999). Mais recentemente, nosso laboratório demonstrou que o óxido nítrico inibe a migração

de neutrófilos interferindo com o rolamento e a adesão destes leucócitos com o endotélio venular e induzindo a apoptose dos neutrófilos emigrados (Secco *e cols.*, 2003).

2. Participação das células residentes no recrutamento de neutrófilos

2.1 Macrófagos

Durante um processo inflamatório, células residentes teciduais como macrófagos, mastócitos e linfócitos participam ativamente do recrutamento de neutrófilos. No começo da década de 80, Ferreira propôs que macrófagos residentes teriam a função de células de alarme, sendo responsáveis pelo início da mobilização de neutrófilos da microcirculação para a região injuriada, assim como pelo desencadeamento de outros eventos inflamatórios, como edema e dor (Ferreira, 1980; Cunha e Ferreira, 1986). Os macrófagos podem interagir com uma variedade de moléculas extracelulares, sendo capazes de internacionalizá-las e submetê-las a reações metabólicas intracelulares. Quando ativadas, estas células tornam-se altamente secretoras, liberando produtos que estão direta ou indiretamente envolvidos na migração de neutrófilos, entre estes estão os produtos derivados da cascata do ácido araquidônico, proteínas do sistema complemento, citocinas como a IL-1 β e o TNF α e quimiocinas como a IL-8, GRO α,β e γ em humanos, a CINC(citocina quimioatraente para neutrófilos)-1 em ratos, e o KC e a MIP-2 em camundongos (Takemura e Werb, 1984; Werb *e cols.*, 1986; Adams e Hamilton, 1987; Nathan, 1987; Rankin *e cols.*, 1990; Ajuebor *e cols.*, 1999; Sar *e cols.*, 1999).

Diversos estudos demonstram que o recrutamento de neutrófilos induzido por vários estímulos inflamatórios tais como a carragenina, o zymosan, o LPS e também por algumas citocinas como o TNF- α e a IL-1 β depende da presença de macrófagos residentes. Este fato tornou-se evidente após o achado de que a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por estímulos flogísticos como carragenina, endotoxina ou zymosan é significativamente potencializada pelo aumento da população de macrófagos peritoneais através do pré-tratamento dos animais com tioglicolato e, diminuída após a depleção dos macrófagos peritoneais através da lavagem da cavidade peritoneal e pelo tratamento dos animais com soro anti-macrófago (De Souza e Ferreira, 1985; Souza *e cols.*, 1988; Faccioli *e cols.*, 1990; Ribeiro *e cols.*, 1997). Além disso, verificou-se que macrófagos peritoneais incubados *in vitro* com LPS liberam um fator quimiotático para neutrófilos, o MNCF (macrophage neutrophil chemotactic factor), mediador com potente atividade quimiotática para

neutrófilos tanto *in vivo* como *in vitro* (Cunha e Ferreira, 1986). Recentemente, ressaltando a importância dos macrófagos no recrutamento de neutrófilos, demonstrou-se que a migração desses leucócitos para a cavidade peritoneal de camundongos injetados com staphylococcal enterotoxin type A e B depende da liberação de fatores quimioatraentes por macrófagos residentes (Desouza *e cols.*, 2001; 2002). Além disso, a administração intratraqueal tanto com LPS como com a quimiocina MCP-1 induziu significativo extravasamento de neutrófilos seguidos de macrófagos para o pulmão (Maus, U. *e cols.*, 2001). Como neutrófilos não expressam CCR2, receptor da MCP-1, verificou-se que este processo é dependente da liberação de substâncias quimioatraentes para neutrófilos, derivadas de macrófagos ativadas *via* CCR2 (Mack *e cols.*, 2001; Maus, U. *e cols.*, 2002; Maus, U.A. *e cols.*, 2003). A participação de macrófagos no recrutamento de neutrófilos também foi verificada em órgãos como o fígado e o baço (Knudsen *e cols.*, 2004). Mais recentemente, nosso laboratório demonstrou que a migração de neutrófilos induzida por dentina está relacionada com a liberação de IL-1 β , TNF α e MIP-2 por macrófagos residentes (Silva *e cols.*, 2005). Com relação às reações inflamatórias de origem imune, a participação de macrófagos peritoneais na migração de neutrófilos também foi demonstrada. Neste sentido, verificou-se que a migração de neutrófilos na peritonite induzida por imunocomplexos é dependente, pelo menos em parte, da liberação de MIP-2 (Godau *e cols.*, 2004) por macrófagos residentes. Estes resultados demonstram que macrófagos possuem um papel chave no recrutamento de neutrófilos, justificando-se desta maneira o estudo destas células em diferentes modelos inflamatórios.

2.2 Mastócitos

Um importante papel na modulação do recrutamento de neutrófilos vem sendo creditado aos mastócitos. O mastócito é uma célula mononuclear que apresenta grandes e numerosos grânulos citoplasmáticos contendo diversos mediadores, incluindo peptídeos, proteínas, proteoglicanas, histamina, proteases de serina e carboxipeptidase A (Stevens, 1989; Stevens e Austen, 1989). A ativação dos mastócitos resulta basicamente em três tipos de efeitos biológicos: 1) liberação rápida, por exocitose, de mediadores pré-formados incluindo histamina, proteoglicanas, proteases de serina, carboxipeptidase A e citocinas como TNF- α e IL-1; 2) síntese enzimática de mediadores lipídicos como LTB₄, LTC₄, PAF e Prostaglandina D2 (PGD₂), e 3) transcrição, tradução e secreção de uma imensa variedade de citocinas (IL-1 β , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, TNF- α , TGF- α e GM-CSF) e de quimiocinas (CINC-1, MIP-1 α e

β , MCP-1, TCA-3 e linfotactina). (Moller, A. *e cols.*, 1993; Malaviya *e cols.*, 1996; Rumsaeng *e cols.*, 1997; Mekori e Metcalfe, 2000; Ramos *e cols.*, 2003). Mastócitos também são essenciais no desencadeamento da resposta alérgica, sendo sensibilizados pela IgE, iniciando a secreção de mediadores bioativos (Galli, 1997). Além da ativação desencadeada pela IgE, mastócitos também podem ser ativados por anafilatoxinas, peptídeos como a substância P e o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP), quimiocinas como IL-8, MIP-1 α e MCP-1 (Alam *e cols.*, 1992b; Alam *e cols.*, 1994; Columbo *e cols.*, 1996).

Com relação ao envolvimento de mastócitos no recrutamento de neutrófilos, nosso laboratório demonstrou que mastócitos residentes peritoneais participam relevantemente da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos induzida pelo LTB₄ (Ribeiro *et al.*, 1997). Além disso, Ramos e cols em 2003, demonstrou que a IL-8 induz migração de neutrófilos dependentemente da liberação de CINC-1 por mastócitos residentes peritoneais (Ramos *e cols.*, 2003). Confirmando a importância dos mastócitos residentes peritoneais no recrutamento de neutrófilos, observou-se que camundongos deficientes de mastócitos são susceptíveis a peritonite bacteriana, fato relacionado com menor concentração de TNF α com conseqüente redução da quantidade de neutrófilos no foco infeccioso (Malaviya *e cols.*, 1996). Utilizando de um modelo de peritonite induzida por imunocomplexos, Godau e cols verificaram que a migração de neutrófilos é dependente, pelo menos em parte, da liberação de MIP-2 e KC por mastócitos residentes (Godau *e cols.*, 2004). Por outro lado, nosso laboratório demonstrou recentemente que mastócitos participam controlando negativamente a migração de neutrófilos induzida pela dentina, e que este controle se deve a liberação de IL-4 e IL-10 (Silva *e cols.*, 2005).

2.3 Linfócitos T CD₄⁺

Após ativação por células apresentadoras de antígeno (APCs) como macrófagos e células dendríticas, linfócitos T CD₄⁺ podem modular três diferentes padrões de resposta imune, padrão Th1, Th2 e Th3. O padrão dominante é determinado pelo balanço entre os diferentes tipos de citocinas secretadas. Os linfócitos Th1 secretam citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IFN- γ e TNF- α , as quais são importantes na ativação de leucócitos, levando à produção de radicais livres derivados do oxigênio e nitrogênio. Apesar desta ativação ser importante para a eliminação de parasitas intracelulares, também é responsável pelas lesões observadas em doenças auto-imunes. Os linfócitos do padrão Th2 secretam citocinas como IL-

4, IL-10 e IL-13, aumentando desta maneira a capacidade do organismo de eliminar microrganismos extracelulares. Além disso, este padrão de citocina é importante na definição dos processos alérgicos. Outra importante classe de linfócitos são os chamados linfócitos T regulatórios (Treg) ou linfócitos T supressores. Estas células possuem importante atividade no estabelecimento e manutenção da homeostase do organismo e participa da modulação negativa da resposta imune contra antígenos não próprios, através da geração de uma resposta imunossupressora e secreção de citocinas com atividade antiinflamatória como IL-10 e TGF- β . Dentre os linfócitos Treg, atualmente os linfócitos T CD $_4^+$ CD $_{25}^+$ são considerados como foco principal para a pesquisa terapêutica devido ao fato destas serem as principais células envolvidas na manutenção da resposta imune fisiológica a antígenos próprios e controle negativo da resposta imune observada em diversas patologias (Cherwinski *e cols.*, 1987; Van Parijs e Abbas, 1998; Nakamura *e cols.*, 2001a; Mchugh e Shevach, 2002; Piccirillo *e cols.*, 2002; Shevach, 2002; Gambineri *e cols.*, 2003; Sakaguchi, 2004; Raghavan e Holmgren, 2005).

Em reações inflamatórias de origem imunológica, estudos sugerem que linfócitos T parecem ser uma das células responsáveis pelo desencadeamento do recrutamento de neutrófilos. Estudos demonstram que o recrutamento de neutrófilos e macrófagos em infecções causadas por *Listeria monocytogenes* em animais imunizados é dependente de linfócitos T. Além disso, linfócitos T incubados *in vitro* com antígenos de *L. monocytogenes* liberam substâncias quimiotáticas para neutrófilos e macrófagos (Czuprynski e Brown, 1987). O mesmo foi observado com outros agentes, como *Mycobacterium avium* (Appelberg e Silva, 1989) e *M. bovis* (Appelberg, 1992). Além disso, foi demonstrado que o recrutamento de neutrófilos induzido por ovoalbumina (OVA) em ratos ou camundongos imunizados é dependente de liberação de fator quimiotático liberado por linfócitos T (Klein *e cols.*, 1995; Canetti, C. *e cols.*, 2001). A importância dos linfócitos T CD $_4^+$ padrão Th1 no controle do recrutamento de neutrófilos também foi descrita em doenças inflamatórias humanas como, artrite reumatóide, doença inflamatória intestinal e sarcoidose (Deem *e cols.*, 1991; Zheng *e cols.*, 1995; Panayi *e cols.*, 2001). Recentemente, demonstrou-se que a liberação de IL-17 por linfócitos TCD $_4^+$ essencial para o extravasamento de neutrófilos para o pulmão induzido pela administração de LPS (Ferretti *e cols.*, 2003). Em humanos, verificou-se que a liberação de IL-8 por linfócitos TCD $_4^+$ acarreta na migração de neutrófilos e cronificação da inflamação na pele (Schaerli *e cols.*, 2004).

Uma vez emigrados, neutrófilos podem ser fonte de mediadores com atividade quimioatraente para linfócitos TCD $_4^+$, contribuindo para a cronificação do processo

inflamatório. Neste sentido, verificou-se que a depleção de neutrófilos inibe o recrutamento de linfócitos TCD₄⁺ para o fígado induzido pela administração de Concanavalina A (Bonder *e cols.*, 2004). Molesworth-Kenyon *e cols.* demonstraram que neutrófilos são responsáveis pela produção de quimiocinas relacionadas com o recrutamento de linfócitos T CD₄⁺, como IP-10 e MIG, e conseqüentemente com a amplificação da resposta inflamatória no modelo de DTH induzida pelo antígeno do tipo 1 para o vírus Herpes simplex (Molesworth-Kenyon *e cols.*, 2005). De fato, a literatura descreve que neutrófilos ativados por IL-8, tanto *in vivo* como *in vitro*, liberam quimiocinas relacionadas com o recrutamento de linfócitos TCD₄⁺ (Kasama *e cols.*, 1993; Taub *e cols.*, 1996).

2.4 Linfócitos T CD₈⁺

Embora ainda não existam dados na literatura que associem os linfócitos T CD₈⁺ com a migração de neutrófilos, a importância de se estudar essa associação, se reflete no fato desses linfócitos serem fonte de mediadores inflamatórios importantes na migração de neutrófilos. Desta maneira, linfócitos T CD₈⁺ são capazes de mediar a resposta imune através da secreção de citocinas e quimiocinas (Schall *e cols.*, 1990; Alam *e cols.*, 1992a; Rot *e cols.*, 1992); bem como regular a função das células apresentadoras de antígeno (APCs), através do contato ou da secreção desses mediadores (Shu *e cols.*, 1995; Kennedy *e cols.*, 1996) (McDyer *e cols.*, 1998; Vukmanovic-Stejic *e cols.*, 2000).

Os linfócitos T CD₈⁺, também denominados linfócitos T citotóxicos, estão envolvidos na proteção contra agentes virais e tumorais, sendo a eliminação do antígeno através da morte da célula infectada sua principal função (Russell e Ley, 2002). Normalmente, as células T CD₈⁺ reconhecem o antígeno apresentado no contexto de moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC) de classe I, e estão associados a respostas imunes contra antígenos gerados no citosol, derivados de proteínas virais ou celulares dentro da célula apresentadora (York e Rock, 1996). Dessa forma, em macrófagos e células dendríticas, proteínas que estão dentro do fagolisossoma migram para o citosol e são apresentadas através das moléculas MHC de classe I (Rock *e cols.*, 1990; Germann *e cols.*, 1995; Reis E Sousa e Germain, 1995).

Algumas células T CD₈⁺ expressam a molécula CD40L, e a interação CD40-CD40L é capaz de induzir a produção de IL-12 por macrófagos e células dendríticas, aumentando a produção de INF γ (Shu *e cols.*, 1995; Kennedy *e cols.*, 1996; McDyer *e cols.*, 1998; Vukmanovic-Stejic *e cols.*, 2000). O principal padrão de citocinas secretadas pelas células T

CD₈⁺ é similar ao padrão de citocinas do tipo Th1, como por exemplo, a produção de IFN- γ e TNF- α , o que é consistente com sua função citotóxica (Kelso e Glasebrook, 1984; Fong e Mosmann, 1990). Por outro lado, clones de células T CD₈⁺ também podem secretar citocinas associadas ao padrão Th2, como a citocina IL-4 (Salgame *e cols.*, 1991; Seder *e cols.*, 1992). Os linfócitos T CD₈⁺ também podem mediar a resposta imune através da secreção de quimiocinas tais como: IL-8 e MIP-1 α (Schall *e cols.*, 1990; Alam *e cols.*, 1992a; Rot *e cols.*, 1992). Recentemente, Engeman e cols, demonstraram uma evidente relação entre o número de neutrófilos emigrados para a pele frente estímulo antigênico, e o número de linfócitos CD₈⁺ recrutados para o local injuriado (Engeman *e cols.*, 2004). Além disso, desde o achado de que linfócitos TCD₈⁺ expressam o receptor CXCR1 (Takata *e cols.*, 2004), sugere-se um possível mecanismo de ativação destas células pela IL-8 liberada tanto por neutrófilos ativados e emigrados como por macrófagos.

2.5 Linfócitos B

A importância de se estudar a participação de linfócitos B na migração de neutrófilos se reflete no fato desses linfócitos serem células importantes na apresentação de antígenos, o que leva a ativação de outras células que podem produzir mediadores inflamatórios, ou mesmo os próprios linfócitos B podem ser fonte desses mediadores que são importantes na migração de neutrófilos. Deste modo, além da importância dos linfócitos B na geração da imunidade humoral para a maioria dos antígenos protéicos, estas células também são importantes na apresentação de antígenos a linfócitos T CD₄⁺, células fonte de mediadores inflamatórios importantes no processo de migração de neutrófilos (Bishop e Hostager, 2001).

Existem dois subtipos de células B que são designadas células B-1 e células B-2, sendo a divisão desses subtipos baseada em marcadores de superfície e características funcionais (Kantor e Herzenberg, 1993; Hardy e Hayakawa, 2001). Inicialmente, a divisão foi baseada na presença (células B-1) ou ausência (células B-2) da proteína CD5 na superfície celular. Entretanto verificou-se que nem todas as células B-1 expressam a proteína CD5, apesar da presença de mRNA para CD5, o que levou a subdivisão das células B-1 em células B-1a (expressão de CD5 na superfície celular) e células B-1b (ausência da expressão de CD5 na superfície celular).

As células B-1 murinas estão predominantemente localizadas nas cavidades peritoneal e pleural, e ausentes nos linfonodos, placas de Peyer e circulação periférica (Kroese

e cols., 1992). Recentemente foi demonstrado o “homing” preferencial de células B-1 para as cavidades corporais, direcionados pela quimiocina atraente de linfócitos B (BCA-1), que é produzida principalmente pelas células do omentum e macrófagos peritoneais (Ansel *e cols.*, 2002). As células B-2 murinas desenvolvem-se mais tardiamente na ontogenia comparada com as células B-1, surgindo de progenitores encontrados no fígado fetal e na medula óssea no adulto (Kantor e Herzenberg, 1993). Ao contrário das células B-1, as células B-2 são geradas durante toda vida pela diferenciação de progenitores na medula óssea, sendo principalmente envolvidas na imunidade adquirida e na resposta imune a antígenos dependentes de células T.

A geração da imunidade humoral para a maioria dos antígenos protéicos requer a colaboração entre as células T CD_4^+ e as células B nos órgãos linfóides secundários (Bishop e Hostager, 2001). Uma vez que os receptores de células B (BCR) se liguem ao antígeno, estes complexos antígeno-BCR são internalizados e transportados para compartimentos endocíticos especializados. Nestes compartimentos os antígenos são processados em peptídeos, e então associados a moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC) de classe II e assim transportados até a superfície celular. Concomitante com estes eventos, as células B aumentam a expressão de moléculas de superfície celular que são importantes na interação com células T, incluindo CD86, CD80 e mais moléculas MHC de classe II (Siemasko e Clark, 2001).

3. Fatores quimioatraentes para neutrófilos:

Como dito anteriormente, o evento de migração celular é um processo multimediado dependente da liberação de diversos mediadores inflamatórios. Substâncias quimioatraentes são capazes de ativarem e atraírem neutrófilos para o foco inflamatório. Conforme descrito na literatura, diversos agentes são conhecidos como quimioatraentes para neutrófilos, estes agentes podem ser oriundos de células procarióticas como os formil peptídeos; fragmentos derivados da parede bacteriana como o lipopolissacarídeo (LPS) (Miyazaki *e cols.*, 2004); peptídeos sintéticos como o N-phenil-methionil-leucil-phenilalanina (fMLP)(Heit *e cols.*, 2005); fatores derivados do sistema complemento como o C5a (Heller *e cols.*, 1999); derivados lipídicos da cascata do ácido araquidônico como o fator de agregação plaquetária (PAF) (Fernandes *e cols.*, 2005) e o leucotrieno(LT) B_4 (Rios-Santos *e cols.*, 2003; Scott *e cols.*, 2004); citocinas como a IL-1 β (Carolan *e cols.*, 1997; Robson *e cols.*, 2001) e o TNF- α (Canetti, C. *e cols.*, 2001; Sheikh *e cols.*, 2005) e diversas quimiocinas como a IL-8 e os oncogenes reguladores do crescimento (GRO)- α , β ou γ (Vita *e cols.*, 1993; Ahuja e Murphy, 1996; Feniger-Barish *e cols.*, 2003; Ramos *e cols.*, 2003; Fuhler *e cols.*, 2005).

Produtos derivados da cascata do ácido araquidônico, como o PAF e o LTB₄, são conhecidos como agentes quimioatraentes para neutrófilos. Dentre seus efeitos, o PAF estimula a agregação plaquetária, ativação e desgranulação de neutrófilos e eosinófilos, ativação do sistema complemento, síntese de prostaglandinas e LTC₄, produção de colagenases e outras proteinases que degradam a matriz extracelular, broncoconstrição, e em grandes concentrações o PAF pode atingir a circulação e induzir ampla ativação de neutrófilos, basófilos e plaquetas, assim como uma hipotensão (Kuijpers *e cols.*, 1992; Casale *e cols.*, 1993; Zimmerman *e cols.*, 1993; Tokumura, 1995; Izzo, 1996; Mathiak *e cols.*, 1997; Muguruma *e cols.*, 1997; Zimmerman *e cols.*, 1997; Kuijpers *e cols.*, 2001; Burgos *e cols.*, 2004; Gambero *e cols.*, 2004; Khreiss *e cols.*, 2004; Michail e Abernathy, 2004; Wanten *e cols.*, 2004; Gaudreault *e cols.*, 2005). Estudos também demonstram que além de ser capaz de ativar células de defesa como os neutrófilos, o PAF também contribui com a adesão destas células ao endotélio vascular (Kuijpers *e cols.*, 1992; Zimmerman *e cols.*, 1997; Rollin *e cols.*, 2004). Recentemente, Gaudreault e cols demonstraram que o PAF induz tanto a desgranulação quanto a quimiotaxia para neutrófilos humanos dependentemente da liberação de LTB₄ (Gaudreault *e cols.*, 2005).

Com relação ao LTB₄ (5S, 12R-dihidroxi-6, 14-cis-8, 10-trans-ácido eicosatetraenóico), faz-se importante ressaltar que esta molécula encontra-se presente na maioria dos focos inflamatórios, podendo ser sintetizada e liberada por monócitos e por células polimorfonucleares. O LTB₄ foi descrito como resultado da biotransformação do ácido araquidônico (AA) por neutrófilos de coelho (Borgeat e Samuelsson, 1979), sendo subsequentemente sintetizado quimicamente (Ford-Hutchinson *e cols.*, 1980). Diversas ações são atribuídas ao LTB₄, dentre as quais destacam-se a potente atividade quimiotática para neutrófilos (Samuelsson *e cols.*, 1987); a capacidade de inibir a apoptose de neutrófilos (Hebert, M.J. *e cols.*, 1996; Lin, F. *e cols.*, 2005); induzir a produção e liberação de intermediários reativos do oxigênio e hidrolases lisossomais (Serhan *e cols.*, 1982); estimular o fator nuclear κB, levando a síntese de IL-8 (Aoki *e cols.*, 1998). Além de ser mais potente que o PAF em induzir quimiotaxia para neutrófilos, o LTB₄ também contribui com a aderência destas células ao endotélio vascular. Além disso, a concentração de LTB₄ necessária para causar adesão dos neutrófilos as células endoteliais, bem como a migração transendotelial foi visto ser cerca de 1000 vezes menor do que a concentração necessária de fMLP (Oda e Katori, 1992). Diversos estudos demonstram a participação do LTB₄ em diversos estados patológicos como na psoríase (Brain, S. *e cols.*, 1984), gota (Rae *e cols.*, 1982), artrite reumatóide (Davidson *e cols.*, 1982; Da Rocha *e cols.*, 2004), doença inflamatória intestinal (Sharon e Stenson, 1984; Singh, V.P. *e cols.*, 2004), síndrome da angústia respiratória do adulto

(Gadaleta e Davis, 1994) e sepse (Nakae *e cols.*, 1994; Scott *e cols.*, 2004). Além disso, a participação do LTB₄ em modelos experimentais utilizados para o estudo das patologias acima citadas está bem documentada (Brain, S.D. *e cols.*, 1982; Ford-Hutchinson, 1985; Herlin *e cols.*, 1988; Fink *e cols.*, 1993; Tsuji *e cols.*, 1999; Yoshida *e cols.*, 2003)

Na formação dos leucotrienos, o ácido araquidônico é metabolizado pela fosfolipase A₂ em 5-HPETE e posteriormente à leucotrieno(LT)-A₄ por ação da 5-lipoxigenase, enzima dependente da entrada de cálcio para se translocar para o envelope nuclear (Yokomizo *e cols.*, 2001). Para que a 5-lipoxigenase possa metabolizar o LTA₄ é necessário que haja apresentação do ácido araquidônico, atividade mediada pela proteína ativadora da 5-lipoxigenase -FLAP; (Mancini *e cols.*, 1993). Uma vez formado, o LTA₄ sofre hidrólise pela enzima LTA₄ hidrolase, formando o LTB₄.

O LTB₄ exerce atividade biológica através de sua ligação a receptores específicos acoplados à proteína G presentes na membrana celular, conhecidos como BLT₁ e BLT₂. O BLT₁ é conhecido como um receptor de alta afinidade (Kd≈0,4nM), sendo responsável principalmente pela atividade quimiotática e adesiva. O BLT₂ é um receptor com menor atividade (Kd≈60nM) que parece mediar a liberação de enzimas lisossomais e o aumento do metabolismo oxidativo, além de ser descrito como promotor de quimiotaxia (Goldman *e cols.*, 1987; Crooks e Stockley, 1998; Yokomizo *e cols.*, 2000). Além disso, o LTB₄ também possui um receptor nuclear, o PPARα (um fator de transcrição), uma vez ativado pelo LTB₄, este receptor induz a produção de enzimas envolvidas no catabolismo do LTB₄, diminuindo desta maneira a sua biodisponibilidade (Devchand *e cols.*, 1996; Lin, Q. *e cols.*, 1999).

O TNFα caracteriza-se por ser outro importante mediador inflamatório, sendo originalmente identificado como um fator plasmático capaz de induzir necrose hemorrágica de tumores de camundongos transplantados, possuindo citotoxicidade seletiva para as células neoplásicas (Carswell *e cols.*, 1975). Além disso, o TNFα também foi independentemente identificado como sendo a caquexina, proteína responsável por diversas alterações observadas durante a caquexia (Kawakami e Cerami, 1981), sendo posteriormente nomeado como TNFα (Beutler *e cols.*, 1985).

O TNFα é produzido na forma de um precursor de 26 kDa, contendo 233 aminoácidos, associado à membrana celular, podendo ser enzimaticamente clivado por uma metaloproteinase a um peptídeo com 17 kDa, contendo 157 aminoácidos (Black *e cols.*, 1997). Ocorre então a formação de um trímero de 51 kDa, a forma bioativa, cuja integridade depende de pontes dissulfeto entre as cadeias envolvendo dois resíduos de cisteína. A forma ativa do

TNF α é capaz de reconhecer dois subtipos de receptores de membrana distintos, o TNFR I ou p55 (55 kDa) e o TNFR II ou p75 (75 kDa). Os receptores do TNF α compartilham como característica o fato de possuírem quatro regiões repetidas, ricas em cisteína em seus domínios extracelulares. Além dos receptores para o TNF α , fazem parte desta família o receptor para o fator de crescimento neuronal (NGFR), CD27, CD30, CD40, Ox40 e 4-1BB (Wajant *e cols.*, 2001).

O TNF α apresenta um papel central em diversos processos, como crescimento, angiogênese, citotoxicidade, inflamação e imuno-modulação (Aggarwal e Natarajan, 1996; Taylor *e cols.*, 2004). A participação do TNF α modulando o recrutamento de neutrófilos para o local de injúria celular está bem documentada (Echtenacher *e cols.*, 1996; Malaviya *e cols.*, 1996; Canetti, C. *e cols.*, 2001; Bombini *e cols.*, 2004; Saunders *e cols.*, 2005). Apesar do TNF α não induzir migração de neutrófilos *in vitro*, quando esta citocina é administrada *in vivo* promove acúmulo de neutrófilos por mecanismos dependentes da liberação de mediadores por células residentes (Faccioli *e cols.*, 1990). A participação do TNF α em desordens como artrite reumatóide, gota, psoríase, síndrome da angústia respiratória do adulto e doença inflamatória intestinal já foi demonstrada tanto em humanos como em animais de experimentação (Edwards e Hallett, 1997; Kiehl *e cols.*, 1998; Matsukawa *e cols.*, 1998; Partsch *e cols.*, 1998; Canetti, C.A. *e cols.*, 2003; Den Broeder *e cols.*, 2003; Andreakos, 2004; Goedkoop *e cols.*, 2004; Mease, 2004; Taylor *e cols.*, 2004; Trent e Kerdel, 2005; Yasui *e cols.*, 2005). A utilização de anticorpos neutralizantes anti-TNF α e receptores solúveis do TNF α estão sendo utilizados como terapia na tentativa de reduzir a inflamação em pacientes com artrite reumatóide ou com doença inflamatória intestinal (Wooley *e cols.*, 1993; Girolomoni *e cols.*, 2002; Graninger e Smolen, 2002; Reimold, 2002; Fleischmann e Shealy, 2003)

Outra citocina importante na inflamação é a IL-1, com funções semelhantes ao TNF, participando como mediador da resposta inflamatória do hospedeiro frente a infecções e outros estímulos inflamatórios. A IL-1 possui duas formas chamadas de IL-1 α e IL-1 β , com 30% de homologia entre elas, compartilhando os mesmos receptores e ações biológicas. Esta citocina é primeiramente sintetizada como um precursor de 33 kD, sendo secretada com 17 kD. A IL-1 α é ativa em ambas as formas, enquanto a forma ativa da IL-1 β é apenas o produto clivado. Deste modo, a IL-1 β é proteoliticamente clivada por uma protease chamada de enzima conversora da IL-1 β , gerando a proteína biologicamente ativa (Gubler *e cols.*, 1986; Huang *e cols.*, 1988; Scapigliati *e cols.*, 1991).

Atualmente, dois subtipos diferentes de receptores para a IL-1 foram caracterizados. O receptor do tipo I é expresso em quase todos tipos celulares e é o principal receptor para as respostas mediadas pela IL-1 (Sadouk *e cols.*, 1995). O receptor do tipo II é expresso principalmente em células B, porém a sua expressão também pode ser induzida em outros tipos celulares (Dubois *e cols.*, 1991; Giri *e cols.*, 1992; Sadouk *e cols.*, 1995). A ligação da IL-1 com o receptor do tipo I leva a ativação de uma quinase chamada de quinase associada ao receptor IL-1, levando a ativação de fatores de transcrição nuclear como NF- κ B e AP-1 (Martin *e cols.*, 1995; O'Neill e Greene, 1998). Uma característica importante deste receptor é a sua alta homologia com os receptores Toll, envolvidos na defesa do organismos contra infecções (O'Neill, 2002). A ligação da IL-1 com o receptor do tipo II, não induz transdução de sinal, tendo função conhecida como um inibidor endógeno competitivo para a IL-1 (Colotta *e cols.*, 1993). Outro conhecido inibidor endógeno da IL-1 e produzido principalmente por fagócitos mononucleares é o antagonista do receptor da IL-1 (IL-1ra). Esta proteína é estruturalmente homóloga a IL-1 e compete pelos mesmos receptores, porém é inativa biologicamente (Dripps *e cols.*, 1991; Shuck *e cols.*, 1991; Vannier *e cols.*, 1996).

Em baixas concentrações a IL-1 age como um mediador local da inflamação, aumentando a expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais. Em altas concentrações a IL-1 chega ao sistema circulatório e passa a exercer efeitos endócrinos como febre e indução da síntese de proteínas plasmáticas de fase aguda pelo fígado. Assim como o TNF α , a IL-1 também induz a síntese e secreção de quimiocinas e citocinas, induzindo indiretamente a migração de neutrófilos para o foco inflamatório (Faccioli *e cols.*, 1990; Perretti e Flower, 1993; Lin, T.J. *e cols.*, 2002). Além disso, estudos demonstram a participação da IL-1 em patologias com elevada presença de neutrófilos, como na artrite e inflamação pulmonar (Driscoll *e cols.*, 1995b; Niki *e cols.*, 2001) Na tentativa de inibir os efeitos inflamatórios da IL-1, IL-1ra e receptores solúveis para a IL-1 estão sendo testados em modelos experimentais animais (Wakabayashi *e cols.*, 1991; Joosten *e cols.*, 1996; Kim, S.H. *e cols.*, 2002) e também clinicamente na artrite e no choque séptico (Fisher *e cols.*, 1994; Champion *e cols.*, 1996; Van Deuren *e cols.*, 1997; Cunnane *e cols.*, 2001; Genant, 2001; Watt e Cobby, 2001).

3.1 Quimiocinas

Recentemente, a descoberta da superfamília das quimiocinas acrescentou um novo alvo nas pesquisas sobre os mecanismos envolvidos na migração leucocitária para o foco de agressão celular (Oppenheim, 1991). O nome designado para essas substâncias foi proposto no “III Simpósio Internacional de Citocinas Quimiotáticas” (Oppenheim *e cols.*, 1991) através da junção das palavras quimioatraentes e citocinas. Estruturalmente, as quimiocinas são peptídeos com peso molecular entre 7 e 15 Kd, contendo cerca de 60 a 80 aminoácidos e, são produzidas por genes distintos presentes localizados nos cromossomos humanos 4 e 17. Em sua estrutura, as quimiocinas apresentam quatro resíduos de cisteína conservados em quase todos os grupos, formando duas pontes dissulfeto intramoleculares essenciais. Possuem um curto domínio aminoterminal antecedendo a primeira cisteína, uma coluna estrutural ordenada formada por β -ligações com alça ligante entre a segunda e a quarta cisteína, além de uma α -hélice na região cabóxi-terminal com cerca de 20 a 30 aminoácidos (Rajaratnam *e cols.*, 1995).

Devido a estas conservadas características estruturais, as quimiocinas foram classificadas de acordo com o posicionamento das duas primeiras cisteínas, as quais podem apresentar-se adjacientemente ligadas, formando o grupo denominado de CC ou α -quimiocinas; separadas por um aminoácido, denominadas de CXC ou β -quimiocinas, ou separadas por três aminoácidos, formando as CX₃C ou δ -quimiocinas. Além destas, foi descrita uma quimiocina que possui apenas dois resíduos de cisteína em sua estrutura, denominada de C ou γ -quimiocina.

As duas maiores subfamílias de quimiocinas são as do grupo CXC e CC, cujas atividades biológicas diferem quanto à capacidade de estimular diferentes tipos de células efectoras. As quimiocinas CXC como a IL-8, o peptídeo ativador de neutrófilos (NAP)-2, o fator plaquetário(PF)-4, os GRO- α , - β , - γ , o peptídeo ativador de neutrófilos derivado de células epiteliais (ENA)-78, atraem preferencialmente neutrófilos para o sítio inflamatório (Ahuja e Murphy, 1996; Figarella-Branger *e cols.*, 2003), enquanto que as quimiocinas CC como a eotaxina, a citocina regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais (RANTES) e a proteína quimiotática para monócitos (MCP)-4 ativam predominantemente eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos (Kapp *e cols.*, 1994; Elsner *e cols.*, 1996; Elsner *e cols.*, 1998; Petering *e cols.*, 1998; Syrbe *e cols.*, 1999; Kaplan, 2001; Figarella-Branger *e cols.*, 2003). Considerando a capacidade destas quimiocinas em promover quimiotaxia em outros tipos leucocitários, encontramos que quimiocinas CXC como as GRO- α , - β e γ e quimiocinas CC como a MCP-1, -2 e -3, a MIP-1 α e RANTES possuem atividade quimiotática para basófilos e, ambos os grupos podem exibir quimiotaxia para eosinófilos. Quimiocinas

pertencentes à classe C e CX₃C possuem maior seletividade para linfócitos, monócitos, linfócitos T e células NK (“Natural Killer”).

Uma importante característica encontrada particularmente na família das quimiocinas CXC é a presença da seqüência de três aminoácidos (glutamato-leucina-arginina; ELR) localizados próximo ao N-terminal, precedendo a primeira cisteína. A presença desta seqüência (“motif”) parece estar intimamente relacionada com a especificidade quimiotática sobre neutrófilos. Entre as quimiocinas CXC-ELR⁺ destacam-se a IL-8, o grupo das GRO, o ENA-78, o GCP-2, MIP-2, KC entre outras (Rollins, 1997; Laing e Secombes, 2004).

Dentre as quimiocinas CXC em humanos, a IL-8 é considerada como protótipo de quimiotaxia e ativação de neutrófilos. Além de ter sido detectada em humanos, esta quimiocina também foi detectada em outras espécies de animais tais como coelhos e cães, entretanto, não foi encontrada em roedores como ratos e camundongos. Nesses animais, a CINC-1 em ratos e as quimiocinas KC e MIP-2 em camundongos, apresentam acentuada homologia com a seqüência de aminoácidos da IL-8 e das GRO humanas. Com relação aos camundongos, trabalhos demonstram que as quimiocinas KC e MIP-2 apresentam potente atividade quimiotática tanto em modelos experimentais *in vivo* como *in vitro*. Assim como outras quimiocinas CXC-ELR⁺, a síntese e secreção dessas quimiocinas podem ser induzidas por estímulos exógenos como o LPS e por citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e o TNF α (Introna *e cols.*, 1987; Shen *e cols.*, 1989; Driscoll *e cols.*, 1995a; Nakamura *e cols.*, 2001b; Hensley *e cols.*, 2003).

Além da definição estrutural para as quimiocinas, também podemos encontrar propriedades funcionais em comum entre elas. Assim, quimiocinas são capazes de atrair um ou mais tipos de células mielóides *in vitro*, induzir infiltrado inflamatório quando injetadas intradermicamente em animais (Meurer *e cols.*, 1993) e, serem induzidas por diversos estímulos inflamatórios como o LPS (Yoshimura *e cols.*, 1987), zymosan (Rankin *e cols.*, 1990), por citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1 β e o TNF- α (Furie e Randolph, 1995) e pelo óxido nítrico (Ajuebor *e cols.*, 1998). As quimiocinas também podem participar da ligação dos leucócitos ao endotélio, da migração destes para os tecidos subjacentes, bem como da ativação de sua função efetora. Substâncias como os glicosaminoglicanos heparina e heparan sulfato, por possuírem carga negativa, são capazes de capturar quimiocinas, que são proteínas básicas, na matriz extracelular e na superfície de células endoteliais, possibilitando a formação de um gradiente haptotático para o local de secreção da quimiocina (Tanaka *e cols.*, 1993; Luster, 1998).

As diversas funções atribuídas às quimiocinas devem-se a ligação destas com receptores acoplados a uma proteína G, presentes na superfície da célula alvo (Baggiolini *e cols.*, 1994; Clark-Lewis *e cols.*, 1995). Estes receptores possuem sete domínios transmembranares ricos em aminoácidos hidrofóbicos, conservados na maioria dos receptores desta classe, entretanto, não existe aminoácido específico ou um padrão comum entre os receptores de quimiocinas. Receptores de quimiocinas, assim como outros membros da família de receptores acoplados com a proteína G, são funcionalmente ligados por esta proteína a uma fosfolipase. Além disso, muitos dos eventos promovidos por quimiocinas são inibidos pela toxina *Bordetella pertussis*, sugerindo que esses receptores estão acoplados a uma proteína inibitória da classe Gi, visto que esta toxina inibe especificamente os receptores desta classe (Murphy, 1994; Bokoch, 1995; Premack e Schall, 1996). Uma vez ativada, a proteína G ativa uma fosfolipase C produzindo inositol-1, 4,5-trifosfato (1, 4,5-IP3) e 1,2-diacilglicerol (DAG) pela quebra do fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2). O IP3 estimula a liberação do cálcio intracelular enquanto que o DAG, além de contribuir com a liberação de Ca⁺⁺ intracelular, também ativa uma proteína quinase C (Lodi *e cols.*, 1994).

As quimiocinas possuem dois principais sítios de interação com seu receptor, um deles localizado na região aminoterminal, essencial para ativação do mesmo e, outro exposto dentro da alça formada entre a segunda e a terceira cisteína (Clark-Lewis *e cols.*, 1991). Em humanos, cinco tipos de receptores para as quimiocinas da classe CXC (CXCR₁ a CXCR₅) e oito receptores para a classe CC já foram identificados (Murphy, 1996). Esses receptores podem estabelecer ligações com mais de uma quimiocina, enquanto que esta pode acoplar-se a mais de um tipo de receptor, indicando que há redundância e versatilidade no sistema das quimiocinas.

No grupo das quimiocinas CC, os principais receptores envolvidos na migração leucocitária são o CCR1 e o CCR5, os quais estabelecem interação com as quimiocinas CC MIP-1 α e β , RANTES e MCP-3 (Neote *e cols.*, 1993; Su *e cols.*, 1996). A expressão do receptor CCR1 já foi observado em linfócitos T, células NK, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células dendríticas e plaquetas (Proudfoot *e cols.*, 1995; Su *e cols.*, 1996; Sallusto *e cols.*, 1998; Sabroe *e cols.*, 1999). O receptor CCR5 compartilha aproximadamente 55% de seqüência homóloga de aminoácidos com o CCR1 (Samson *e cols.*, 1996a), e sua expressão já foi observada em linfócitos T, células NK e macrófagos (Lee, B. *e cols.*, 1999).

Os receptores CXCR1 e CXCR2, no grupo das quimiocinas CXC, formam ligações de alta afinidade com a IL-8 e com a proteína quimiotática para granulócitos (GCP)-2, enquanto que outras quimiocinas como a NAP-2 e o GRO- α formam ligações de alta afinidade

somente com o receptor CXCR2 (Holmes *e cols.*, 1991; Moser *e cols.*, 1991; Murphy e Tiffany, 1991; Lee, J. *e cols.*, 1992; Wuyts *e cols.*, 1997). Desta maneira, o receptor CXCR1 apresenta uma maior especificidade para a IL-8 e para a GCP-2, enquanto que CXCR2 é considerado como sendo um receptor promíscuo, podendo responder a várias quimiocinas da classe CXC. Esses dois receptores são estruturalmente diferentes devido à existência de seqüências distintas de aminoácidos localizadas entre os domínios carbóxi e amino-terminal. Embora os dois subtipos de receptores promovam alterações no Ca^{++} citossólico livre e a liberação de enzimas granulares, a produção de produtos reativos do oxigênio via NADPH (fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo) oxidase depende exclusivamente da estimulação de receptores do subtipo CXCR1 (Jones *e cols.*, 1996). A terceira alça extracelular dos receptores CXCR₁ e CXCR₂ inclui os aminoácidos Glu275 e Arg280, os quais encontram-se conservados tanto em humanos como em coelhos e camundongos. Esta região parece ser um importante domínio funcional do receptor, pois se verificou que a substituição desses aminoácidos por Ala levou a uma completa perda da capacidade de ligação do receptor com a quimiocina. Além disso, como quimiocinas são peptídeos básicos (pI da IL-8=8-8,5), a alta acidez do domínio N-terminal do receptor pode ser um grande determinante de ligação com a quimiocina (Hebert, C.A. *e cols.*, 1991).

Outro tipo de receptor para quimiocinas foi identificado na década de 50 e denominado de DARC (“Duffy antigen receptor for chemokines”), este receptor heptahelicoidal é expresso na superfície de eritrócitos, células endoteliais de vênulas pós-capilares e nas células Purkinje do cerebelo. Este receptor apresenta sítio de ligação tanto para a subfamília de quimiocinas CC como para as CXC, porém esta interação não induz a nenhum processo de sinalização e, portanto, não leva a uma ativação celular. A presença destes receptores parece estar relacionada com a inativação do excesso de quimiocinas na microcirculação, desempenhando um importante papel regulatório na resposta inflamatória (Hadley e Peiper, 1997). Além de inativar o excesso de quimiocinas na circulação sanguínea, este receptor também serve como porta de entrada para o protozoário *Plasmodium vivax* infectar os eritrócitos (Chaudhuri *e cols.*, 1993; Horuk *e cols.*, 1993).

Uma peculiaridade encontrada na família das quimiocinas é o fato de que alguns subtipos de receptores para quimiocinas são também utilizados como receptores para agentes infecciosos. Um exemplo disto é a ligação entre estes receptores e o HIV (vírus da imunodeficiência humana). Os receptores CXCR4 e CCR5 apresentam sítios de ligação para este vírus, que por sua vez, facilitam a infecção de células T e macrófagos, respectivamente. A importância destes receptores na AIDS tornou-se evidente após a descoberta que a homozigose

para a deleção do par de base 32 do gene para o receptor CCR-5, deixava-o não funcional, e desta maneira, algumas pessoas apresentavam-se resistentes a esta síndrome mesmo sendo pertencentes a grupos considerados como de alto risco para esta infecção (Dean *e cols.*, 1996; Liu *e cols.*, 1996; Samson *e cols.*, 1996b). Além disso, células humanas que apresentavam esta mutação, não foram infectadas pelo HIV “*in vitro*” (Paxton *e cols.*, 1996). O mecanismo de fusão entre o receptor e o vírus ainda não está totalmente esclarecido, porém, sabe-se que há uma associação entre a proteína gp120 presente na superfície do vírus HIV-1 antes da entrada do vírus na célula (Lapham *e cols.*, 1996; Trkola *e cols.*, 1996; Wu *e cols.*, 1996).

4. Participação de quimiocinas em modelos de inflamação de origem imune

A patogênese das doenças auto-imune tais como artrite reumatóide, doença inflamatória intestinal, psoríases, doença de Crohn, esclerose múltipla, entre outras envolvem uma resposta inflamatória mediada por células Th1, incluindo a produção de citocinas e quimiocinas, capazes de amplificar e exacerbar a resposta imune contra órgãos e tecidos específicos. Estudos têm focalizado na identificação e caracterização do papel dessas moléculas no desenvolvimento da inflamação e auto-imunidade em modelos animais com a utilização de anticorpos neutralizantes e camundongos “knock-out” (Brandtzaeg *e cols.*, 1997; Locati e Murphy, 1999; Feldmann *e cols.*, 2001; Gerard e Rollins, 2001).

Concernente à participação de quimiocinas em modelos de inflamação de origem imune, estudos demonstram que a migração de neutrófilos induzida por OVA pode ser inibida pelo tratamento dos animais com o anticorpo α -MIP-1 α (Das *e cols.*, 1999). Mais recentemente, foi demonstrado que quimiocinas como KC e MIP-2 participam na modulação do recrutamento de neutrófilos após desafio antigênico, tendo o linfócito T CD4⁺ como responsável pela liberação destas quimiocinas (Knott *e cols.*, 2001). Estudos também relatam a presença de quimiocinas em modelos de artrite reumatóide, doença caracterizada pela presença de linfócitos T CD4⁺ e grande infiltrado de neutrófilos. Neste sentido, estudos demonstraram o envolvimento de quimiocinas como a IL-8, GRO α , ENA-78, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1 e RANTES (Brennan *e cols.*, 1991; Koch *e cols.*, 1992; Hachicha *e cols.*, 1993; Rathanaswami *e cols.*, 1993; Hosaka *e cols.*, 1994; Koch *e cols.*, 1994; Katrib *e cols.*, 2003; Garcia-Vicuna *e cols.*, 2004; Min *e cols.*, 2004; Pierer *e cols.*, 2004; Singh, S.K. *e cols.*, 2005), sendo correlacionadas com a migração de leucócitos para o tecido sinovial (revisado por Kasama *e cols.*, 2005). Neste sentido, Kasama *et al.*, demonstraram uma aumentada expressão MIP-2 e

MIP-1 α no modelo de artrite induzida pelo colágeno em camundongos susceptíveis. Além disso, o tratamento desses camundongos com anticorpos contra estas quimiocinas interferiu com o desenvolvimento e progressão da artrite (Kasama *et cols.*, 1995; Kagari *et cols.*, 2002). Estratégias clínicas com o bloqueio do TNF α em pacientes com artrite reumatóide surtiu melhoras no quadro clínico da doença, relacionada com significativa inibição da migração de neutrófilos e macrófagos para a articulação, tão bem como das quimiocinas IL-8 e MCP-1 (Taylor *et cols.*, 2000).

Através da imunização do camundongo com antígeno conhecido, como por exemplo, a ovoalbumina (OVA), pode-se desenvolver um modelo de inflamação antígeno-específico na cavidade peritoneal. A OVA é uma proteína comumente utilizada em protocolos de imunização, geralmente na forma de antígeno solúvel associado ao adjuvante de Freund. A utilização do adjuvante completo de Freund, contendo *M. tuberculosis*, é comumente utilizado na tentativa de dirigir a resposta imune para um padrão Th1 após o desafio com OVA, podendo-se observar alta predominância de neutrófilos na fase aguda do processo. Além disso, o uso de antígenos em emulsão água-óleo estimula a produção de anticorpos em grande quantidade e por um longo período de tempo, podendo este efeito ser atribuído a liberação lenta do antígeno (Billiau e Matthys, 2001; Canetti, C. *et cols.*, 2001). O tipo de resposta observada no modelo de imunização e desafio com OVA é representativo de uma reação de hipersensibilidade tardia (DTH), iniciada após a apresentação do antígeno por células apresentadoras de antígeno (APCs), via MHC, à linfócitos T, desencadeando a resposta imune e produção de citocinas (Gallin, 1993).

Deste modo, o modelo de imunização e desafio com OVA trata-se de um protocolo experimental simples no qual a OVA é capaz de induzir migração de neutrófilos, permitindo o estudo do papel de diferentes mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, durante o desenvolvimento de uma resposta inflamatória de origem imune. A cavidade peritoneal em camundongos representa um local ideal para o estudo do desenvolvimento de reações inflamatórias, sendo um ambiente estéril no qual grande número de células é facilmente obtido. Neste contexto, este modelo permite estudar as etapas que coordenam a migração de neutrófilos em doenças inflamatórias de origem imune, tais como na artrite, doença inflamatória intestinal e sarcoidose.

No decorrer dos últimos anos, nosso laboratório vem investigando os mediadores envolvidos na migração de neutrófilos na reação de imuno-especificidade induzida por OVA em camundongos. Neste contexto, nosso grupo demonstrou que a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal após o desafio com OVA, somente ocorre em animais imunizados sendo

este fenômeno dose e tempo-dependente. Além disso, o processo de migração depende da liberação de TNF α por linfócitos TCD $_4^+$, sendo que o TNF α induz recrutamento de neutrófilos via liberação de LTB $_4$. Deste modo, a inibição da síntese ou ação desses dois mediadores pode contribuir para o controle da acumulação de neutrófilos em doenças inflamatórias de origem imune (Canetti, C. *e cols.*, 2001; Monteiro *e cols.*, 2005). Entretanto, o envolvimento de quimiocinas no recrutamento de neutrófilos observado neste modelo ainda não está bem elucidado.

OBJETIVOS

Como abordado na introdução, a liberação de substâncias quimiotáticas é uma etapa essencial para o recrutamento dos neutrófilos para o local injuriado. Deste modo, o estudo dos mecanismos envolvidos nos diferentes modelos de inflamação é de fundamental importância para o desenvolvimento de condutas terapêuticas mais efetivas e com reduzidos efeitos colaterais no tratamento de diversas patologias. Este presente estudo foi separado em duas partes, onde primeiramente abordamos a participação de quimiocinas na inflamação de origem imune e, na segunda parte deste trabalho foi abordado os mecanismos envolvidos na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos induzida por KC e MIP-2.

A- Objetivos 1:

Com o intuito de melhor compreender os mediadores, bem como os mecanismos que coordenam o processo de migração de neutrófilos na inflamação de origem imune, investigamos o envolvimento das quimiocinas MIP-1 α e β , RANTES, KC e MIP-2 no recrutamento de neutrófilos induzido por OVA em camundongos imunizados.

A.1- Objetivos específicos:

A) Caracterizar a participação de linfócitos T CD₄⁺, linfócitos T CD₈⁺, linfócitos B, mastócitos e da molécula de adesão ICAM-1 na migração de neutrófilos induzida por OVA.

B) Investigar *in vivo* a participação das quimiocinas MIP-1 α e β , RANTES, KC e MIP-2 no recrutamento de neutrófilos induzido por OVA em camundongos imunizados.

C) Determinar a cascata de mediadores envolvidos na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por OVA em camundongos imunizados.

B- Objetivos II:

Na tentativa de elucidar os mecanismos envolvidos na migração de neutrófilos induzida por quimiocinas CXC-ELR+, investigamos neste estudo os mediadores inflamatórios envolvidos e a participação de células residentes, como macrófagos e mastócitos, na migração de neutrófilos induzida por KC e MIP-2

B.1- Objetivos específicos:

A) Investigar os possíveis mediadores inflamatórios envolvidos na migração de neutrófilos *in vivo* induzida pelas quimiocinas KC e MIP-2.

B) Pesquisar a participação de macrófagos e mastócitos residentes da cavidade peritoneal na migração de neutrófilos induzida por KC e MIP-2 *in vivo*.

MATERIAL & MÉTODOS

1. Animais: camundongos isogênicos BALB/c e C57Bl/6 e camundongos deficientes de MIP-1 α (C57Bl/6 MIP-1 α ^{-/-}), do receptor tipo I para TNF α (C57Bl/6 p55^{-/-}), para os receptores de quimiocinas CC tipo 1 ou tipo 5 (C57Bl/6 CCR1^{-/-} e C57Bl/6 CCR5^{-/-}), de linfócitos T CD4⁺ (C57Bl/6 MHC II^{-/-}), de linfócitos T CD8⁺ (C57Bl/6 β 2^{-/-}), de linfócitos B (C57Bl/6 B^{-/-}) e para a molécula de adesão ICAM-1 (C57Bl/6 ICAM-1^{-/-}) pesando entre 18-22g, foram mantidos em condições controladas com água e ração *ad libitum*, no biotério do Departamento de Farmacologia ou de Imunologia desta faculdade. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o comitê de ética para animais de experimentação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

2. Preparo de soluções, drogas e reagentes

2.1 Tampão de salina-fostato (PBS)

Cloreto de Sódio P. A (Merck).....	8,0 g
Cloreto de Potássio P. A (Merck).....	0,2 g
Fosfato de Sódio dibásico P.A (Merck).....	1,15 g
Fosfato de Potássio monobásico P.A (Merck).....	0,2 g
Água Milli-Q q.s.p.....	1L

O pH foi ajustado para 7,2 com NaOH ou HCl e a solução autoclavada antes de ser utilizada.

2.2 PBS/EDTA

PBS.....	100 mL
EDTA (Merck).....	37.2 mg

2.3 LÍQUIDO DE TURK

Ácido Acético Glacial P.A (Merck).....	9 mL
Azul de Metileno (Merk).....	1mL
Água Milli-Q q.s.p.....	1 L

2.4 CORANTE PANÓTICO RÁPIDO (LaborClin)

Panótico rápido nº 1: solução de triarilmetano 0,1%.

Panótico rápido nº 2: solução de xantenos 0,1%.

Panótico rápido nº 3: solução de tiazinas 0,1%.

2.5 AZUL DE TRYPAN

Azul de Trypan (Sigma).....100 mg
PBS q.s.p.....100 mL

2.6 TAMPÃO DE LISE

SOLUÇÃO I

Cloreto de Amônio 0,16 M.....8,3 g/L

SOLUÇÃO II

Tris 0,17 M.....20,6 g/L

As duas soluções foram misturadas na proporção de 9 partes da solução I para 1 parte da solução II. A solução foi esterilizada através de filtro 0,22 μ m (Millipore Corporation) e estocado à 4°C.

2.7 RPMI INCOMPLETO

RPMI (Sigma).....1 frasco
Bicarbonato de sódio (Merck).....2,2 g (24 nM)
HEPES (Sigma).....2,34 g (10 nM)
Penicilina/Gentamicina (Sigma).....150 UI/mL
Streptomicina (Sigma)100 μ g/mL
Água Milli-Q q.s.p.....1L

O pH da solução foi ajustado para 7,2 com HCl ou NaOH. A solução foi esterilizada através de filtro 0,22 μ M (Millipore Corporation) e mantida a 4°C.

2.8 RPMI COMPLETO

RPMI completo q.s.p.....100 mL
Soro Bovino Fetal (Hyclone).....5%

O pH da solução foi ajustado para 7,2 com HCl ou NaOH. A solução foi esterilizada através de filtro 0,22 μ M (Millipore Corporation) e mantida a 4°C.

2.9 RPMI Suplementado

RPMI completo q.s.p.	100 mL
L-glutamina (Sigma).....	200 mM
Ácido Fólico (Sigma).....	1 mM
Ácido Pirúvico (Sigma).....	0,1 mM
Aminoácidos não-essenciais (Sigma).....	100 mM
Mercaptoetanol (Sigma).....	7 µM

O pH da solução foi ajustado para 7,2 com HCl ou NaOH. A solução foi esterilizada através de filtro 0,22 µM (Millipore Corporation) e mantida a 4°C.

2.10 Ovalbumina (OVA)

A OVA (Sigma) foi diluída em PBS ou em RPMI 1640 imediatamente antes de ser utilizada.

2.11 Drogas

- Pirilamina (Sigma) – dissolvida em PBS; s.c.; 30 mg/Kg; 30 min antes.
- Cimetidina (Sigma) – dissolvida em PBS; s.c.; 30 mg/Kg; 30 min antes.
- Indometacina (Sigma) – dissolvida em Tampão Tris 0,1M, pH=8,0; s.c.; 5,0 mg/Kg; 30 min antes;
- MK 886 (Biomol) – dissolvido em metilcelulose 0,1%, 1,0 mg/Kg, 1h antes.
- Talidomida (Champion Farmoquímico) – dissolvida em DMSO<10%, s.c., 50 mg/Kg,, 1 h antes.
- BN 50730 (Instituto Henri Beaufour) - dissolvida em DMSO<10%, s.c., 10 mg/Kg, 30 min antes.
- Repertaxina (gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Mauro Teixeira (UFMG)) – dissolvida em PBS, v.o., 50 mg/Kg, 1 h antes.
- Dexametasona (Sigma) – dissolvida em PBS, s.c., 0,5 mg/Kg, 1 h antes.
- Composto 48/80 (Sigma) – dissolvido em PBS, i.p., tratamento crônico.

2.12 Quimiocinas e anticorpos

As quimiocinas MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, KC e MIP-2, tão bem como os anticorpos contra estas quimiocinas para serem utilizados respectivamente para estímulo e tratamento *in vivo* foram obtidas da Peprotech. O anticorpo anti-TNF α foi gentilmente cedido pelo Dr. Steeve Poole (NIBISC-Inglaterra).

A. Participação de quimiocinas na migração de neutrófilos induzida por OVA

A.1. Sensibilização e desafio com OVA: camundongos BALB/c, C57Bl/6, MIP-1 α ^{-/-}, p55^{-/-}, IL-4^{-/-}, IL-10^{-/-}, CCR1^{-/-}, CCR5^{-/-}, MHC II^{-/-}, β_2 ^{-/-}, linfócitos B^{-/-} e ICAM-1^{-/-} foram sensibilizados conforme protocolo previamente descrito (Canetti, C. e cols., 2001). Brevemente, emulsão contendo OVA (100 μ g), PBS (100 μ L) e adjuvante completo de Freund (100 μ L) foi injetada s.c. no dorso dos animais. Após 7 e 14 dias, os animais foram novamente injetados com OVA (s.c.), mas em emulsão contendo PBS e adjuvante incompleto de Freund. Para os animais controle foi realizado o mesmo procedimento experimental, porém sem a presença de OVA nas emulsões. Após decorridos 21 dias da primeira injeção, os animais controles e imunizados foram desafiados i.p. com PBS ou OVA dissolvida em PBS. O lavado peritoneal foi recuperado para a determinação da migração de neutrófilos, concentração de MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, KC, MIP-2, TNF α e LTB₄ (ELISA) e expressão de RNAm para quimiocinas e receptores de quimiocinas por RPA ou RT-PCR. A efetividade da imunização foi avaliada pela titulação de IgG anti-OVA no soro dos animais controles e imunizados e, também foi avaliada pela análise da concentração de IL-2 (ELISA) no sobrenadante de esplenócitos coletados de animais controles e imunizados e estimulados *in vitro* com OVA.

A.2. Determinação da migração de neutrófilos: o recrutamento de neutrófilos foi avaliado nas diferentes linhagens de camundongos utilizadas (BALB/c, C57Bl/6, MIP-1 α ^{-/-}, p55^{-/-}, IL-4^{-/-}, IL-10^{-/-}, CCR1^{-/-}, CCR5^{-/-}, MHC II^{-/-}, β_2 ^{-/-}, linfócitos B^{-/-} e ICAM-1^{-/-}) após administração i.p. de PBS ou OVA. A migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos da linhagem selvagem (BALB/c e C57Bl/6) também foi verificada após a administração i.p. de MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, KC, MIP-2. Em intervalos de tempo pré-determinados, os camundongos foram sacrificados em câmara de éter, sendo as células peritoneais recuperadas com 3 mL de PBS/EDTA. Deste lavado peritoneal, realizou-se a contagem total e diferencial dos leucócitos presentes.

A.2₁- Contagem total: a quantificação total do infiltrado celular foi realizada em contador automático de células (COUNTER[®] AC T; Coulter Corporation, Miami, Florida, USA) ou através da diluição de uma alíquota (20 µL) do lavado peritoneal diluída em solução de Turk, na proporção de 1:20 e a contagem realizada em câmara de Neubauer[®], com o auxílio de microscópio óptico (aumento de 100x) e contador manual de células.

A.2₂- Contagem diferencial: a contagem diferencial foi realizada a partir de esfregaços preparados com o auxílio de citocentrífuga (Cytospin 3-Shandon, Lipshaw Inc; Pittsburgh, Pennsylvania, U.S.A.), onde as células foram sedimentadas em lâminas e seguidamente coradas pelo corante panótico rápido (LaborClin; Produtos para Laboratório Ltda, Pinhais, PR, Brasil), para a caracterização dos leucócitos presentes de acordo com suas características núcleo-citoplasmáticas observadas ao microscópio óptico utilizando-se de objetiva de imersão em óleo. Em cada lâmina foram contadas 100 células, diferenciando-se quatro tipos celulares: neutrófilos, eosinófilos, mastócitos e células mononucleares. A quantificação de cada tipo celular foi calculada a partir do percentual encontrado em relação ao número total de células. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) do número de leucócitos por cavidade estudada.

A.3. Análise da efetividade do procedimento de imunização com OVA: a efetividade do procedimento de imunização com OVA em camundongos selvagens (BALB/c ou C57Bl/6) ou camundongos ICAM-1^{-/-}, MHCII^{-/-}, β₂-microglobulina^{-/-}, linfócitos B^{-/-}, IL-4^{-/-}, IL-10^{-/-}, MIP-1α^{-/-}, CCR5^{-/-} ou p55^{-/-} foi verificada através da concentração de IL-2 nos sobrenadantes de esplenócitos estimulados *in vitro* com OVA ou pela titulação de IgG anti-OVA no soro desses animais.

A.3₁- Cultura de esplenócitos: sob condições estéreis, o baço de camundongos imunizados e não-imunizados foi coletado e transferido para tubos cônicos contendo 5 mL de RPMI 1640 incompleto à 4°C. Em seguida, os baços foram macerados com o auxílio de homogenizadores, lavados (400g; 10 min.; 4°C) e as hemácias presentes removidas através de lise hiposmótica com cloreto de amônio. A suspensão celular obtida foi incubada (5x10⁵ células/poço) *in vitro* com RPMI suplementado na presença de OVA (10 µg/mL; Sigma) ou ConA (utilizado como um mitógeno no processo de estimulação; 2 µg/mL; Sigma) durante 24 ou 72 h e a concentração de IL-2 foi determinada no sobrenadante da cultura pelo método de ELISA. Ao

fim do período de incubação, 100 µL da suspensão foi utilizado para determinação da viabilidade celular pela técnica de exclusão com Azul de Trypan (1:1).

A.3.2- Titulação de IgG anti-OVA: a titulação de IgG α-OVA do soro de animais não-imunizados ou imunizados foi realizado pelo método de ELISA (Berg, 1984). Brevemente, placas de 96 poços foram recobertas com 50 µL de OVA (10 µg/mL) diluída em tampão fosfato de cálcio e incubadas “overnight” à 4°C. As placas foram então lavadas com PBS contendo 0,5% de Tween 20 e cobertas com o soro obtido dos animais imunizados ou não-imunizados, através de diluições seriadas, e incubadas “overnight” a 4°C. As placas foram lavadas e incubadas durante 1h, à temperatura ambiente com o anticorpo anti-IgG murino biotinizado (Vector), diluído em PBS contendo 0.5% de Tween 20. As placas foram lavadas e incubadas 30 minutos, à temperatura ambiente, com avidina-peroxidase diluída 1:5000 em PBS contendo 0.5% de Tween 20. Após nova lavagem, as placas foram incubadas com 50 µL do substrato dihidroclorido de 1,2-fenilenodiamina (ortofenileno diamina, OPD, Sigma) diluído em tampão fosfato contendo com 0,4 µL/mL de H₂O₂ 30%. Após desenvolvimento de cor, a reação foi bloqueada com ácido sulfúrico 1M e, em seguida, a medida da absorbância foi determinada a 490 nm.

A.4- Determinação da participação de mastócitos na migração de neutrófilos induzida por OVA em camundongos imunizados: para pesquisarmos a participação de mastócitos residentes peritoneais na migração de neutrófilos induzida por OVA, camundongos BALB/c foram imunizados e depletados de mastócitos peritoneais pelo tratamento crônico com composto 48/80 ou pela injeção prévia de água destilada. A seguir, esses camundongos foram desafiados com OVA e a migração de neutrófilos foi avaliada na 4^ah, conforme descrito anteriormente.

A.4.1- Depleção de mastócitos pelo tratamento crônico com o composto 48/80: o procedimento experimental foi realizado conforme padronizado em nosso laboratório (Di Rosa *et cols.*, 1971). Camundongos BALB/c imunizados foram tratados com o composto 48/80 após 16 dias da primeira imunização e o desafio com OVA foi realizado 24 h após a última injeção com composto 48/80. O tratamento foi realizado conforme o seguinte protocolo: dia 1: 0,6 mg/Kg; dia 2: 1,0 mg/Kg; dia 3: 1,2 mg/Kg e dia 4: 2,4 mg/Kg. Todas as doses foram administradas i.p., duas vezes ao dia. O lavado peritoneal foi corado com azul de toluidina para

a coloração específica de mastócitos e analisado em microscopia óptica para a verificação da efetividade do tratamento.

A.4₂- Depleção de mastócitos pela injeção prévia de água destilada: o protocolo experimental foi realizado conforme descrito anteriormente (Mendonça *e cols.*, 1986) e padronizado em nosso laboratório. Camundongos BALB/c imunizados foram tratados com água destilada (3 mL; i.p.) após 18 dias da primeira imunização. O desafio com OVA foi realizado 72 h após administração da água destilada e a migração de neutrófilos na 4^ah após o desafio foi analisada conforme descrito anteriormente. O lavado peritoneal foi corado com azul de toluidina para a coloração específica de mastócitos e analisado em microscopia óptica para a verificação da efetividade do tratamento.

A.5- Análise da expressão de RNAm para quimiocinas e receptores de quimiocinas: a expressão de RNAm para as quimiocinas MIP-a e para os receptores CCR1, CCR2 e CCR5 nas células peritoneais de camundongos imunizados e desafiados com OVA foi determinada através do ensaio de proteção de RNase (RPA). A expressão de RNAm para as quimiocinas KC e MIP-2 e para o receptor CXCR2 nas células peritoneais de camundongos imunizados e desafiados com OVA foi determinada RT-PCR

A.5₁- Extração de RNA: a extração do RNA total foi realizada utilizando as recomendações do fabricante do reagente Trizol (Gibco BRL, Life technologies, Rockville, MD, USA). Células peritoneais (10⁷ células) foram coletadas das cavidades peritoneais dos camundongos imunizados após 1 h do desafio com PBS (controle) ou OVA (10 µg/cavidade), centrifugadas e homogeneizadas em Trizol (1mL) por 10 min à temperatura ambiente. Seguidamente, 200 µL de clorofórmio (Gibco BRL, Life technologies, Rockville, MD, USA) foi adicionado à suspensão e, centrifugados a 13.000 g por 15 min à 4°C. A fase aquosa formada foi transferida para um tubo novo e adicionada na proporção de 1:1 com isopropanol, sendo agitado em vortex e incubado por 15 min à -20°C, para a precipitação do RNA em fase aquosa. Após incubação, os tubos foram centrifugados a 13.000 g por 4°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em etanol PA, agitado em vortex e centrifugado novamente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em água livre de RNase. A concentração de RNA foi determinada pela densidade óptica no comprimento de onda de 260 nm, com o auxílio do aparelho GeneQuant (Amersham Biosciences Corp., Piscataway).

A.5₂- Ensaio de proteção de RNase (RPA): O ensaio de proteção de RNase foi realizado de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Brevemente, a hibridização de 10 µg de cada amostra de RNA foi realizada durante uma noite com os moldes (sondas) previamente marcados com α -³²P (UTP), que acompanham o kit (Pharmigen). Ao fim da hibridização, as fitas de RNA que não foram hibridizadas foram digeridas com RNase A. Após a digestão, as amostras foram tratadas com proteinase K, extraída com clorofórmio e precipitada na presença de acetato de amônio 4M. As amostras foram então aplicadas em gel de sequenciamento de acrilamida-uréia, sendo usado como marcadores moldes incorporados com α -³²P (UTP), não digeridos pela RNase. Foi então realizada a corrida das amostras em corrente de 30 W com tampão de eletroforese 0,5 X Tris-borato/EDTA (TBE). O gel foi absorvido com papel de filtro, secado em vácuo e revelado em cassete de Storm Phosphorimage à temperatura ambiente por 48 h. Foram usados os kits mCK5b e mCR5 que correspondem respectivamente à seqüência de quimiocinas e receptores de quimiocinas.

A.5₃- Determinação da expressão de mRNA para as quimiocinas KC e MIP-2 e para o receptor CXCR2: A expressão de RNAm para MIP-2, KC e do receptor CXCR2 nas células peritoneais de camundongos imunizados e desafiados i.p. com PBS (controle) ou OVA (10 µg/cavidade) foi detectada por RT-PCR, baseado em protocolo previamente descrito (Tateda *et cols.*, 2001; Zhang *et cols.*, 2001). Brevemente, o 3 µg do RNA celular total extraído das células peritoneais coletadas de camundongos imunizados após 1h do desafio com PBS ou OVA foi utilizado para a síntese de DNA complementar (DNAc) por reação com a enzima transcriptase reversa (Superscript II, Invitrogen Life Tech) seguindo protocolo do fabricante. O DNAc foi então amplificado utilizando primers para KC, MIP-2, e CXCR2. Cada amostra também foi utilizada paralelamente para a análise da expressão de β -actina. Os primers utilizados tiveram a seguinte seqüência: KC: 5'-TGA-GCT-GCG-CTG-TCA-GTG-CCT-3' e 5'-AGA-AGC-CAG-CGT-TCA-CCA-GGA-3'; MIP-2: 5'-TGC-CTG-AAG-ACC-CTG-CCA-AGG-3' e 5'-GTT-AGC-CTT-GCC-TTT-GTT-CAG-3'; CXCR2: 5'-TGT TCT TTG CCC TGA CCT TGC-3' e 5'-ACG CAG TAC GAC CCT CAA ACG-3'; e β -actina: 5'-ATG-GAT-GAC-GAT-ATC-GCT-C-3' e 5'-G AT-TCC-ATA-CCC-AGG-AAG-G-3'. A reação de PCR consistiu-se de 35 ciclos com as seguintes temperaturas e tempo:, 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, 75°C por 1 min, com temperatura inicial de desnaturação e extensão consistindo em 94°C por 4 min e 72°C por 10 min, respectivamente. Após a amplificação, as amostras (20 µl) foram separadas

em gel de agarose a 2% e corado com 0.3 mg de brometo de etídio (0.003%). As bandas foram visualizadas e fotografadas em iluminação UV.

A.6- Efeito dos anticorpos α -RANTES, α -MIP-1 β , α -MIP-2 ou α -KC sobre a migração de neutrófilos induzida por OVA: para estudarmos a participação das quimiocinas RANTES, MIP-1 β , MIP-2 e KC na migração de neutrófilos induzida por OVA em camundongos imunizados, camundongos BALB/c imunizados foram pré-tratados i.p. com anticorpo controle (soro pré-imune; 35 μ L/cavidade) ou com anticorpo inespecífico (3 μ g/cavidade) ou com soro anti-RANTES (35 μ L/cavidade), anticorpo policlonal α -MIP-1 β (15 μ g/cavidade), anticorpo anti-MIP-2 ou com o anticorpo policlonal anti-KC e após 15 min, os animais foram desafiados com OVA. Após 4h, a migração de neutrófilos foi avaliada conforme descrito anteriormente.

A.7- Participação do TNF α e do LTB $_4$ na migração de neutrófilos induzida pela MIP-1 α : o envolvimento do TNF α no recrutamento de neutrófilos induzido pela MIP-1 α foi determinado através da utilização de anticorpos anti-TNF α e pela administração de MIP-1 α em camundongos deficientes do receptor tipo I do TNF α (p55 $^{-/-}$). O envolvimento do LTB $_4$ foi verificado pelo tratamento dos animais com MK886. Deste modo, camundongos BALB/c foram pré-tratados i.p. com anticorpo controle (soro pré-imune; 35 μ L/cavidade) ou v.o. com metilcelulose (0,1%), com o anticorpo α -TNF α (35 μ L/cavidade) ou com MK886 (1 mg/Kg; v.o.) e após 15 min ou 1h, respectivamente, os animais foram injetados i.p. com MIP-1 α (10 ng/cavidade) e a migração de neutrófilos avaliada na 4^ah. Camundongos C57Bl/6 e p55 $^{-/-}$ foram injetados i.p. com PBS ou MIP-1 α (10 ng/cavidade) e a migração de neutrófilos foi avaliada 4 h após estímulo. O lavado peritoneal coletado de camundongos selvagens ou p55 $^{-/-}$ injetados com MIP-1 α também foi utilizado para a determinação da concentração de LTB $_4$ por ELISA.

A.8- Envolvimento dos receptores CCR1, CCR5 e CXCR2 na migração de neutrófilos induzida por OVA: o envolvimento dos receptores CCR1 e CCR5 na migração de neutrófilos induzida por OVA ou MIP-1 α foi avaliada em animais deficientes para estes receptores (CCR1 $^{-/-}$ e CCR5 $^{-/-}$). Deste modo, camundongos CCR1 $^{-/-}$ e CCR5 $^{-/-}$ foram imunizados e desafiados com OVA (10 μ g/cavidade) e a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal foi determinada na 4^ah. MIP-1 α (10 ng/cavidade) foi administrada em camundongos CCR1 $^{-/-}$ ou CCR5 $^{-/-}$ e a migração de neutrófilos foi avaliada 4h após o estímulo.

A participação do receptor CXCR2 na migração de neutrófilos induzida por OVA ou MIP-2 foi verificada pelo tratamento dos animais com repertaxina, droga antagonista dos receptores CXCR1 e CXCR2. Assim, camundongos BALB/c foram pré-tratados 1h antes do desafio com OVA (10 µg/cavidade) ou MIP-2 (30 ng/cavidade) com caboximetilcelulose 0,1% (v.o.; controle), ou com repertaxina (25 mg/Kg; v.o.). Após 4h da administração da OVA em camundongos imunizados ou MIP-2 em camundongos naíve, a migração de neutrófilos foi avaliada conforme descrito anteriormente.

A.9 Participação do TNF α e do LTB $_4$ na migração de neutrófilos induzida pela MIP-2: o envolvimento do TNF α no recrutamento de neutrófilos induzido pela MIP-2 foi determinado através da utilização de anticorpos anti-TNF α e pela administração de MIP-2 em camundongos deficientes do receptor tipo I do TNF α (p55 $^{-/-}$). O envolvimento do LTB $_4$ foi verificado pelo tratamento dos animais com MK886. Deste modo, camundongos BALB/c foram pré-tratados i.p. com anticorpo controle (soro pré-imune; 35 µL/cavidade) ou v.o. com metilcelulose (0,1%), com o anticorpo α -TNF α (35 µL/cavidade) ou com MK886 (1 mg/Kg; v.o.) e após 15 min ou 1h, respectivamente, os animais foram injetados i.p. com MIP-2 (30 ng/cavidade) e a migração de neutrófilos avaliada na 4^ah. Camundongos C57Bl/6 e p55 $^{-/-}$ foram injetados i.p. com PBS ou MIP-2 (30 ng/cavidade) e a migração de neutrófilos foi avaliada 4 h após estímulo.

A.10- Efeito do tratamento com drogas antiinflamatórias na migração de neutrófilos induzida por MIP-2: com o objetivo de avaliarmos o envolvimento da histamina, de produtos da cicloxigenase e de citocinas na migração de neutrófilos induzida pela MIP-2, camundongos BALB/c foram pré-tratados com veículo, droga inibidora do receptor H1 da histamina (pirilamina; 30 mg/Kg; sc; 30 min antes), droga inibidora do receptor H2 da histamina (cimetidina; 30 mg/Kg; sc; 30 min antes), droga inibidora da cicloxigenase (indometacina; 5.0 mg/Kg; s.c.; 30 min antes), droga antagonista do receptor da IL-1 (IL-1ra; 10mg/Kg; i.v.; 15 min antes) droga inibidora da transcrição gênica (talidomida; 50 mg/Kg; s.c.; 1h antes); ou com glicocorticóide (dexametasona; 0.5 mg/Kg; s.c.; 1h antes) e injetados i.p. com MIP-2 (30 ng/cavidade) ou PBS (controle). Após 4h da administração da quimiocina, a migração de neutrófilos foi avaliada conforme descrito anteriormente.

A.11- Envolvimento da MIP-1 α na migração de neutrófilos induzida pela MIP-2: para verificarmos a existência de hierarquia de liberação entre as quimiocinas MIP-1 α e MIP-

2, camundongos BALB/c foram pré-tratados i.p. com anticorpo inespecífico (3 µg/cavidade), anticorpo policlonal anti-MIP-1α (15 µg/cavidade) ou com o anticorpo policlonal anti-MIP-2 e após 15 min, os animais foram desafiados com MIP-2 (30 ng/cavidade) ou MIP-1α (10 ng/cavidade), respectivamente. O lavado peritoneal também foi coletado para a determinação da concentração de MIP-1α, TNFα e LTB₄ por ELISA. Como controle da efetividade dos anticorpos em neutralizarem suas respectivas quimiocinas, a migração de neutrófilos também foi determinada em camundongos tratados com anti-MIP-1α ou anti-MIP-2 e injetados com as respectivas quimiocinas. Após 4h, a migração de neutrófilos foi avaliada conforme descrito anteriormente.

A.12- ELISA: a concentração de MIP-1α, MIP-1β, RANTES, KC, MIP-2, TNFα e IL-2 foi quantificada pelo método imunoenzimático ELISA, baseado em protocolo previamente descrito (Taktak e Lee, 1991). Brevemente, placas de microtitulação (96 poços) foram recobertas e incubadas com os anticorpos αMIP-1α (0,5 µg/mL), αMIP-1β (3 µg/mL), αRANTES (1 µg/mL), αKC (2 ng/mL), αMIP-2 (2 ng/mL), αTNFα (2 µg/mL) ou αIL-2 (5,0 ng/mL) diluídos em PBS durante 15-18h a 4°C. após o tempo de incubação, as placas foram lavadas com PBS + Tween 20 (0,1%) e bloqueadas durante 1h, à temperatura ambiente, com BSA 1%. Seguidamente, as placas foram lavadas e incubadas “overnight” à 4°C com as amostras ou com as citocinas em diluições seriadas (curva padrão; base 2). Após este período, as placas foram novamente lavadas e incubadas com o respectivo anticorpo biotilado: αMIP-1α (0,2 µg/mL), αMIP-1β (0,5 µg/mL), αRANTES (0,2 µg/mL), αKC (0,2 µg/mL), αMIP-2 (0,2 µg/mL), αTNFα (1:1000) ou αIL-2 (0,5 µg/mL); por 1h à temperatura ambiente. As placas foram lavadas e 50 µL de avidina-HRP (1:5000; DAKO A/S, Denmark) foi adicionado para cada poço. A placa foi novamente incubada por 30 min à temperatura ambiente e, após este tempo, a placa foi lavada e adicionada com 50µL do substrato dihidroclorido de 1,2-fenilenodiamina (ortofenileno diamina, OPD, 200 µg/mL; Sigma) diluído em tampão fostato contendo com 0,4 µL/mL de H₂O₂ 30%. Após 15 min, a reação foi interrompida com a adição de H₂SO₄ 1M. A leitura foi realizada em espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda de 490 nm. Os resultados foram expressos como picograma de MIP-1α, MIP-1β, RANTES, KC, MIP-2, TNFα ou IL-2 /mL, baseando-se na curva padrão para cada citocina ou quimiocina.

A concentração de LTB₄ nas amostras foi determinada através de uso de um LTB₄ EIA Kit (Cayman Chemical) de acordo com as normas do fabricante. Brevemente, placa

de microtitulação pré-coberta com anticorpo monoclonal α LTB₄ foi adicionada com LTB₄ recombinante murino em diluições seriadas (curva-padrão; base 2) ou com as amostras. Logo após, todos os poços foram adicionados com a enzima LTB₄-acetilcolinesterase e com o anticorpo α LTB₄ e a placa foi incubada “overnight” à temperatura ambiente. Após incubação, a placa foi lavada e cada poço foi adicionado com 200 μ L do reagente de Ellman (contendo substrato para a acetilcolinesterase) e a placa foi incubada durante 90 min para o desenvolvimento de cor. Após o tempo de incubação, a leitura foi realizada em espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda de 405 nm. Os resultados foram expressos como picogramas de LTB₄/mL, baseando-se na curva padrão.

B- Mecanismos envolvidos no recrutamento de neutrófilos induzido por KC.

B.1- Migração de neutrófilos induzida por KC: com o objetivo de avaliarmos a dose de KC para ser utilizada nos demais ensaios experimentais, uma curva dose e tempo resposta foi determinada para KC. Deste modo, camundongos BALB/c foram injetados i.p. com KC nas doses de 1, 3 e 10 ng/cavidade e o recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal foi verificado 4, 12, 24, 48 e 72 h após administração da quimiocina. A migração de neutrófilos foi determinada conforme descrito anteriormente

B.2- Participação do TNF α , da IL-1 e do LTB₄ na migração de neutrófilos induzida por KC: o envolvimento do TNF α no recrutamento de neutrófilos induzido por KC foi determinado através da utilização de anticorpos anti-TNF α e pela administração de KC em camundongos deficientes do receptor tipo I do TNF α (p55^{-/-}). O envolvimento da IL-1 e do LTB₄ foi verificado pelo tratamento dos animais com IL-1ra ou MK886, respectivamente. Deste modo, camundongos BALB/c foram pré-tratados i.p. com anticorpo controle (soro pré-imune; 35 μ L/cavidade) ou v.o. com metilcelulose (0,1%), com o anticorpo α -TNF α (35 μ L/cavidade; 15 min antes), com IL-1ra (10mg/Kg; i.v.; 15 min antes) ou com MK886 (1 mg/Kg; v.o.; 1h antes) e injetados i.p. com KC (3 ng/cavidade) e a migração de neutrófilos avaliada na 4^ah. Camundongos C57Bl/6 e p55^{-/-} foram injetados i.p. com PBS ou KC (3 ng/cavidade) e a migração de neutrófilos foi avaliada 4 h após estímulo. O lavado peritoneal de camundongos injetados i.p. com KC (3 ng/cavidade) foi coletado após 1,5 h da administração da quimiocina para a determinação da concentração de IL-1 β , TNF α e LTB₄ por ELISA.

B.3- Efeito do tratamento com drogas antiinflamatórias na migração de neutrófilos induzida por KC: com o objetivo de avaliarmos o envolvimento da histamina, de produtos da cicloxigenase e de citocinas na migração de neutrófilos induzida por KC, camundongos BALB/c foram pré-tratados com veículo, droga inibidora do receptor H1 da histamina (pirilamina; 30 mg/Kg; sc; 30 min antes), droga inibidora do receptor H2 da histamina (cimetidina; 30 mg/Kg; sc; 30 min antes), droga inibidora da cicloxigenase (indometacina; 5.0 mg/Kg; s.c.; 30 min antes), droga inibidora da transcrição gênica (talidomida; 50 mg/Kg; s.c.; 1h antes); ou com glicocorticóide (dexametasona; 0.5 mg/Kg; s.c.1h antes) e injetados i.p. com KC (3 ng/cavidade) ou PBS (controle). Após 4h da administração da quimiocina, a migração de neutrófilos foi avaliada conforme descrito anteriormente.

B.4- Determinação da participação de células residentes na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por KC ou MIP-2: com o intuito de pesquisarmos a participação de células residentes peritoneais na migração de neutrófilos induzida pelas quimiocinas CXC KC e MIP-2, camundongos BALB/c foram depletados de mastócitos peritoneais pelo tratamento crônico com composto 48/80 ou pela injeção prévia de água destilada ou tiveram a população de macrófagos aumentada pelo tratamento com tioglicolato. Após os tratamentos, os animais foram injetados com KC e MIP-2. A migração de neutrófilos foi avaliada na 4^ah, conforme descrito anteriormente.

B.4₁- Depleção de mastócitos pelo tratamento crônico com o composto 48/80: O procedimento experimental foi realizado conforme padronizado em nosso laboratório (Di Rosa *e cols.*, 1971). Os animais foram tratados com o composto 48/80 durante 4 dias. O tratamento foi realizado conforme o seguinte protocolo: dia 1: 0,6 mg/Kg; dia 2: 1,0 mg/Kg; dia 3: 1,2 mg/Kg e dia 4: 2,4 mg/Kg. Todas as doses foram administradas i.p., duas vezes ao dia. Os estímulos, MIP-2 (30 ng/cavidade), KC (3 ng/cavidade) e fMLP (100 nmoles), foram injetados i.p., 24h após o término do tratamento. A migração de neutrófilos foi determinada conforme descrito anteriormente. O lavado peritoneal foi corado com azul de toluidina para a coloração específica de mastócitos e analisado em microscopia óptica para a verificação da efetividade do tratamento.

B.4₂- Depleção de mastócitos pela injeção prévia de água destilada: O protocolo experimental foi realizado conforme descrito anteriormente (Mendonca *e cols.*, 1986) e

padronizado em nosso laboratório. As cavidades peritoneais foram pré-tratadas com 3 mL de água destilada i.p., três dias antes dos estímulos, MIP-2 (30 ng/cavidade), KC (3 ng/cavidade) e fMLP (100 nmoles). A migração de neutrófilos e a efetividade do tratamento foi analisada conforme descrito anteriormente. O lavado peritoneal foi corado com azul de toluidina para a coloração específica de mastócitos e analisado em microscopia óptica para a verificação da efetividade do tratamento.

B.4₃- Aumento da população de macrófagos pela injeção de tioglicolato: as cavidades peritoneais foram estimuladas com 3 mL de tioglicolato 3% i.p., 4 dias antes do estímulo com MIP-2 (30 ng/cavidade), KC (3 ng/cavidade) ou fMLP (100 nmoles). A migração de neutrófilos e macrófagos foi analisada conforme descrito anteriormente.

B.5- Liberação de fator quimioatraente para neutrófilos por macrófagos estimulados com KC ou MIP-2: com o objetivo de estudarmos se macrófagos peritoneais liberam fator quimioatraente para neutrófilos quando estimulados com KC ou MIP-2, macrófagos peritoneais foram incubado *in vitro* com estas quimiocinas e o sobrenadante dessas células foi injetados em camundongos BALB/c e a migração de neutrófilos foi determinada conforme descrito anteriormente. Brevemente, a cavidade peritoneal de camundongos pré-tratados i.p. com tioglicolato 3% foi lavada com a administração i.p. de 3 mL de RPMI heparinizado (10 UI/mL) estéril. O lavado peritoneal foi centrifugado (1200 rpm; 10 min), ressuspendido com RPMI e distribuído em placas de polietileno contendo 24 poços (1 mL/poço), na concentração de 10^6 células/poço. As placas foram incubadas a 37°C durante 1h em estufa com 5% de CO₂, permitindo deste modo à aderência dos macrófagos às placas. Ao final da incubação, o sobrenadante de cada poço foi desprezado e os leucócitos aderidos foram lavados por 3 vezes com RPMI, eliminando deste modo, as demais células coletadas da cavidade peritoneal, visto que normalmente elas não aderem à placa de cultura. Os poços foram adicionados com RPMI completo e deixados em estufa a 37°C com 5%CO₂, overnight. Ao final do período de incubação, as placas foram novamente lavadas, adicionadas com RPMI incompleto e deixadas em estufa a 37°C com 5% CO₂, por 1h, para a eliminação do soro bovino fetal. Seguidamente, as placas foram novamente lavadas e adicionadas com RPMI ou com RPMI contendo as quimiocinas, MIP-2 (0,3; 3,0 e 30 ng/mL) ou KC (0,1; 1,0 ou 10 ng/mL). As placas foram mantidas em estufa contendo 5% CO₂ na temperatura de 37°C, durante 30 min. Após a incubação, as placas foram novamente lavadas por três vezes para a retirada das quimiocinas e, novamente incubadas com RPMI incompleto, 37°C, 5% CO₂, durante 1,5h, 3h ou 6h para

liberação de fator quimiotático. À seguir, os sobrenadantes foram coletados e esterilizados por meio de filtros Millipore 0,22 μm (Millipore Corporation, Bed Ford, MA, USA), e utilizados para os ensaios de migração de neutrófilos ou para a dosagem de IL-1 β , TNF α e LTB $_4$ por ELISA, conforme descrito anteriormente.

3. Análise estatística: os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) dos grupos utilizados nos procedimentos experimentais, determinadas pelo teste de análise de variância (ANOVA) seguido do teste corretivo de Bonferroni. Valores com $P < 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

A. Participação de quimiocinas na migração de neutrófilos induzida por OVA.

A.1- Migração de neutrófilos induzida por OVA em animais imunizados:

corroborando com resultados obtidos previamente pelo nosso laboratório (Canetti, C. *e cols.*, 2001), verificamos que o desafio intraperitoneal com OVA (1, 3 ou 10 $\mu\text{g}/\text{cavidade}$) em camundongos BALB/c imunizados induziu migração de neutrófilos de maneira dose (Fig 1A) e tempo (Fig 1B) dependente. Verificamos também que a administração i.p. de OVA em animais não-imunizados (controle) não foi capaz de induzir significativa migração de neutrófilos (Fig 1A). Do mesmo modo, verificamos também que a injeção i.p. de PBS em animais imunizados com OVA não induz recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal (Fig 1A). OVA induziu recrutamento de neutrófilos em camundongos imunizados com valor máximo após 4h de sua administração, apresentando significativa redução na 12^ah e retornando a valores semelhantes ao grupo controle na 24^a h (Fig 1B).

O desafio com OVA em animais imunizados também induziu o recrutamento de eosinófilos e células mononucleares. A partir da 12^ah, observamos um pequeno e significativo aumento no número de eosinófilos pode ser observado. Na 24^ah, quando o número de neutrófilos havia retornado a valores semelhantes ao basal, observamos um significativo acúmulo tanto de eosinófilos como de células mononucleares (Tabela I).

A.2- Envolvimento de linfócitos no recrutamento de neutrófilos induzido por OVA: com o objetivo de caracterizar a participação de linfócitos na migração de neutrófilos induzida por OVA em animais imunizados, camundongos selvagens (C57Bl6) ou deficientes para a molécula MHCII (MHC^{-/-}), β_2 -microglobulina (β_2 ^{-/-}) ou para linfócitos B (B^{-/-}) foram imunizados e desafiados com OVA. Os camundongos MHCII^{-/-} referem-se aos animais deficientes de linfócitos T CD₄⁺, uma vez que esses animais não apresentam moléculas MHC de classe II, os precursores de linfócitos T CD₄⁺ não reconhecem essas moléculas durante o processo de maturação no timo, através da seleção positiva, entrando prematuramente em apoptose.

Como demonstrado na figura 2, camundongos MHCII^{-/-} quando imunizados e desafiados com OVA não exibiram significativo acúmulo de neutrófilos, quando comparados aos camundongos selvagens. Do mesmo modo, o desafio com OVA em camundongos β_2 ^{-/-} imunizados não foi capaz de induzir significativa migração de neutrófilos para a cavidade

peritoneal quando comparado aos animais selvagens (Fig 3A), sugerindo a importância desses tipos leucocitários na migração de neutrófilos induzida por OVA. A participação de linfócitos B também foi observada, desde que comparados aos camundongos selvagens, animais deficientes para esse tipo celular também não apresentaram significativo acúmulo de neutrófilos (Fig 4A). Apesar de camundongos MHCII^{-/-}, $\beta_2^{-/-}$ e B^{-/-} não responderem ao desafio com OVA, estes animais apresentaram eficiente migração neutrófilos contra um estímulo inespecífico, o LPS (100 ng/cavidade), descartando a possibilidade de ausência de resposta inflamatória nestes animais (dado não mostrado).

A eficiência do protocolo de imunização com OVA e adjuvante de Freund foi verificada através da titulação de IgG anti-OVA no soro e também pela liberação de IL-2 no sobrenadante de esplenócitos incubados com OVA. Deste modo, verificamos que, camundongos selvagens (WT; C57Bl/6) imunizados apresentaram quantidades detectáveis do anticorpo em todas as diluições realizadas. Conforme esperado, a titulação do soro obtido de animais não-imunizados apresentou baixa concentração de IgG anti-OVA, com valores próximos ao zero. Com relação aos animais deficientes, observamos que assim como os animais selvagens, o processo de imunização provocou o surgimento de IgG anti-OVA no soro de camundongos $\beta_2^{-/-}$ imunizados, em quantidades detectáveis do anticorpo em todas as diluições realizadas, enquanto que animais não-imunizados apresentaram baixa concentração de IgG anti-OVA (Fig 3B). Conforme esperado, camundongos deficientes para linfócitos TCD4⁺ (MHCII^{-/-}) e células B (B^{-/-}) não apresentaram quantidades significativas de IgG anti-OVA quando comparados aos camundongos não-imunizados ou aos camundongos da linhagem selvagem imunizados (Figuras 2B e 4B).

Com relação à concentração de IL-2 no sobrenadante de esplenócitos de animais falso-imunizados e imunizados, observou-se um significativo aumento da concentração de IL-2 no sobrenadante de esplenócitos obtidos de animais imunizados e estimulados *in vitro* com OVA, comparado aos esplenócitos de animais imunizados e incubados com meio de cultura. Do mesmo modo, sobrenadantes de esplenócitos obtidos de camundongos MHCII^{-/-} (Tabela II), $\beta_2^{-/-}$ (Tabela III) ou B^{-/-} (Tabela IV) apresentaram significativa concentração de IL-2 quando estimulados *in vitro* com OVA, quando comparados aos sobrenadantes de esplenócitos obtidos de camundongos não-imunizados e incubados *in vitro* com OVA. Tanto esplenócitos obtidos de camundongos imunizados como de não imunizados não liberaram concentração significativa de IL-2 quando incubados somente com meio de cultura (Tabelas II, III e IV).

A.3- Mastócitos modulam negativamente a migração de neutrófilos induzida por OVA em camundongos imunizados: ainda com o intuito de investigar a participação de leucócitos no modelo de imunização e desafio com OVA, dirigimos nosso estudo para investigar a participação de mastócitos residentes peritoneais. Deste modo, como pode ser observado na figura 5B, quando submetemos camundongos imunizados ao protocolo de depleção de mastócitos, tanto com composto 48/80 como pela utilização de altos volumes de água destilada, verificamos uma potencialização da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal 4h após o desafio com OVA. Este resultado indica um importante envolvimento dos mastócitos peritoneais neste modelo de inflamação de origem imune, modulando negativamente o recrutamento de neutrófilos.

A efetividade dos tratamentos em reduzir a população peritoneal foi verificada através de coloração específica para mastócitos. Desta forma, verificamos que camundongos imunizados e tratados com 48/80 ou água destilada apresentam significativa redução na população de mastócitos peritoneais quando comparados aos camundongos imunizados e submetidos ao tratamento somente com PBS (Fig 5A).

A.4- IL-10 controla a migração de neutrófilos induzida por OVA em animais imunizados: a partir do resultado demonstrando que mastócitos residentes peritoneais modulam negativamente a migração de neutrófilos em camundongos imunizados e desafiados com OVA, buscamos investigar o envolvimento das citocinas IL-4 e IL-10. Estas citocinas apresentam conhecida atividade antiinflamatória, além de que mastócitos são conhecidos como célula fonte dessas citocinas. Desta forma, submetemos camundongos deficientes para IL-4 (IL-4^{-/-}) ou IL-10 (IL-10^{-/-}) ao protocolo de imunização e desafio com OVA. Nossos resultados demonstram que o desafio com OVA em camundongos deficientes de IL-14 imunizados não apresentou diferenças significativas na migração de neutrófilos quando comparados aos animais selvagens. Entretanto, o desafio com OVA em camundongos deficientes para IL-10 imunizados demonstrou um exacerbado recrutamento de neutrófilos quando comparados aos camundongos selvagens (Fig 6). Interessantemente, esses animais apresentaram o mesmo perfil de resposta verificado com a depleção de mastócitos, sugerindo que a IL-10 possivelmente possa ser um dos mediadores liberados por mastócitos residentes peritoneais.

A.5- OVA não induz migração de neutrófilos em camundongos deficientes da molécula de adesão ICAM: para verificarmos a participação da molécula de adesão ICAM-1 no modelo de imunização e desafio com OVA, camundongos deficientes da molécula de

adesão ICAM-1 (ICAM-1^{-/-}) foram submetidos a este protocolo experimental. Nossos resultados demonstram uma deficiente migração de neutrófilos após 4h do desafio com OVA em animais ICAM-1^{-/-} imunizados, quando comparados aos camundongos da linhagem selvagem (C57Bl/6) imunizados e desafiados com OVA (Fig 7). Entretanto, verificamos que essa deficiência apresentada no recrutamento de neutrófilos não se deve a uma baixa efetividade do protocolo de imunização, pois esses animais apresentaram titulação de IgG anti-OVA e produção de IL-2 por esplenócitos estimulados *in vitro* com OVA com valores similares aos animais da linhagem selvagem (Fig 7B e Tabela V, respectivamente).

A.6- Participação de quimiocinas na migração de neutrófilos induzida por OVA em camundongos imunizados: para verificarmos a participação de quimiocinas CC e CXC mediando o recrutamento de neutrófilos induzido por OVA em animais imunizados, submetemos as células peritoneais coletadas 1h após o desafio com OVA ao ensaio de RPA para a detecção da expressão de RNAm para as quimiocinas TCA-3, MCP-1, MIP-2, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES e LTN e dos receptores CCR2, CCR5 e CCR1 e, ao ensaio de RT-PCR para detecção da expressão de RNAm para as quimiocinas KC e MIP-2 e para o receptor CXCR2. Desta forma, detectamos um significativo aumento da expressão de RNAm para as quimiocinas CC MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES e para as quimiocinas CXC KC e MIP-2 quando comparado aos animais imunizados e injetados com PBS (Fig 8A e 8C). Por outro lado, não detectamos aumento significativo da expressão de RNAm para a quimiocina C linfotactina ou para as quimiocinas CC eotaxina, MCP-1 e TCA-3. Além disso, observamos um aumentada expressão de RNAm para os receptores CCR1 e CXCR2 (Fig 8B e 8C). Entretanto, o ensaio não apresentou aumento significativo na expressão dos receptores CCR2 e CCR5 (Fig 8B). A integridade celular foi verificada através da análise da expressão de RNAm para moléculas constitutivas como L32 e GAPDH (RPA) e β -actina (RT-PCR), onde não verificamos deiferenças entre o grupo controle e o grupo injetado com OVA.

Perante a este resultado, verificamos por ELISA a concentração de MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, KC e MIP-2 no lavado peritoneal após 2h do desafio com OVA em animais imunizados. Desta forma, quando comparado aos camundongos imunizados e injetados com PBS, o lavado peritoneal coletado de camundongos imunizados e desafiados com OVA apresentou um aumento significativo na concentração de MIP-1 α , RANTES, KC e MIP-2. Entretanto, a presença de MIP-1 β no lavado peritoneal de camundongos imunizados e desafiados com OVA não foi detectada pelo nosso ensaio (Fig. 9A e 9B).

A.7- A migração de neutrófilos induzida por OVA em camundongos imunizados é dependente de MIP-1 α : embora tenhamos detectado a expressão das quimiocinas MIP-1 α , RANTES e MIP-1 β , nossos resultados demonstram que somente MIP-1 α participa do recrutamento de neutrófilos em animais imunizados e desafiados com OVA. Para isto, observamos que diferentemente dos animais da linhagem selvagem (C57Bl/6), OVA não foi capaz de induzir migração de neutrófilos em animais deficiente de MIP-1 α (MIP-1 $\alpha^{-/-}$) imunizados (Fig 10A). O estado de imunização dos camundongos da linhagem MIP-1 $\alpha^{-/-}$ submetidos ao protocolo de sensibilização com OVA também foi verificado. A imunização provocou um aumento significativo de IgG anti-OVA no soro coletado tanto de camundongos da linhagem selvagem com deficientes de MIP-1 α , apresentando quantidades detectáveis do anticorpo em todas diluições realizadas até a razão de 1:4000, fato que não ocorreu com as diluições do soro obtido de animais não-imunizados. Além disso, verificamos que a concentração de IL-2 obtida do sobrenadante de esplenócitos oriundos dos camundongos MIP-1 $\alpha^{-/-}$ e incubados *in vitro* com OVA foi similar àquela observada nos sobrenadantes de camundongos da linhagem selvagem (Tabela VI). O possível envolvimento de RANTES e MIP-1 β no recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de animais imunizados e desafiados com OVA também foi verificado. Nossos resultados demonstram que o tratamento dos animais imunizados com anticorpos anti-RANTES ou anti-MIP-1 β não interferiu com a migração de neutrófilos verificada 4h após o desafio com OVA (Fig 10B). A eficiência destes anticorpos em neutralizar suas respectivas quimiocinas foi confirmada, pois o tratamento de camundongos BALB/c com anti-RANTES ou anti-MIP-1 β inibiu significativamente o acúmulo de neutrófilos observado 4h após a injeção i.p de RANTES (30 ng/cavidade; inibição de 58.7%; Fig 10C) ou MIP-1 β (10 ng/cavidade; inibição de 31%; Fig 10D).

Uma vez que observamos que a quimiocina CC MIP-1 α participa da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por OVA em camundongos imunizados, realizamos uma curva temporal da liberação desta quimiocinas. Assim, observamos um pico da liberação de MIP-1 α 1,5 h após o desafio com OVA, seguido de uma redução na 2^ah após o desafio, porém permanecendo com valor significativo quando comparado aos animais controles, retornando aos valores semelhantes ao basal na 4^a h (Fig 11).

A.8- Envolvimento da MIP-1 α na liberação de TNF α e LTB₄ após desafio com OVA em animais imunizados: resultados obtidos previamente pelo nosso grupo demonstrou

que a migração de neutrófilos em camundongos imunizados e desafiados com OVA é dependente da liberação de TNF α por linfócitos T CD $_4^+$, tendo como mediador final o LTB $_4$ (Canetti, C. *e cols.*, 2001). Neste sentido, investigamos se MIP-1 α estaria envolvida na liberação destes mediadores. Desta forma, verificamos que o desafio i.p. com OVA em camundongos selvagens imunizados induziu uma elevada concentração de TNF α e LTB $_4$ no lavado peritoneal coletado 2h após estímulo. Entretanto, quando submetemos camundongos MIP-1 $\alpha^{-/-}$ ao mesmo protocolo de imunização e desafio com OVA, não detectamos nenhuma diferença significativa entre os níveis de TNF α (Fig 12A) e LTB $_4$ (Fig 12B) encontrados no lavado peritoneal dos camundongos imunizados e desafiados com OVA e a concentração destes mediadores no lavado peritoneal dos animais controle.

A.9- Envolvimento do TNF α e do LTB $_4$ na migração de neutrófilos induzida pela MIP-1 α : a partir do achado que a migração de neutrófilos após imunização e desafio com OVA é mediada pela MIP-1 α e, animais deficientes para esta quimiocinas não apresentam aumento significativo na liberação de TNF α e LTB $_4$, direcionamos este estudo para verificarmos se MIP-1 α também induz acúmulo de neutrófilos de maneira semelhante ao observado com OVA em animais imunizados. Assim sendo, verificamos primeiramente que a administração i.p. da MIP-1 α induziu migração de neutrófilos em camundongos BALB/c de maneira dose e tempo dependente. A menor dose de MIP-1 α que induziu significativa migração de neutrófilos foi 3 ng/cavidade, enquanto que o pico de recrutamento de neutrófilos foi observado na dose de 10 ng/cavidade (Fig 13A). Além disso, observamos que a migração de neutrófilos induzida pela MIP-1 α alcançou o pico na 4^ah após administração da quimiocina, apresentando-se reduzida na 8^ah e retornando a valores próximos do basal na 12^ah e assim permanecendo até a 24^ah (Fig 13B). Devido ao fato da dose 10ng ter induzido acúmulo de neutrófilos semelhantemente à dose 30 ng, essa dose foi utilizada para os demais ensaios experimentais.

Com relação a participação do TNF α na migração de neutrófilos induzida pela MIP-1 α , observamos que o tratamento i.p. dos camundongos com soro anti-TNF α foi capaz de inibir significativamente o acúmulo de neutrófilos na cavidade peritoneal induzido pela administração i.p. com MIP-1 α (Fig 14A). Confirmando o envolvimento do TNF α , a administração i.p. de MIP-1 α em camundongos deficientes do receptor do tipo I para o TNF α

(p55^{-/-}) não foi capaz de induzir significativo recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal (Fig 14B).

Concernente a participação do LTB₄ na migração de neutrófilos induzida pela MIP-1α, os resultados demonstram que a ausência de migração de neutrófilos em camundongos p55^{-/-} injetados com MIP-1α é acompanhada de uma carência na produção de LTB₄. Conforme pode ser observado na figura 14C, MIP-1α induziu elevada produção de LTB₄ no lavado peritoneal coletado dos camundongos da linhagem selvagem. Entretanto, o mesmo resultado não foi observado com animais p55^{-/-}. Deste modo, nossos dados indicam que a migração de neutrófilos induzida pela MIP-1α é dependente da liberação sequencial de TNFα e LTB₄. Confirmando o envolvimento do LTB₄ na migração de neutrófilos induzida pela MIP-1α, camundongos BALB/c foram pré-tratados com MK886 (droga inibitória da atividade da 5-lipoxigenase), 1h antes da administração da MIP-1α. Conforme podemos observar na figura 14D, MIP-1α não induziu significativo recrutamento de neutrófilos em animais com reduzida atividade da 5-lipoxigenase.

A.10- A migração de neutrófilos induzida por OVA em camundongos imunizados depende da interação entre MIP-1α e o receptor CCR1: como MIP-1α induz suas funções através da interação com os receptores CCR1 e CCR5, investigamos por qual receptor MIP-1α estaria interagindo para induzir recrutamento de neutrófilos após desafio com OVA. Para este objetivo, submetemos camundongos selvagens ou deficientes do receptor tipo 1 (CCR1^{-/-}) ou tipo 5 (CCR5^{-/-}) para quimiocinas CC ao protocolo de imunização e desafio com OVA. Nossos resultados demonstram que o desafio com OVA não induz migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos CCR1^{-/-} imunizados (Fig 15). Por outro lado, a ausência da expressão do receptor CCR5 não inibiu a migração de neutrófilos induzida por OVA (Fig 16). Esta mesma estratégia foi utilizada para verificarmos por qual receptor MIP-1α estaria induzindo migração de neutrófilos. Conforme esperado, MIP-1α induziu significativa migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal dos camundongos CCR5^{-/-} (Fig 16), fato não observado com os camundongos CCR1^{-/-} injetados com a quimiocina (Fig 15).

A.11- A migração de neutrófilos em camundongos imunizados e desafiados com OVA é dependente de MIP-2: para verificarmos o envolvimento de MIP-2 e KC no recrutamento de neutrófilos induzido por OVA, camundongos imunizados foram pré-tratados com anticorpos anti-MIP-2 e anti-KC e seguidamente desafiados com OVA. Nossos resultados

demonstram que somente o pré-tratamento com anti-MIP-2 foi capaz de inibir significativamente o acúmulo de neutrófilos na cavidade peritoneal, 4h após o desafio com OVA, enquanto que o pré-tratamento com anti-KC não apresentou diferença significativa quando comparado aos animais pré-tratados com IgG controle (Fig 17A). A eficiência destes anticorpos em neutralizar suas respectivas quimiocinas foi confirmada, pois o tratamento de camundongos normais com anti-MIP-2 ou anti-KC inibiu significativamente o recrutamento de neutrófilos observado 4h após a administração i.p de MIP-2 ou KC, respectivamente (Fig 17B e 17C). Deste modo nossos resultados demonstram que embora tenhamos detectado tanto a expressão de RNAm como a produção das proteínas para MIP-2 e KC, somente MIP-2 esta envolvida com o evento de recrutamento de neutrófilos em animais imunizados e desafiados com OVA.

Uma vez que observamos que a quimiocina CXC MIP-2 participa da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por OVA em camundongos imunizados, realizamos uma curva temporal da liberação desta quimiocina. Deste modo, observamos um aumento significativo da produção de MIP-2 após 1,5 h do desafio com OVA, alcançando o pico na 2^ah, conseqüentemente observamos uma redução na 4^ah após o desafio, porém permanecendo com valor significativo, retornando aos níveis basais 8h após o desafio (Fig 18).

A.12- A migração de neutrófilos induzida por MIP-2 ou por OVA é dependente do receptor CXCR2: uma vez que demonstramos que a migração de neutrófilos induzida por OVA em camundongos imunizados é dependente da liberação de MIP-2 e que OVA também induz significativo aumento da expressão de RNAm para CXCR2, investigamos o efeito do antagonismo deste receptor na migração de neutrófilos induzida por OVA ou MIP-2. Para isto, primeiramente realizamos uma curva dose-resposta para MIP-2. Deste modo, observamos que a migração de neutrófilos induzida pela administração i.p. de MIP-2 em camundongos BALB/c ocorreu de maneira dose-dependente. Conforme demonstrado na figura 19A, quando comparado ao grupo controle (PBS), observa-se que as doses de 10 e 30 ng/cavidade induziram significativo recrutamento de neutrófilos, com pico na dose de 30 ng/cavidade, sendo esta a dose escolhida para a utilização nos demais ensaios experimentais. Além disso, MIP-2 provocou um acentuado acúmulo de neutrófilos para a cavidade peritoneal com pico na 4^ah, tendo um declínio na 12^ah e voltando aos níveis basais na 24^ah (Fig 19B).

Para verificarmos a participação do receptor CXCR2 na migração de neutrófilos induzida por OVA, camundongos imunizados foram pré-tratados com repertaxina, droga antagonista do receptor CXCR2, e logo em seguida desafiados com OVA. Os resultados

demonstram que o pré-tratamento com repertaxina foi efetivo em bloquear o recrutamento de neutrófilos induzido por OVA em camundongos imunizados (Fig 20A). Conforme esperado observamos uma acentuada inibição da migração de neutrófilos induzida por MIP-2 em camundongos pré-tratados com repertaxina (Fig 20B). Este resultado indica a que MIP-2 participa da migração de neutrófilos induzida por OVA através da interação com o receptor CXCR2.

A.13- MIP-2 participa da migração de neutrófilos induzida por OVA em animais imunizados através da liberação sequencial de MIP-1 α , TNF α e LTB $_4$: com a finalidade de determinarmos a posição da MIP-2 na cascata de mediadores inflamatórios liberados após desafio com OVA, primeiramente testamos a hipótese de que o recrutamento de neutrófilos induzido pela MIP-2 é dependente da produção de TNF α e LTB $_4$. A migração de neutrófilos induzida pela administração i.p. de MIP-2 foi significativamente inibida pelo pré-tratamento com anticorpo anti-TNF α ou com as drogas talidomida (50 mg/Kg; s.c.), droga inibidora da transcrição gênica de citocinas, MK886 (1 mg/Kg; v.o.), droga inibidora da síntese de leucotrienos ou com glicocorticóide (dexametasona; 0.5 mg/Kg; s.c.; Fig 21A). O envolvimento do TNF α na migração de neutrófilos induzida pela MIP-2 foi confirmado, desde que a administração i.p. de MIP-2 em camundongos deficientes para o receptor tipo I do TNF α (p55^{-/-}) induziu reduzida migração de neutrófilos quando comparada com a migração de neutrófilos induzida pela injeção de MIP-2 em animais da linhagem selvagem (C57Bl6; Fig 21B).

Para verificarmos a participação de outros mediadores inflamatórios na migração de neutrófilos induzida pela MIP-2, esta quimiocina foi administrada i.p. em camundongos BALB/c pré-tratados com PBS (s.c.; controle), droga inibidora do receptor H1 da histamina (pirilamina; 30 mg/Kg; sc), droga inibidora do receptor H2 da histamina (cimetidina; 30 mg/Kg; sc), droga inibidora da ciclooxigenase (indometacina; 5.0 mg/Kg; s.c.) ou com IL-1ra (10 mg/Kg; i.v.), antagonista do receptor da IL-1. Nossos resultados demonstram que nenhum desses mediadores pesquisados participam da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida pela MIP-2 (Tabela VII).

Uma vez verificado que do mesmo modo que MIP-1 α , MIP-2 induz recrutamento de neutrófilos dependentemente da liberação de TNF α e LTB $_4$, nosso próximo passo foi investigar se havia hierarquia de liberação destas quimiocinas. Deste modo, nossos resultados demonstraram que o tratamento com o anticorpo anti-MIP-1 α inibiu significativamente a

migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida pela MIP-2 (Fig 22B), fato não observado quando os animais foram pré-tratados com anti-MIP-2 e injetados i.p. com MIP-1 α (Fig 22A). Para verificarmos a efetividade do anticorpo anti-MIP-1 α , camundongos BALB/c foram pré-tratados com anti-MIP-1 α e em segundas injetados com a própria quimiocina. Desta forma verificamos que o tratamento com anti-MIP-1 α inibe significativamente a migração de neutrófilos induzida pela MIP-1 α (PBS: 0,28 \pm 0,19; MIP-1 α : 2,7 \pm 0,32; α -MIP-1 α +MIP-1 α : 0,7 \pm 0,18; número de neutrófilos $\times 10^6$ /cavidade \pm EPM). Com o intuito de confirmarmos o resultado obtido com o anticorpo, animais deficientes para a quimiocina MIP-1 α (MIP-1 $\alpha^{-/-}$), diferentemente dos animais selvagens, não se apresentaram responsivos ao estímulo com MIP-2 (Fig 22C). Além disso, observamos um significativo aumento na concentração de MIP-1 α , TNF α e LTB $_4$ quando comparado com os animais injetados i.p. com PBS, onde o pré-tratamento com anti-MIP-1 α inibiu significativamente a liberação de TNF α e LTB $_4$ induzida pela MIP-2 (Tabela VIII). Estes resultados sugerem que conforme verificado com MIP-2, a migração de neutrófilos induzida por OVA em animais imunizados é dependente da liberação de MIP-2 para que inicie a liberação seqüencial de MIP-1 α , TNF α e LTB $_4$.

B. Mecanismos envolvidos na migração de neutrófilos induzida por KC e MIP-2

B.1- KC induz migração de neutrófilos dependentemente da liberação de TNF α , LTB $_4$ e IL-1: nesta parte de nosso estudo, nosso objetivo foi investigar os mecanismos envolvidos na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida pela administração i.p. com KC em camundongos BALB/c. Assim como verificamos com a administração i.p. com MIP-2, KC também induziu migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos BALB/c de maneira dose e tempo dependente. Quando comparado ao grupo controle, observamos que as doses de 1, 3 e 10 ng/cavidade apresentaram significativa migração de neutrófilos (Fig 23A). Devido ao fato da dose 3 ng/cavidade ter induzido acúmulo de neutrófilos semelhantemente à dose 10ng/cavidade, essa dose foi utilizada para os demais ensaios experimentais. Além disso, verificou-se que o recrutamento de neutrófilos induzido por KC teve pico na 4^ah, tendo um declínio na 12^ah e voltando aos níveis semelhantes ao basal na 24^ah (Fig 23B).

Para verificarmos a participação de mediadores inflamatórios na migração de neutrófilos induzida por KC, camundongos BALB/c foram pré-tratados com PBS (s.c.; controle), droga inibidora do receptor H1 da histamina (pirilamina; 30 mg/Kg; sc), droga

inibidora do receptor H2 da histamina (cimetidina; 30 mg/Kg; sc), droga inibidora da ciclooxigenase (indometacina; 5.0 mg/Kg; s.c.), droga inibidora da transcrição gênica (talidomida; 50 mg/Kg; s.c.); droga inibidora da 5-lipoxigenase (MK886; 1.0 mg/Kg; v.o.), droga antagonista do receptor para a IL-1 (IL-1ra; 10 mg/Kg; i.v.) ou com glicocorticóide (dexametasona; 0.5 mg/Kg; s.c.). Nossos resultados demonstram o pré-tratamento com MK886, talidomida e IL-1ra inibiu significativamente a migração de neutrófilos induzida por KC. Além disso, o pré-tratamento dos animais com dexametasona inibiu completamente a migração de neutrófilos induzida por KC (Fig 24A). O pré-tratamento com pirilamina, cimetidina ou indometacina não interferiu com a migração de neutrófilos após administração i.p. com KC (Tabela IV). Confirmando o envolvimento do TNF α na migração de neutrófilos induzida por KC, a administração i.p. de KC em camundongos deficientes para o receptor tipo I do TNF α (p55^{-/-}) induziu reduzida migração de neutrófilos quando comparada com animais da linhagem selvagem (C57Bl6; Fig 24B). Conforme esperado, concentrações significativas de IL-1 β , TNF α e LTB₄ foram encontradas no lavado peritoneal de camundongos injetados i.p. com KC (Tabela X).

B.2- KC e MIP-2 induzem migração de neutrófilos de maneira dependente da participação de células residentes peritoneais: com o intuito de investigar a participação de células residentes peritoneais na migração de neutrófilos induzida pelas quimiocinas KC e MIP-2, submetemos camundongos BALB/c ao protocolo de depleção de mastócitos peritoneais com composto 48/80 ou por altos volumes de água destilada e ao protocolo de aumento da população de macrófagos peritoneais com a administração de Tioglicolato 3%. Os resultados demonstram que camundongos depletados de mastócitos residentes peritoneais, tanto com 48/80 (Fig 25B) como pela água destilada (Fig 26B), ao serem injetados com tanto KC como com MIP-2 apresentaram potencialização na migração de neutrófilos observada 4h após a administração das quimiocinas. A efetividade do tratamento em reduzir a população de mastócitos peritoneais esta demonstrada na figura 25A (tratamento com 48/80) e 26A (tratamento com água destilada). Além disso, verificamos que ambos tratamentos não afetaram a responsividade da cavidade peritoneal ao fMLP, estímulo independente de mastócitos (Fig 25B e 26B). Este resultado indica uma importante participação dos mastócitos peritoneais no sentido de controlar negativamente a migração de neutrófilos induzida tanto por KC como MIP-2.

A participação dos macrófagos foi verificada através do aumento da população de macrófagos peritoneais pelo tratamento com Tioglicolato 3%. Deste modo, conforme demonstrado na figura 27B, o aumento da população de macrófagos peritoneais potencializou a migração de neutrófilos induzida tanto por KC como por MIP-2 (Fig 27B). A efetividade do tratamento esta demonstrada na figura 27A, onde se pode observar um significativo aumento da população de macrófagos peritoneais em animais submetidos ao pré-tratamento com tioglicolato. Além disso, o protocolo não interferiu com a migração de neutrófilos induzida pelo fMLP, estímulo independente de macrófagos peritoneais (Fig 27B). Este dado sugere que macrófagos residentes peritoneais possam ser responsáveis pela liberação de fatores quimioatraentes para neutrófilos quando estimulados *in vivo* com as quimiocinas KC e MIP-2.

Para confirmarmos a participação de macrófagos peritoneais na migração de neutrófilos induzida por KC ou MIP-2, estas células foram coletadas de camundongos BALB/c previamente injetados com Tioglicolato e estimulados *in vitro* com diferentes concentrações de MIP-2 (0,3; 3 e 30 ng/mL) ou KC (0,1; 1 e 10 ng/mL). Após 30 min de estímulo com as quimiocinas, os macrófagos foram lavados e incubados com meio (RPMI) durante diferentes intervalos de tempo (1,5; 3 ou 6h). A seguir o sobrenadante destas células foi coletado e injetado em camundongos BALB/c. Os resultados demonstram que MIP-2 na concentração de 3 ng/mL e no tempo de 6h de incubação foi capaz de induzir significativa migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal (Fig 28A). O mesmo resultado foi observado com KC, onde a concentração de 10 ng/mL e o tempo de 6h foi capaz de induzir significativa migração de neutrófilos (Fig 28B). Desde que observamos que a migração de neutrófilos induzida por KC é dependente de IL-1, TNF α e LTB $_4$, e que MIP-2 induz recrutamento de neutrófilos dependentemente da liberação de TNF α e LTB $_4$ procuramos investigar se macrófagos peritoneais estimulados *in vitro* com KC ou MIP-2 liberam estes mediadores inflamatórios. Conforme postado na tabela XI, macrófagos peritoneais estimulados *in vitro* tanto com KC como por MIP-2 liberaram quantidades significativas de IL-1 β , TNF α e LTB $_4$, quando comparado aos macrófagos incubados com meio de cultura. Este resultado sugere que macrófagos residentes peritoneais possam ser a célula fonte desses mediadores na migração de neutrófilos induzida por KC e MIP-2.

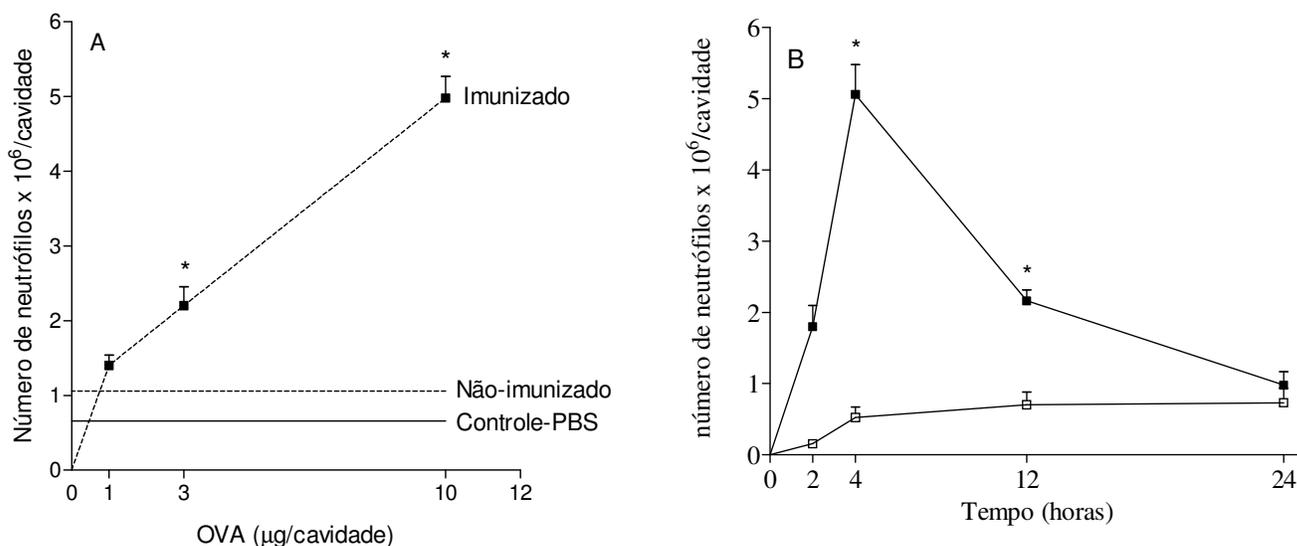


Figura 1. OVA induz migração de neutrófilos de maneira dose e tempo dependente. (A) As barras indicam o número de neutrófilos coletados das cavidades peritoneais 4h após o desafio i.p. com OVA (10 µg/cavidade) em camundongos não-imunizados, ou em camundongos imunizados (1; 3 e 10 µg/cavidade). A migração de neutrófilos também foi avaliada em camundongos imunizados e desafiados com PBS (controle). (B) As barras indicam o número de neutrófilos coletados das cavidades peritoneais de camundongos imunizados após 2; 4; 12 ou 24 h após desafio com PBS (quadrados abertos) ou OVA (10 µg/cavidade; quadrados fechados). Os resultados estão expressos como média±EPM (n=5). * $P < 0.05$ quando comparado ao grupo controle (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

Tabela 1. Tempo resposta da migração de leucócitos induzida pelo desafio i.p. de PBS ou OVA (10 µg/cavidade) em camundongos Imunizados.

TEMPO (horas)	NEUTRÓFILOS (x10 ⁶ /cavidade)		EOSINÓFILOS (x10 ⁶ /cavidade)		CÉLULAS MONONUCLEARES (x10 ⁶ /cavidade)	
	Controle	OVA	Controle	OVA	Controle	OVA
0	0,41±0,20	1,06±0,20	0,09±0,03	0,15±0,08	3,65±0,42	3,56±0,45
2	0,57±0,18	2,03±0,16 [*]	0,07±0,02	0,13±0,05	2,63±0,56	3,12±0,26
4	0,16±0,06	4,80±0,37 [*]	0,12±0,08	0,09±0,01	4,85±0,95	4,34±1,24
8	0,36±0,21	3,33±0,34 [*]	0,08±0,01	0,25±0,14	4,34±1,15	5,21±0,96
12	0,25±0,37	3,06±0,43 [*]	0,07±0,04	1,62±0,54 [*]	3,85±0,36	5,85±1,14
24	0,39±0,42	1,26±0,17	0,09±0,10	2,52±0,36 [*]	3,65±0,86	6,57±1,18 [*]

Os resultados estão expressos como média±EPM (n=5). * *P*,0,05 quando comparado ao grupo controle.

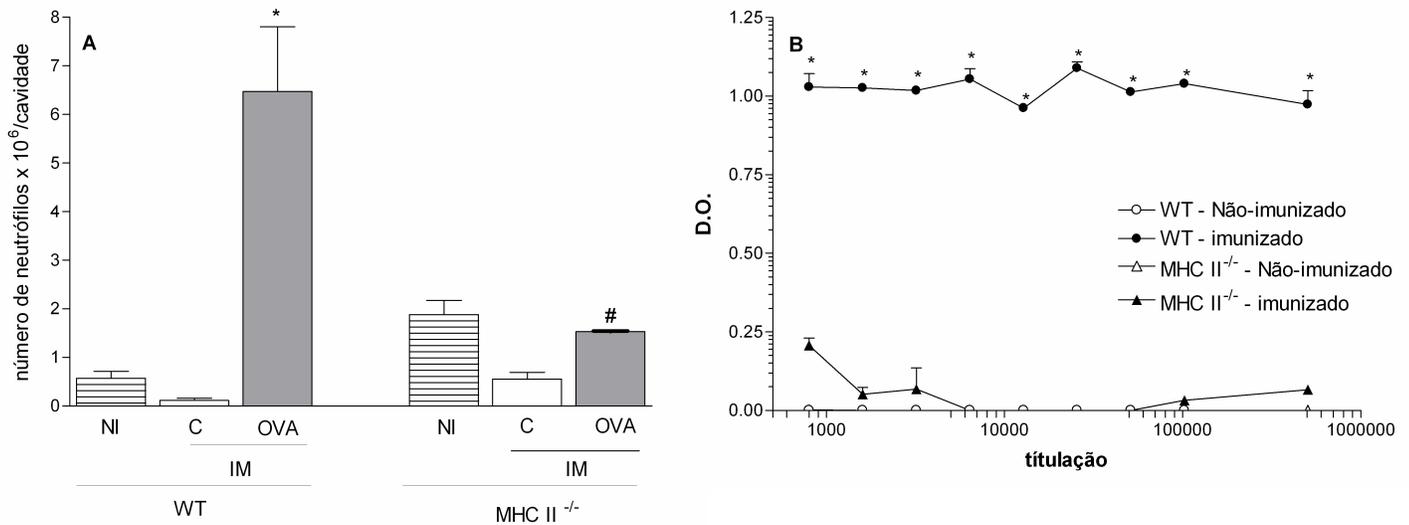


Figura 2. OVA não induz o recrutamento de neutrófilos em camundongos deficientes da molécula MHC II (MHCII^{-/-}) imunizados. (A) As barras representam o número de neutrófilos coletados 4h após desafio com PBS (barra vazia) ou OVA (10 µg/cavidade) em camundongos WT (C57Bl/6) ou MHCII^{-/-} imunizados (barras cheias) ou não-imunizados (NI). Os resultados estão apresentados como média±EPM (n=5). **P*<0,05 quando comparado ao grupo controle. #*P*<0,05 quando comparado aos camundongos WT imunizados e desafiados com OVA (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni). (B) Titulação de IgG α-OVA do soro de camundongos WT ou MHC II^{-/-} não-imunizados ou imunizados com OVA. Os resultados estão representados como média±EPM (duplicata). **P*<0.05 quando comparado ao grupo não-imunizado (student’s t-test).

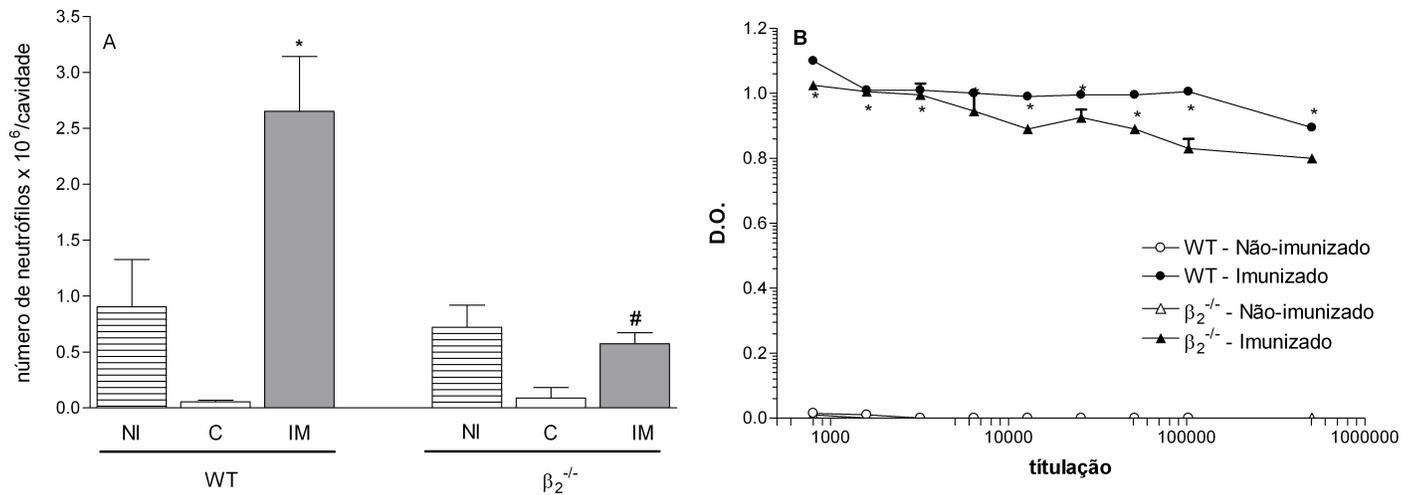


Figura 3. OVA não induz migração de neutrófilos em camundongos deficientes de linfócitos T CD₈⁺ ($\beta_2^{-/-}$) imunizados. As barras representam o número de neutrófilos coletados 4h após desafio com PBS (barra vazia) ou OVA (10 μ g/cavidade) em animais WT (C57Bl/6) ou $\beta_2^{-/-}$ imunizados (barra cheia) ou não-imunizados (NI). Os resultados estão apresentados como média \pm EPM (n=5). * P <0,05 quando comparado ao grupo controle. # P <0,05 quando comparado com os animais WT imunizados e desafiados com OVA (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni). (B) Titulação de IgG α -OVA do soro de camundongos WT ou $\beta_2^{-/-}$ não-imunizados ou imunizados com OVA. Os resultados estão representados como média \pm EPM (duplicata). * P <0.05 quando comparado ao grupo não-imunizado (student`s t-test).

Tabela II: Concentração de IL-2 no sobrenadante de esplenócitos oriundos de camundongos WT (C57B16) ou deficientes da molécula MHC de classe II (MHCII^{-/-}).

Esplenócitos	OVA (10 µg/mL)	IL-2 (ng/mL; 24 h)
WT controle	-	ND
WT controle	+	6,54±6,54
WT imunizado	-	30,69±17,6
WT imunizado	+	95,21±2,38*
MHCII ^{-/-} controle	-	55,05±14,88
MHCII ^{-/-} controle	+	42,87±16,24
MHCII ^{-/-} imunizado	-	21,21±14,88
MHCII ^{-/-} imunizado	+	121,38±16,54*

Esplenócitos (5×10^5 células/poço) foram incubados conforme descrito em Material & Métodos. Os resultados estão expressos como média±EPM (n=triplícata); ND=não detectado. *P<0,05 quando comparado ao grupo controle (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

Tabela III: Concentração de IL-2 no sobrenadante de esplenócitos oriundos de camundongos WT (C57B16) ou deficientes de Linfócitos T CD8 ($\beta_2^{-/-}$).

Esplenócitos	OVA (10 µg/mL)	IL-2 (pg/mL; 24 h)
WT controle	-	ND
WT controle	+	ND
WT imunizado	-	ND
WT imunizado	+	68,26±1,26*
$\beta_2^{-/-}$ controle	-	ND
$\beta_2^{-/-}$ controle	+	1,47±1,02
$\beta_2^{-/-}$ imunizado	-	ND
$\beta_2^{-/-}$ imunizado	+	78,27±12,14*

Esplenócitos (5×10^5 células/poço) foram incubados conforme descrito em Material & Métodos. Os resultados estão expressos como média±EPM (n=triplícata); ND=não detectado. *P<0,05 quando comparado ao grupo controle (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

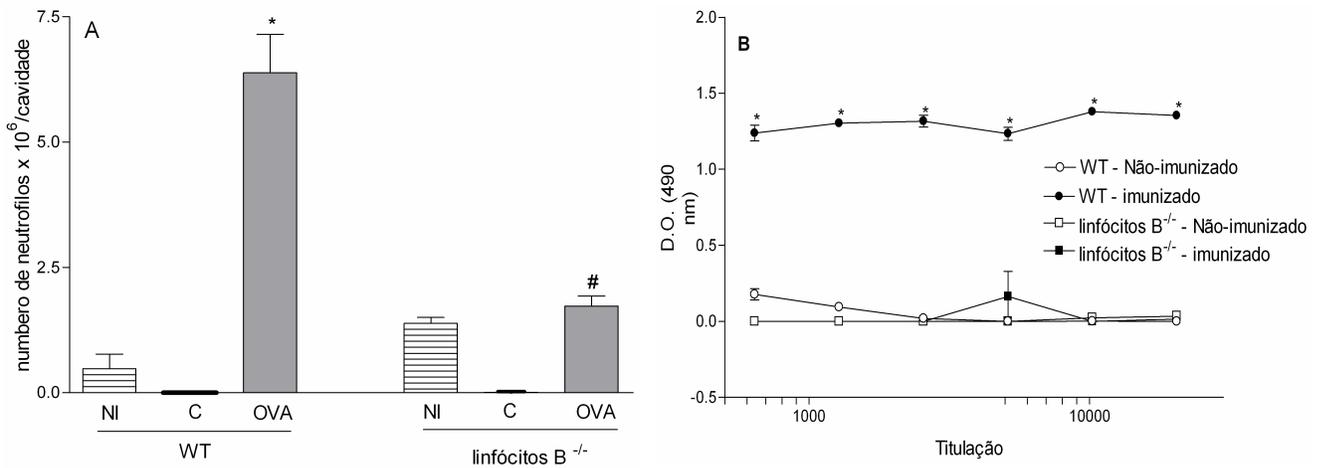


Figura 4. OVA não induz migração de neutrófilos em camundongos deficientes de linfócitos B imunizados. (A) As barras representam o número de neutrófilos coletados 4h após desafio com PBS (barra vazia) ou OVA (10 µg/cavidade) em animais WT (C57Bl/6) ou linfócitos B^{-/-} imunizados (barra cheia) ou não-imunizados (FI). Os resultados estão apresentados como média±EPM (n=5). **P*<0,05 quando comparado ao grupo controle. #*P*<0,05 quando comparado com os animais WT imunizados e desafiados com OVA (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni). (B) Titulação de IgG α-OVA do soro de camundongos WT ou linfócitos B^{-/-} não-imunizados ou imunizados com OVA. Os resultados estão representados como média±EPM (duplicata). **P*<0.05 quando comparado ao grupo não-imunizado (student`s t-test).

Tabela IV: Concentração de IL-2 no sobrenadante de esplenócitos oriundos de camundongos WT (C57Bl6) ou deficientes de linfócitos B (Linfócitos B^{-/-}).

Esplenócitos	OVA (10 µg/mL)	IL-2 (pg/mL; 24 h)
WT controle	-	ND
WT controle	+	ND
WT imunizado	-	6,69±3,6
WT imunizado	+	123,21±4,82*
Linfócitos B ^{-/-} controle	-	1,23±0,98
Linfócitos B ^{-/-} controle	+	2,47±1,62
Linfócitos B ^{-/-} imunizado	-	1,89±1,18
Linfócitos B ^{-/-} imunizado	+	98,25±6,34*

Esplenócitos (5x10⁵ células/poço) foram incubados conforme descrito em Material & Métodos. Os resultados estão expressos como média±EPM (n=triplicata); ND=não detectado. *P<0,05 quando comparado ao grupo controle (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

Tabela V: Concentração de IL-2 no sobrenadante de esplenócitos oriundos de camundongos WT (C57Bl6) ou deficientes da molécula de adesão ICAM (ICAM^{-/-}).

Esplenócitos	OVA (10 µg/mL)	IL-2 (pg/mL; 24 h)
WT controle	-	ND
WT controle	+	ND
WT imunizado	-	ND
WT imunizado	+	89,04±3,25*
ICAM ^{-/-} controle	-	ND
ICAM ^{-/-} controle	+	ND
ICAM ^{-/-} imunizado	-	ND
ICAM ^{-/-} imunizado	+	69,28±2,27*

Esplenócitos (5x10⁵ células/poço) foram incubados conforme descrito em Material & Métodos. Os resultados estão expressos como média±EPM (n=triplicata); ND=não detectado. *P<0,05 quando comparado ao grupo controle (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

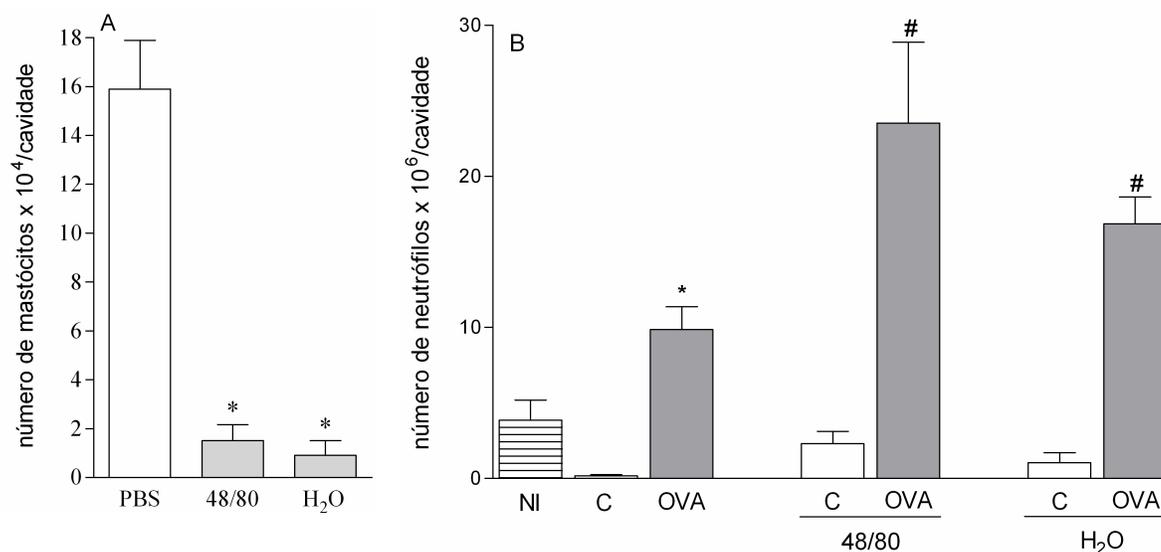


Figura 5. A depleção de mastócitos peritoneais potencializa a migração de neutrófilos induzida por OVA em camundongos imunizados. (A) As barras representam o número de mastócitos coletados das cavidades peritoneais de camundongos pré-tratados com PBS (barra vazia), 48/80 ou água destilada (H₂O). (B) As barras representam o número de neutrófilos coletados da cavidade peritoneal de camundongos não-imunizados e injetados com OVA (10 µg/cavidade) ou após o desafio com PBS ou OVA em camundongos imunizados pré-tratados com PBS (C), 48/80 ou água (H₂O). Os resultados estão apresentados como média±EPM (n=5). (A) **P*<0,01 quando comparado com o número de mastócitos nas cavidades peritoneais dos animais controle. (B) **P*<0,001 quando comparado com a injeção de PBS em animais controle. #*P*<0,05 quando comparado com o desafio com OVA nos animais imunizados e tratados com PBS (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

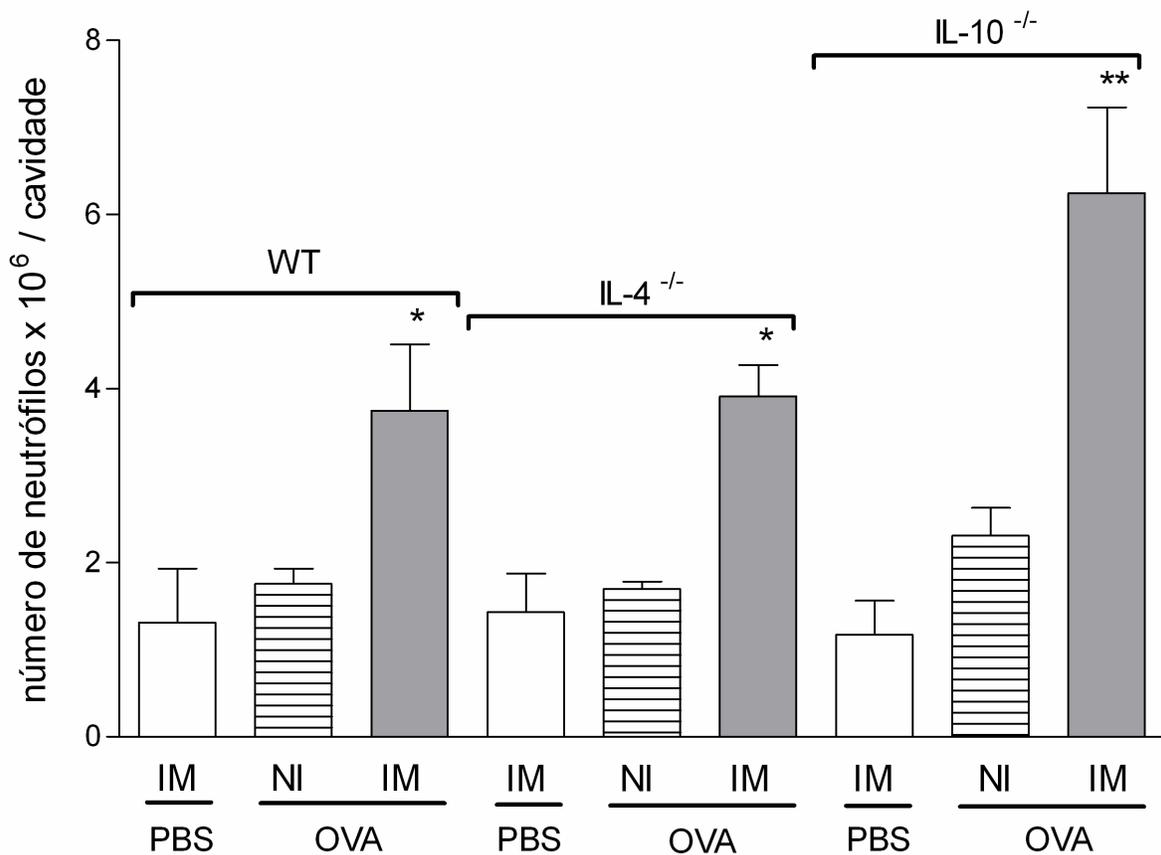


Figura 6. A migração de neutrófilos induzida por OVA é potencializada pela ausência de IL-10. As barras representam o número de neutrófilos coletados das cavidades peritoneais de camundongos selvagens (WT), IL-4^{-/-} ou IL-10^{-/-} não-imunizados e injetados com OVA (10 µg/cavidade) ou após o desafio com PBS ou OVA (10 µg/cavidade) em animais imunizados. A migração de neutrófilos foi determinada após 4h do desafio. Os resultados estão apresentados como média±EPM (n=5). **P*<0,01 quando comparado ao grupo controle. ***P*<0,05 quando comparado aos camundongos selvagens imunizados e desafiados com OVA. (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

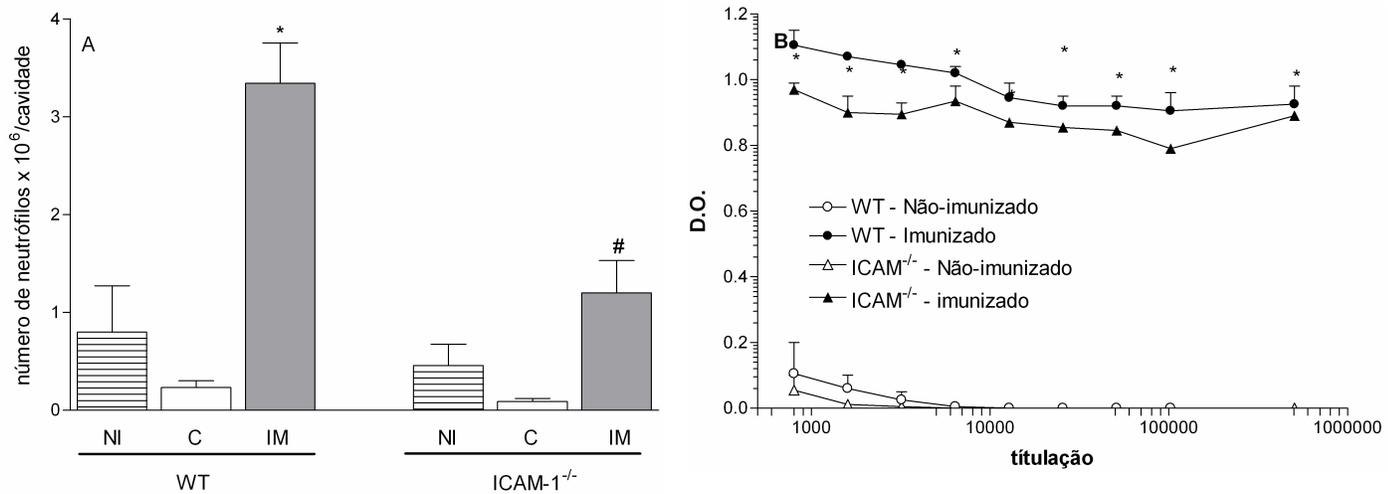


Figura 7 OVA não induz migração de neutrófilos em camundongos deficientes da molécula de adesão ICAM-1 imunizados. As barras representam o número de neutrófilos coletados 4h após desafio com PBS (barra vazia) ou OVA (10 µg/cavidade) em animais WT (C57Bl/6) ou ICAM-1^{-/-} imunizados (barra cheia) ou não-imunizados (NI). Os resultados estão apresentados como média±EPM (n=5). **P*<0,05 quando comparado ao grupo controle. # *P*<0,05 quando comparado com os animais WT (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni). (B) Titulação de IgG α-OVA do soro de camundongos WT ou ICAM-1^{-/-} não-imunizados ou imunizados com OVA. Os resultados estão representados como média±EPM (duplicata). **P*<0,05 quando comparado ao grupo não-imunizado (student’s t-test).

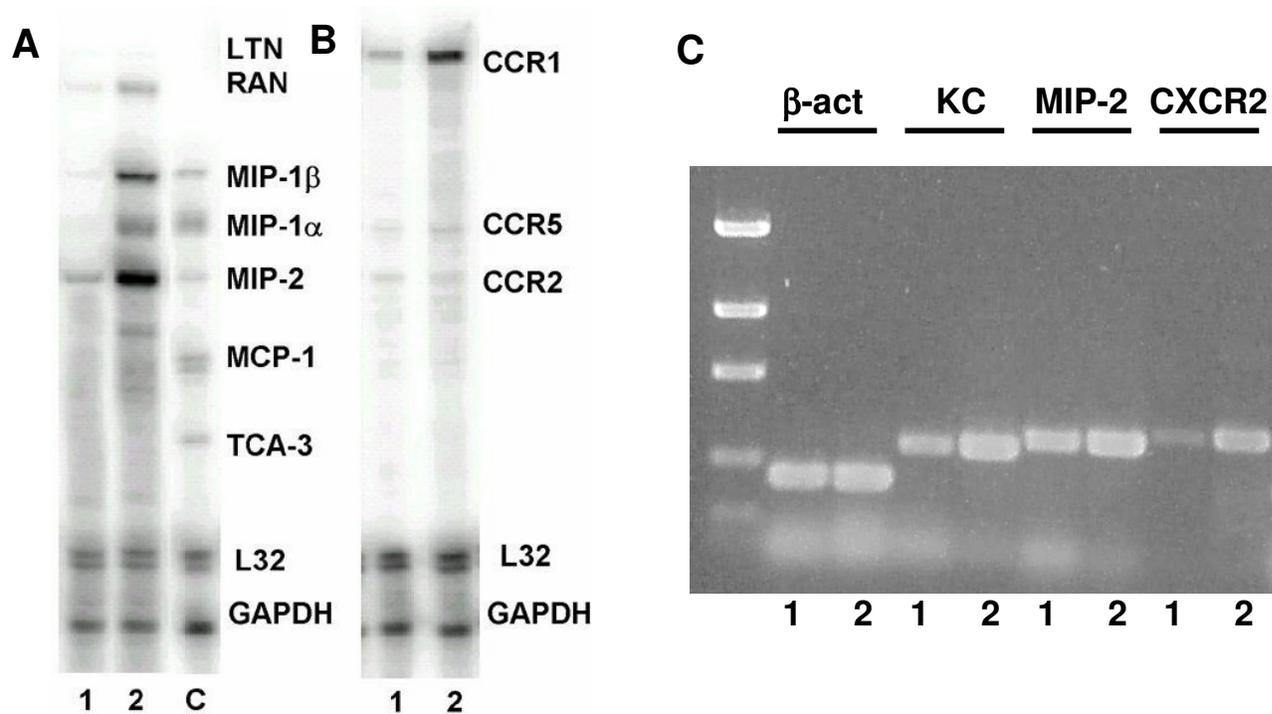


Figura 8. Expressão de RNAm para quimiocinas e receptores de quimiocinas. Camundongos imunizados foram desafiados i.p. com PBS (1) ou OVA (10 µg/cavidade; 2) e 1h após, o lavado peritoneal foi coletado, as células foram centrifugadas, e o RNA total foi extraído e 10 µg foi utilizado para ensaio de RPA para as quimiocinas TCA-3, MCP-1, MIP-2, MIP-1α, MIP-1β. RANTES e Linfotaxina (LTN; A), para os receptores CCR1, CCR2 e CCR5 (B) e para o ensaio de RT-PCR para as quimiocinas KC e MIP-2 e para o receptor CXCR2 (C).

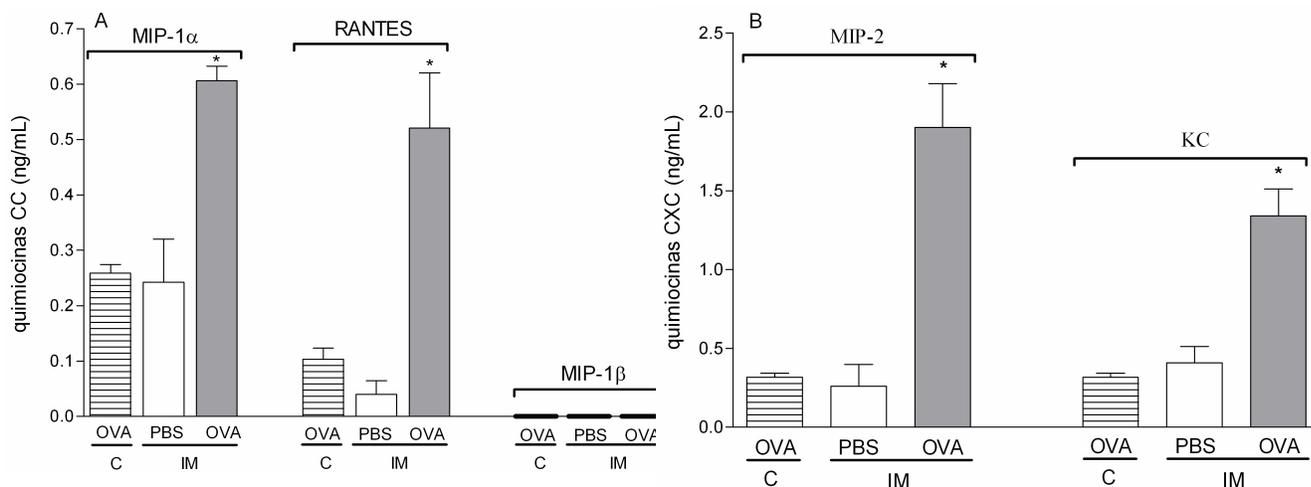


Figura 9. Concentração de MIP-1 α , RANTES, MIP-1 β , MIP-2 e KC no lavado peritoneal de camundongos imunizados e desafiados com OVA. As barras indicam as concentrações das quimiocinas CC MIP-1 α , RANTES e MIP-1 β (A) e das quimiocinas CXC MIP-2 e KC (B) no lavado peritoneal coletado 1.5 h após o desafio com OVA (10 μ g/cavidade) em animais não-imunizados (C) ou imunizados (OVA; barra cheia). As concentrações das quimiocinas também foi determinada em animais imunizados e injetados i.p. com PBS (PBS; barras vazias). Os resultados estão apresentados como média \pm EPM (n=triplicata). * P <0,05 quando comparado ao grupo controle (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

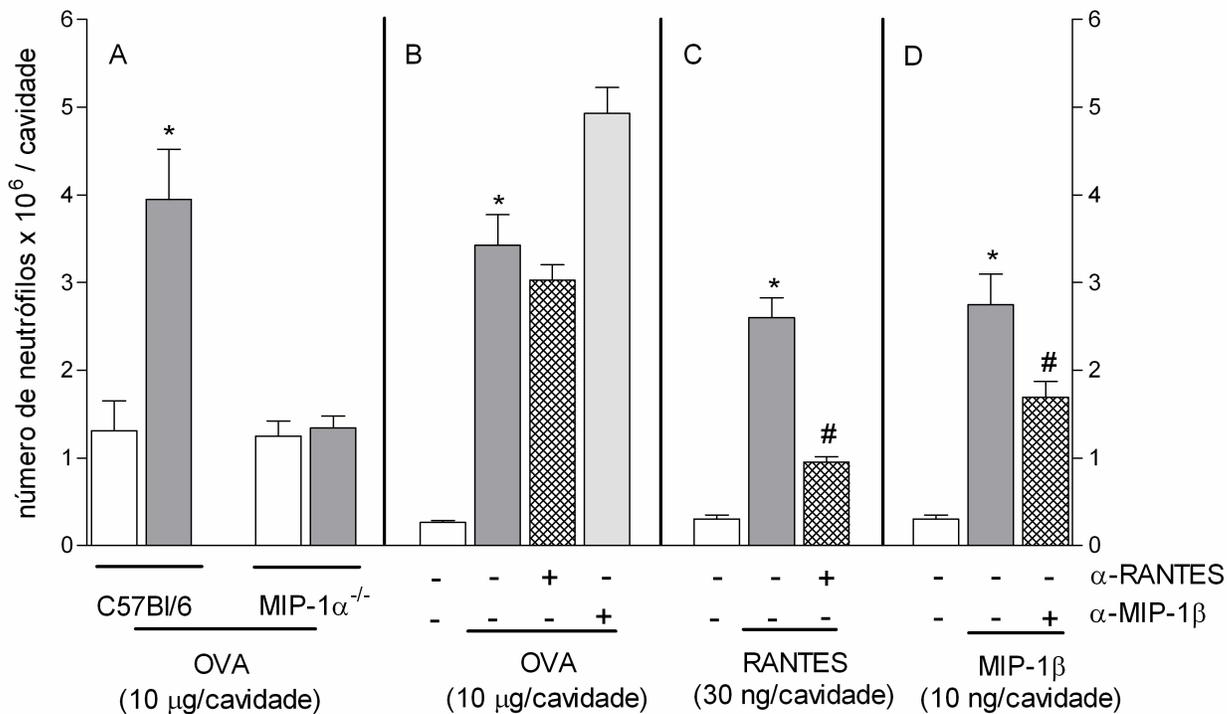


Figura 10. OVA não induz migração de neutrófilos em animais deficientes de MIP-1 α imunizados. (A) Animais WT ou deficientes de MIP-1 α (MIP-1 α ^{-/-}) controles (barras vazias) ou imunizados (barras hachuradas) foram desafiados com OVA (10 μ g/cavidade) e a migração de neutrófilos foi determinada após 4h. (B) Camundongos BALB/c imunizados foram tratados com soro controle (barra hachurada), com o soro α -RANTES (35 μ L/cavidade) ou com o anticorpo monoclonal α -MIP-1 β (15 μ g/cavidade) e 15 min após foram desafiados com OVA (10 μ g/cavidade). (C e D) Camundongos BALB/c foram tratados com soro controle (barra hachurada), com o soro α -RANTES (35 μ L/cavidade) ou com o anticorpo monoclonal α -MIP-1 β (15 μ g/cavidade) e 15 min após foram injetados i.p. com RANTES (30 ng/cavidade) ou MIP-1 β (10 ng/cavidade), respectivamente. A migração de neutrófilos foi avaliada 4h após o desafio. Os resultados estão apresentados como média \pm EPM (n=5). * P <0,05 quando comparado ao grupo controle. # P <0.05 quando comparado aos animais injetados com as quimiocinas (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

Tabela VI: Concentração de IL-2 no sobrenadante de esplenócitos oriundos de camundongos WT (C57B16) ou deficientes da quimiocina MIP-1 α (MIP-1 α ^{-/-}).

Esplenócitos	OVA (10 μ g/mL)	IL-2 (pg/mL; 24 h)
WT controle	-	ND
WT controle	+	ND
WT imunizado	-	ND
WT imunizado	+	52.37 \pm 9.52*
MIP-1 α ^{-/-} controle	-	ND
MIP-1 α ^{-/-} controle	+	ND
MIP-1 α ^{-/-} imunizado	-	ND
MIP-1 α ^{-/-} imunizado	+	56.07 \pm 11.37*

Esplenócitos (5×10^5 células/poço) foram incubados conforme descrito em Material & Métodos. Os resultados estão expressos como média \pm EPM (n=triplicata); ND=não detectado. *P<0,05 quando comparado ao grupo controle (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

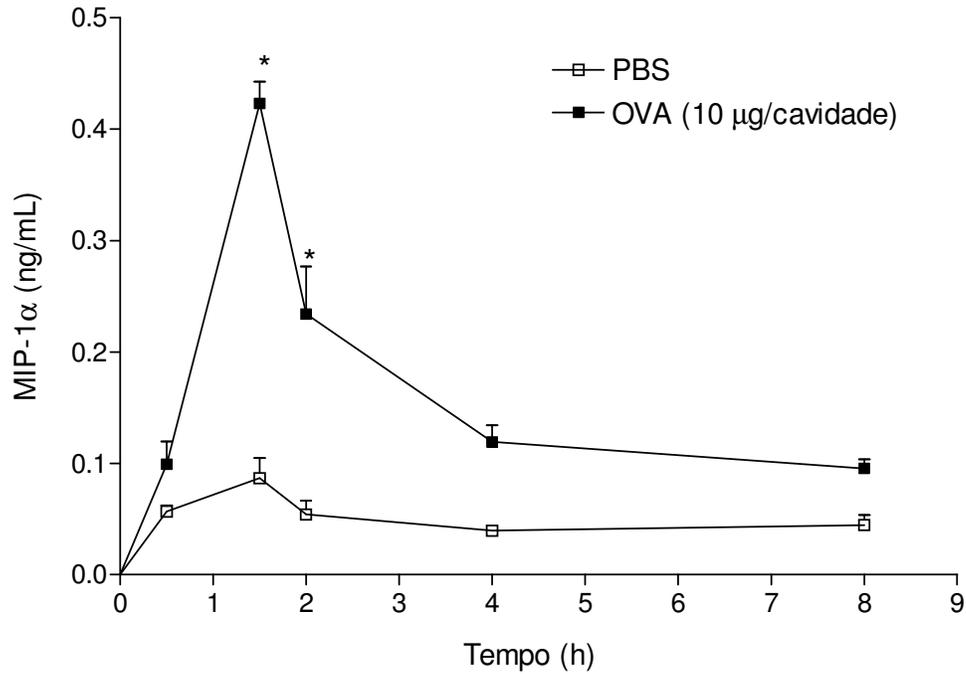


Figura 11. Produção de MIP-1 α , no lavado peritoneal de camundongos imunizados e desafiados com OVA. A figura representa a concentração de MIP-1 α no lavado peritoneal coletado 30 min, 1,5 h, 2h, 4h ou 8h após o desafio com PBS (quadrados abertos) ou OVA (10 μ g/cavidade; quadrados fechados) em camundongos imunizados. Os resultados estão expressos como média \pm EPM (n=triplícata). * P <0.05 quando comparado ao grupo controle (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

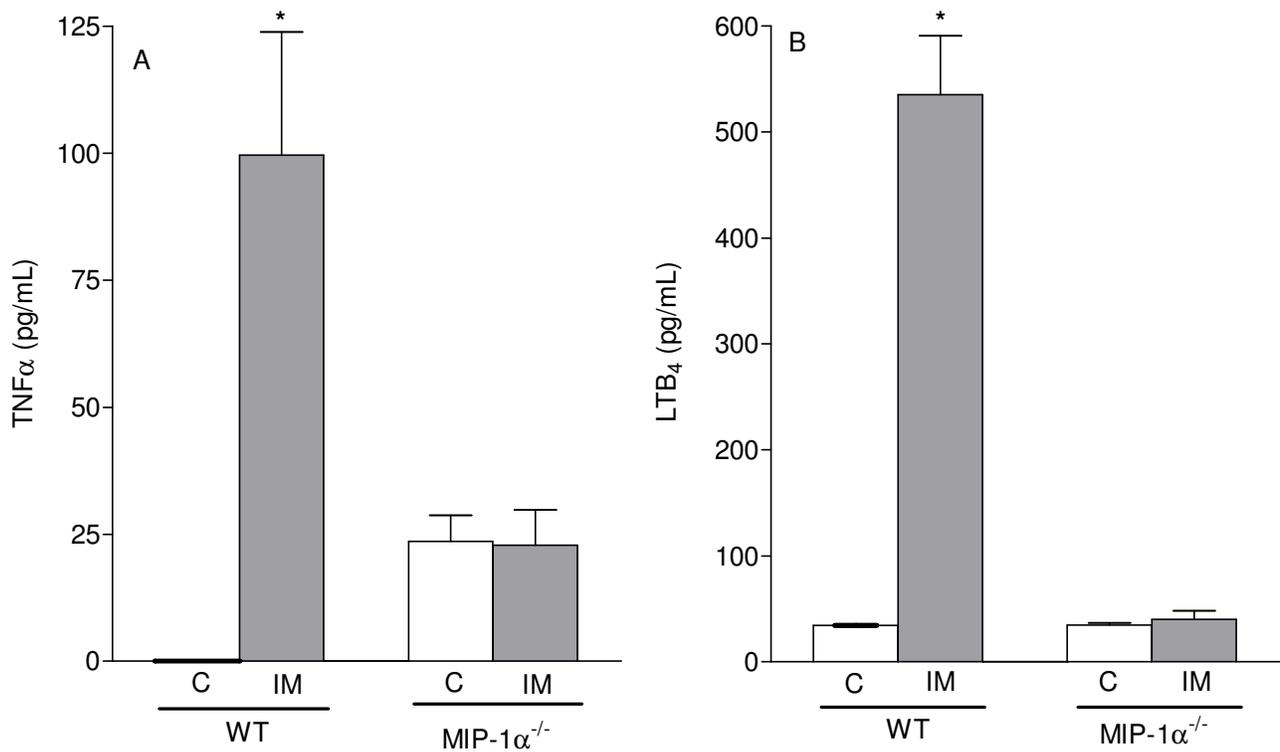


Figura 12. MIP-1α é essencial para a liberação de TNFα e LTB₄ em camundongos imunizados. As barras representam a concentração de TNFα (A) ou LTB₄ (B) no lavado peritoneal coletado 2h após administração de PBS (controle, barra vazia) ou OVA (10 μg/cavidade; barra cheia) em camundongos WT (C57Bl/6) ou deficientes de MIP-1α (MIP-1α^{-/-}) imunizados. As amostras foram analisadas pelo método de ELISA (triplicata). **P*<0,05 quando comparado ao grupo controle (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

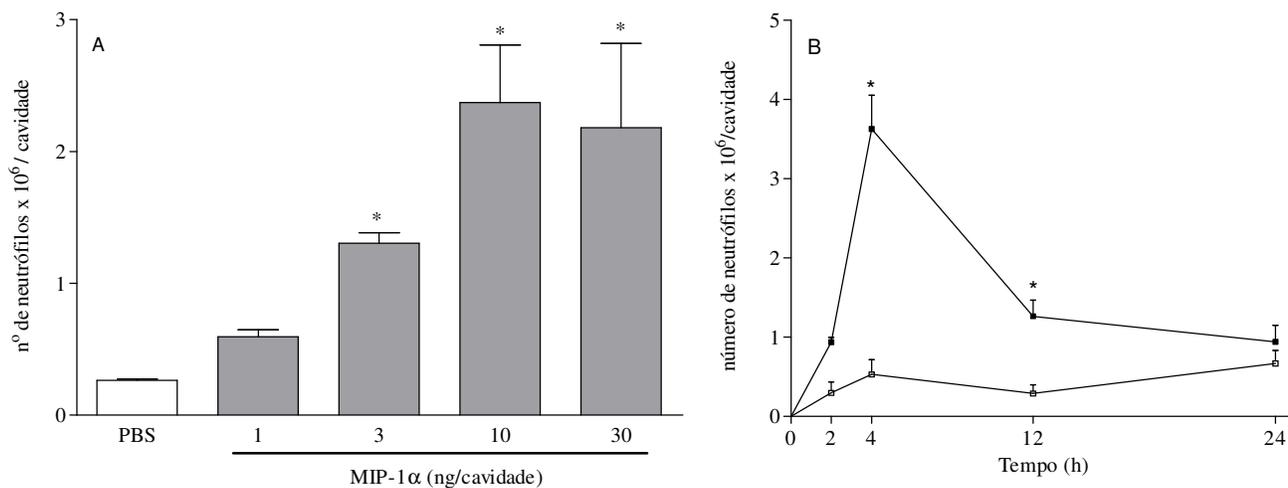


Figura 13. MIP-1 α induz migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de maneira dose e tempo dependente. As barras representam o número de neutrófilos coletados das cavidades peritoneais de camundongos BALB/c injetados i.p. 4h antes com PBS (barra vazia) ou MIP-1 α (barra cheia). A dose utilizada para cada grupo experimental está indicada em cada barra (1, 3, 10 ou 30 ng/cavidade). (B) As barras indicam o número de neutrófilos coletados das cavidades peritoneais de camundongos imunizados após 2; 4; 12h ou 24 h da administração i.p. de PBS ou MIP-1 α (10 ng/cavidade). Os resultados estão expressos com média \pm EPM (n=5). * P <0.05 quando comparado ao grupo controle (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

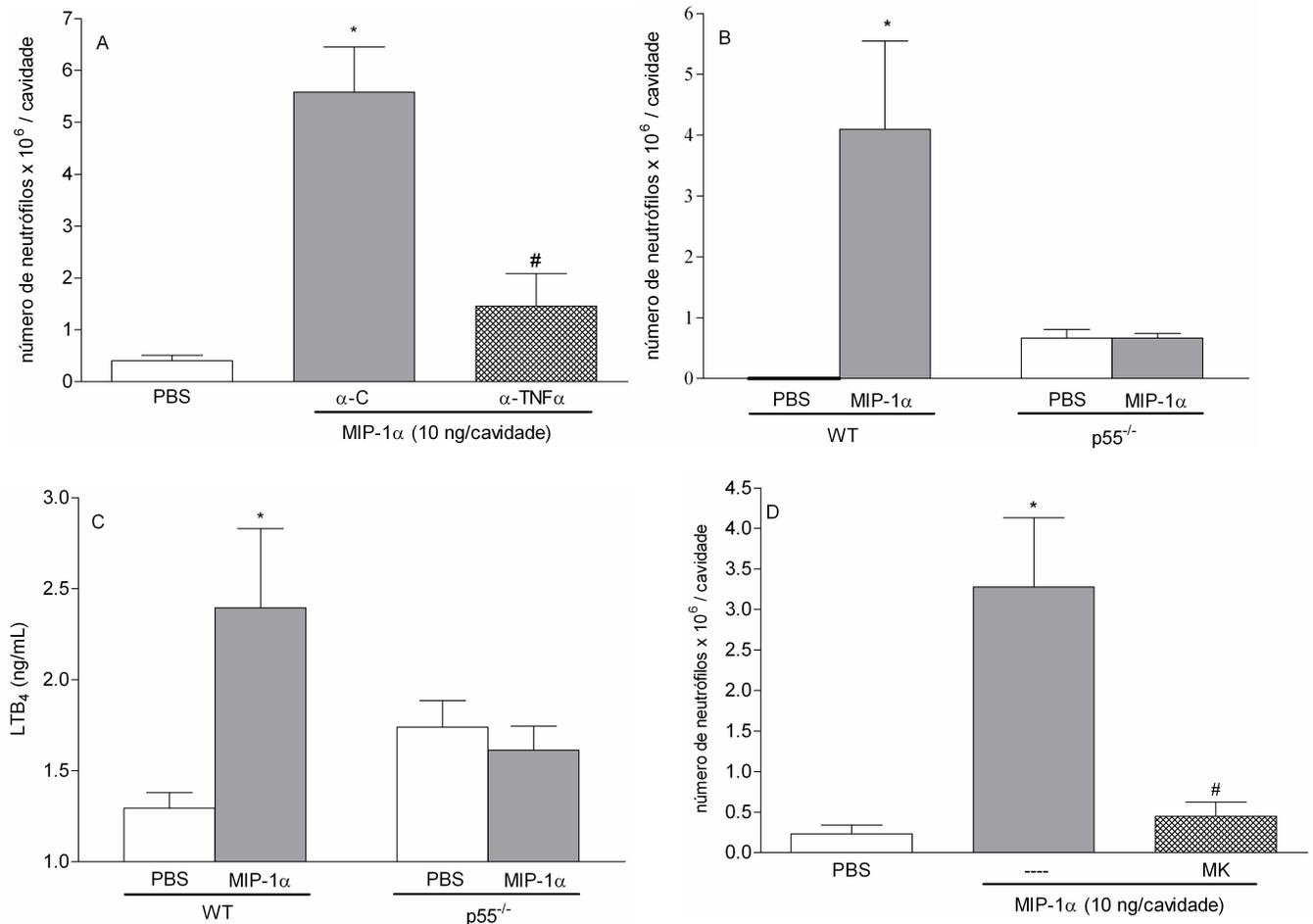


Figura 14. A migração de neutrófilos induzida pela MIP-1α é dependente da liberação de TNFα e LTB₄. (A) As barras indicam o número de neutrófilos coletados das cavidades peritoneais 4h após injeção i.p. com PBS (barra vazia) ou MIP-1α (10 ng/cavidade) em animais tratados 15 min antes com soro controle (α-C; barra hachurada) ou com o anticorpo α-TNFα (barra cheia). (B) As barras indicam o número de neutrófilos coletados das cavidades peritoneais de camundongos C57Bl/6 ou p55^{-/-} 4h após injeção i.p. com PBS (barra vazia) ou MIP-1α (barra hachurada). (C) As barras indicam a concentração de LTB₄ no lavado peritoneal coletado 4h após a administração de PBS (barra vazia) ou MIP-1α (barra hachurada) em camundongos WT ou p55^{-/-}. (D) As barras indicam o número de neutrófilos coletados das cavidades peritoneais de camundongos BALB/c após 4h da injeção i.p. com MIP-1α (10 ng/cavidade) em animais tratados 1 h antes com metilcelulose 10% (1mL v.o.; barra hachurada) ou MK886 (MK; 1 mg/Kg; v.o.; barra cheia). Os resultados estão apresentados como média±EPM (n=5). *P<0,01 quando comparado ao grupo controle. #P<0,01 quando comparado ao grupo injetado com MIP-1α. (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

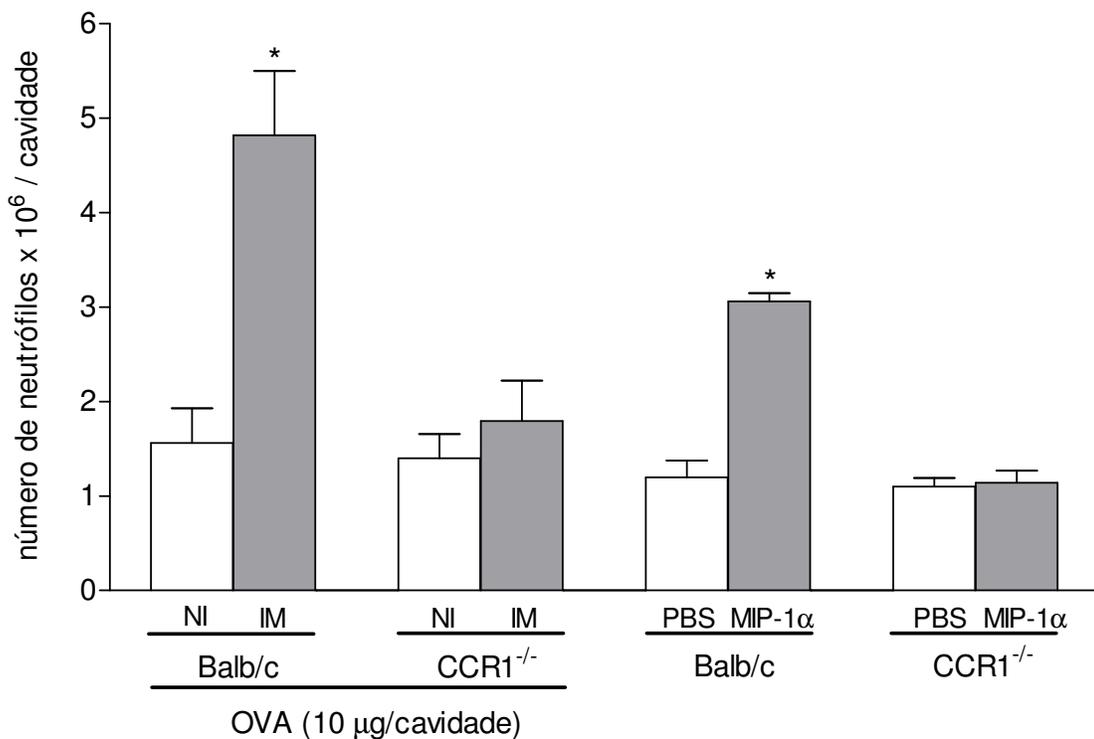


Figura 15. A migração de neutrófilos induzida por OVA ou MIP-1α é dependente do receptor CCR1. As barras representam o número de neutrófilos coletados 4h após desafio com PBS (C; barra vazia) ou OVA (10 μg/cavidade) em camundongos BALB/c ou CCR1^{-/-} imunizados. A figura também mostra o efeito da administração de PBS (barra vazia) ou MIP-1α (10 ng/cavidade) em camundongos selvagens ou CCR1^{-/-}. Os resultados estão apresentados como média±EPM (n=5). *P<0,05 quando comparado ao grupo controle (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

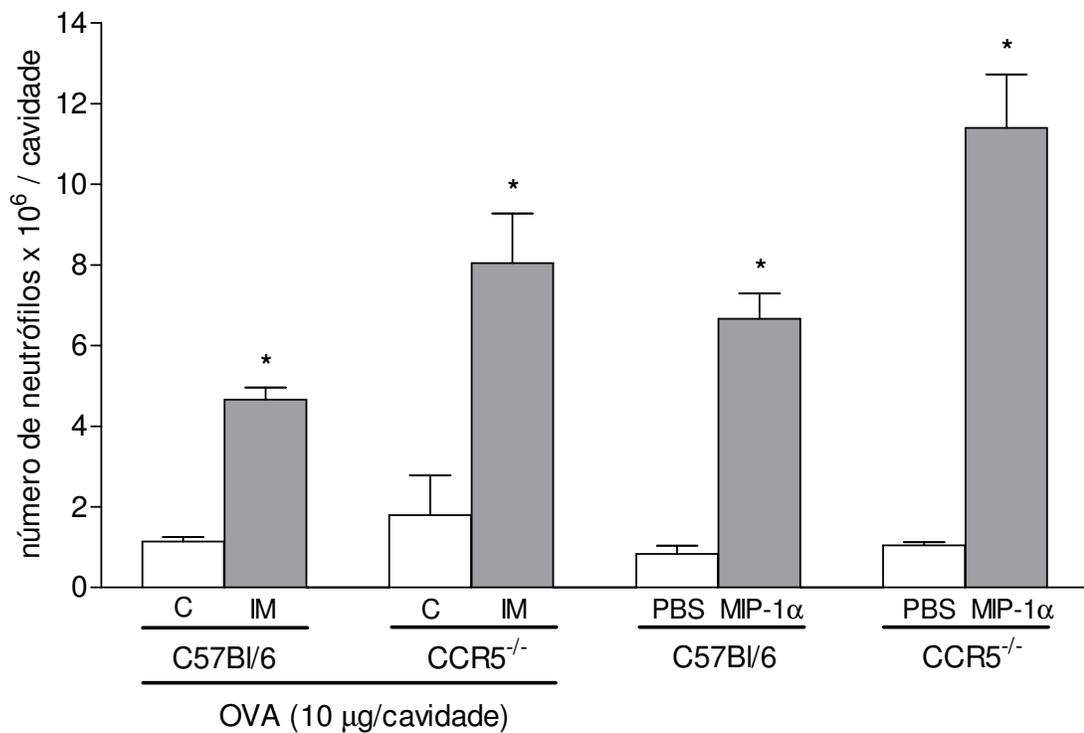


Figura 16. Migração de neutrófilos induzida por OVA ou MIP-1 α em camundongos CCR5^{-/-}. As barras representam o número de neutrófilos coletados 4h após desafio com PBS (C; barra vazia) ou OVA (10 μ g/cavidade) em camundongos BALB/c ou CCR5^{-/-} imunizados. A figura também mostra o efeito da administração de PBS (barra vazia) ou MIP-1 α (10 ng/cavidade) em camundongos selvagens ou CCR5^{-/-}. Os resultados estão apresentados como média \pm EPM (n=5). * P <0,05 quando comparado ao grupo controle (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

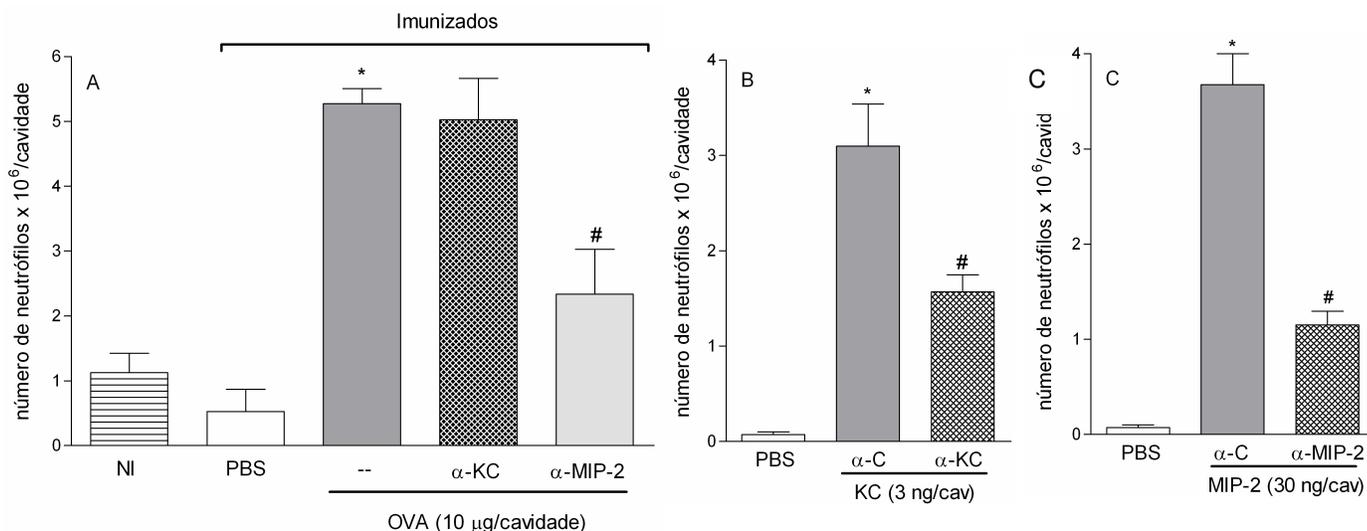


Figure 17. A migração de neutrófilos induzida por OVA em animais imunizados é dependente de MIP-2, mas não KC. (A) camundongos BALB/c imunizados foram injetados i.p. com anticorpo inespecífico (-; 3 µg/cavidade), com anticorpo monoclonal anti-KC (α-KC; 3 µg/cavidade) ou anti-MIP-2 (3 µg/cavidade) e após 15 min foram desafiados com OVA (10 µg/cavidade). A migração de neutrófilos também foi avaliada em camundongos imunizados e injetados i.p. com PBS e em camundongos não-imunizados e desafiados i.p. com OVA (C; 10 µg/cavidade). (B and C) camundongos BALB/c foram pré-tratados com anticorpo inespecífico (-; 3 µg/cavidade), com anticorpo monoclonal anti-KC (α-KC; 3 µg/cavidade) ou anti-MIP-2 (3 µg/cavidade) e após 15 min, os animais foram injetados i.p. com as respectivas quimiocinas (KC: 3 ng/cavidade; MIP-2: 30 ng/cavidade). A migração de neutrófilos foi avaliada após 4h da administração dos estímulos. Os resultados estão expressos como média±EPM (n=5). **P*<0.05 quando comparado ao grupo controle. #*P*<0.05 quando comparado com os animais desafiados com OVA ou com as quimiocinas (n=5). (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

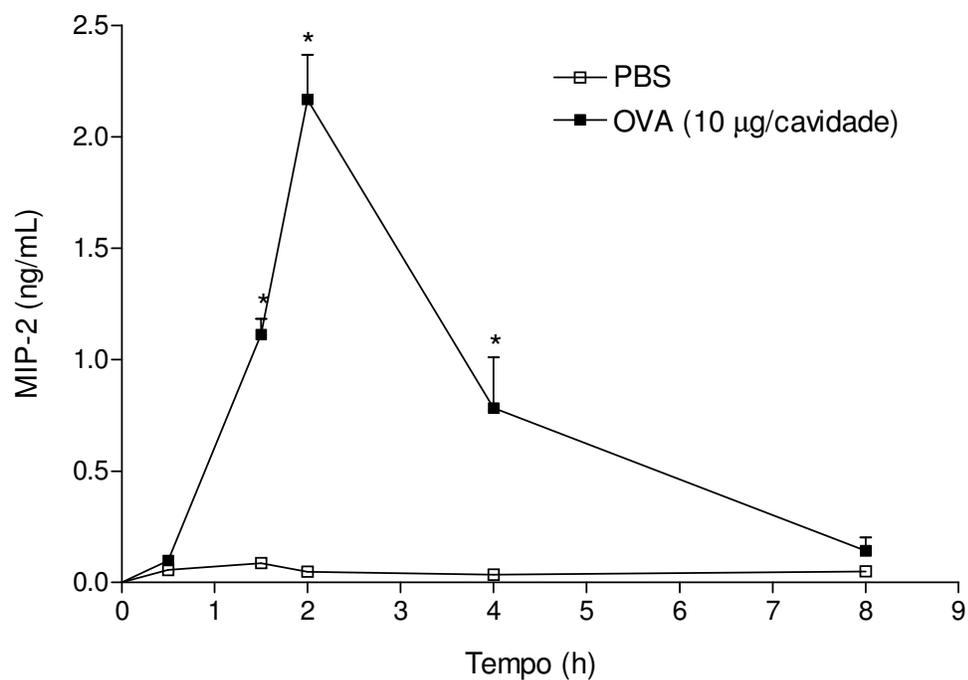


Figura 18. Produção de MIP-2 no lavado peritoneal de camundongos imunizados e desafiados com OVA. A figura representa a concentração de MIP-2 no lavado peritoneal coletado 30 min, 1,5 h, 2h, 4h ou 8h após o desafio com PBS (quadrados abertos) ou OVA (10 µg/cavidade; quadrados fechados) em camundongos imunizados. Os resultados estão expressos como média±EPM (n=triplícata). * $P < 0.05$ quando comparado ao grupo controle (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

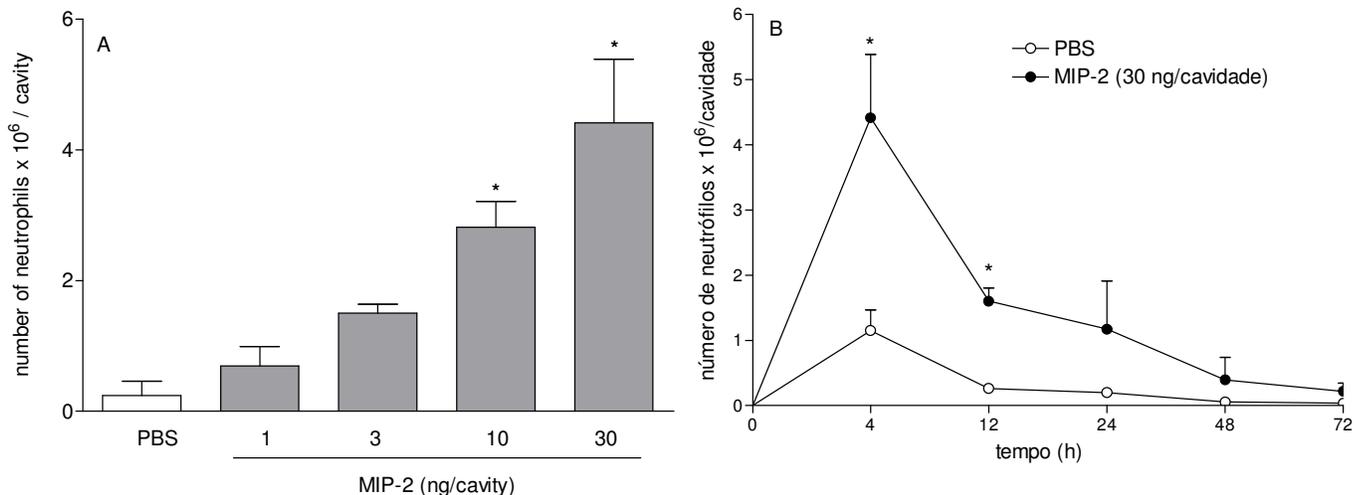


Figure 19. MIP-2 induz migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de maneira dose e tempo dependente. As barras representam o número de neutrófilos coletados das cavidades peritoneais de camundongos BALB/c estimuladas 4h antes com PBS (barra vazia) ou MIP-2 (barras cheias). A dose utilizada para cada grupo experimental está indicada abaixo de cada barra (1, 3, 10 ou 30 ng/cavidade). (B) As barras indicam o número de neutrófilos coletados das cavidades peritoneais de camundongos imunizados após 4; 12h; 24 ou 48 h da administração i.p. de PBS ou MIP-2 (30 ng/cavidade). Os resultados estão expressos com média±EPM (n=5). * $P < 0.05$ quando comparado ao grupo controle (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

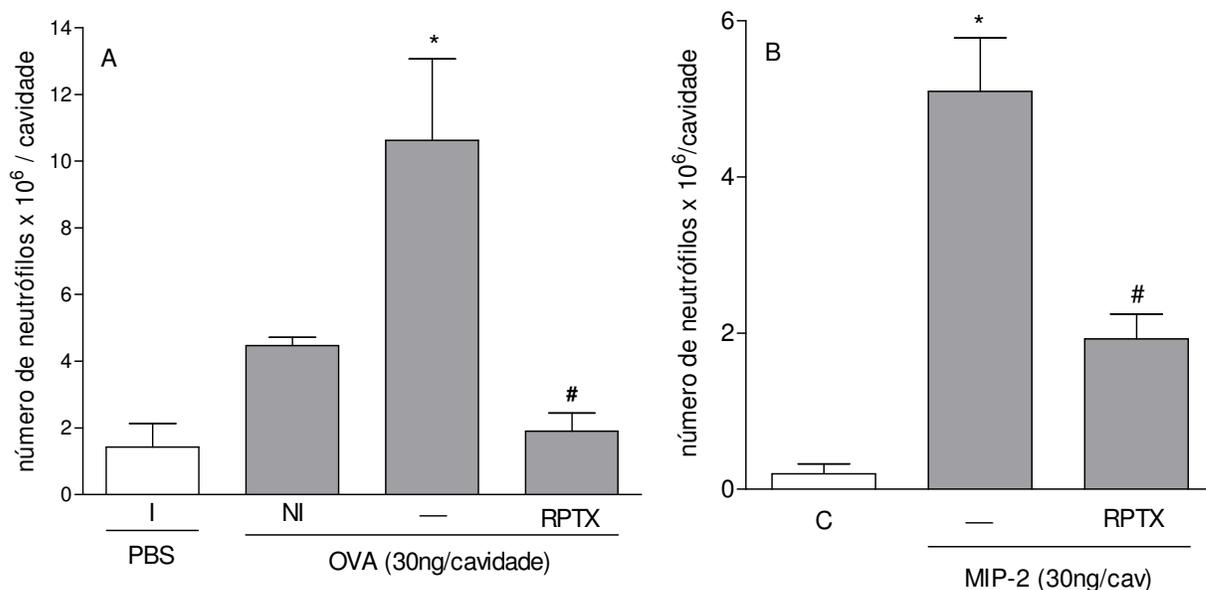


Figure 20. Repertaxina inibe a migração de neutrófilos induzida por OVA em animais imunizados. Camundongos BALB/c imunizados foram pré-tratados com Repertaxina (RPTX, 25 mg/kg, s.c.) e após 30 min desafiados com PBS ou OVA (10 µg/cavidade) e a migração de neutrófilos foi avaliada após 4h da administração dos estímulos. A migração de neutrófilos também foi avaliada em camundongos imunizados e injetados i.p. com PBS e em camundongos não-imunizados e desafiados i.p. com OVA (C; 10 µg/cavidade). Os resultados estão expressos como média ±EPM (n=5). * $P < 0.05$ quando comparado ao grupo controle. # $P < 0.05$ quando comparado aos animais imunizados e desafiados com OVA (n=5). (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

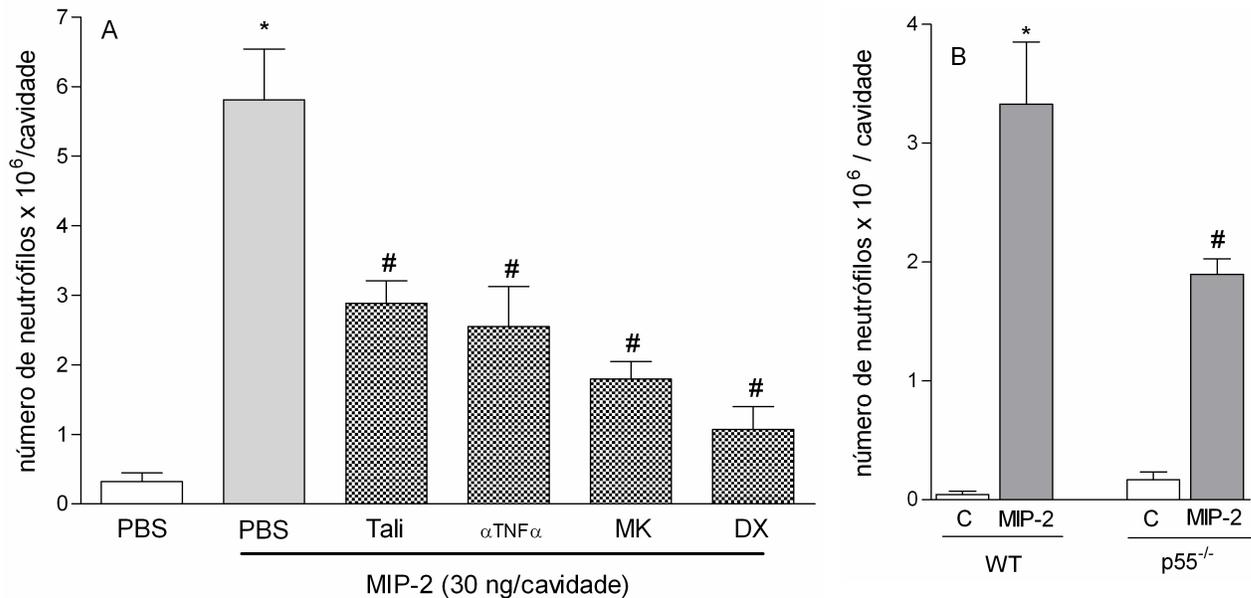


Figure 21. A migração de neutrófilos induzida pela MIP-2 é dependente da produção de PAF, TNF α e LTB $_4$, e dos receptores CXCR2 e TNFR1 (p55). (A) Camundongos BALB/c foram pré-tratados com as drogas talidomida (Tali; 50 mg/Kg; s.c.; 1h), MK886 (MK; 1.0 mg/Kg; v.o.; 1h) ou dexametasona (DX; 0.5 mg/Kg; s.c.; 1h) ou com soro anti-TNF α (i.p.; 30 μ L/cavidade; 15 min) e injetados i.p. com PBS (C) ou MIP-2 (30 ng/cavity). Os animais controle foram pré-tratados com veículo (v.o.; 1h) ou com soro pré-imune (i.p.; 30 μ L/cavidade; 15 min) e injetados com MIP-2. (B) Camundongos selvagens (WT; C57bl/6) ou deficientes para o receptor p55 (p55^{-/-}) foram injetados i.p. com PBS (C) ou MIP-2 (30 ng/cavidade). A migração de neutrófilos foi avaliada 4 h após administração da quimiocina. Os resultados estão expressos como média \pm EPM (n=5). * P <0.05 quando comparado ao grupo controle. # P <0.05 quando comparado aos animais injetados com MIP-2 (n=5). (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

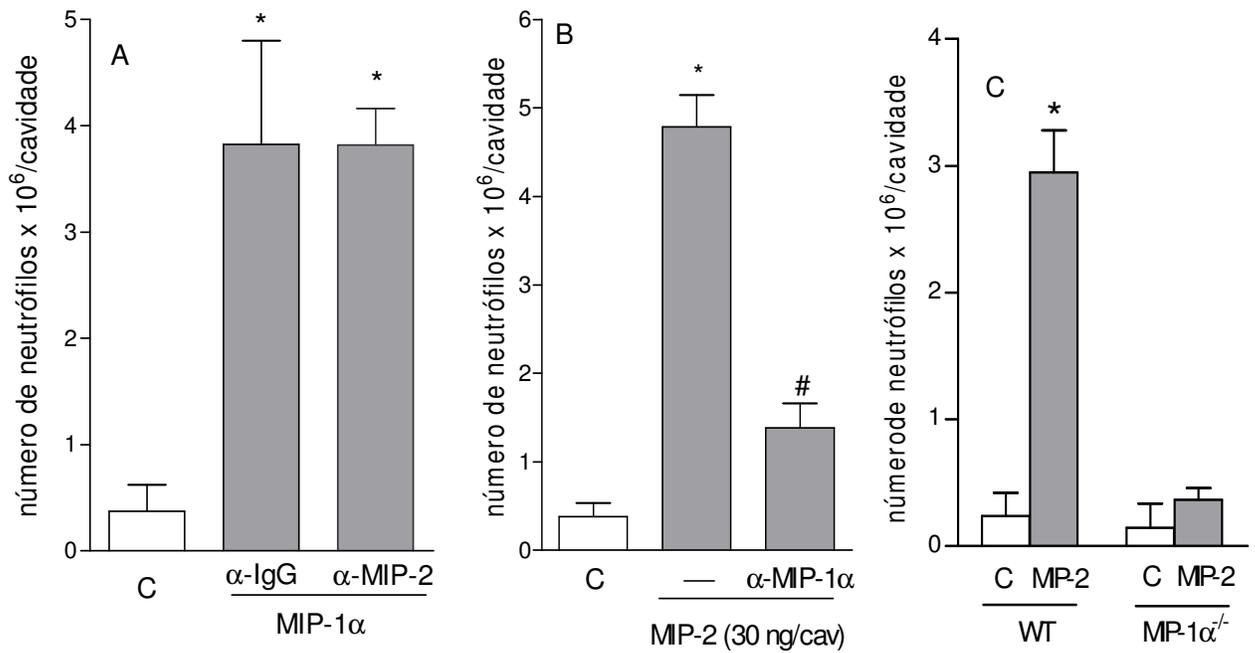


Figure 22. MIP-2 induz migração de neutrófilos dependentemente da produção de MIP-1α. (A) Camundongos Balb/c foram pré-tratados i.p. com anticorpo inespecífico (—) or com anticorpo anti-MIP-2 (α -MIP-2; 3 μ g/cavidade) e após 15 min injetados i.p. com PBS ou MIP-1 α (10 ng/cavidade). (B) Camundongos Balb/c foram pré-tratados i.p. com anticorpo inespecífico (—) ou com anticorpo anti-MIP-1 α (α -MIP-1 α ; 3 μ g/cavidade) e após 15 min injetados i.p. com PBS ou MIP-2 (30 ng/cavidade). (C) Camundongos selvagens (WT; C57Bl/6) ou deficientes para MIP-1 α (MIP-1 α ^{-/-}) foram injetados i.p. com PBS (controle, C) ou MIP-2 (30 ng/cavidade). A migração de neutrófilos foi avaliada 4 h após administração das quimiocinas. Os resultados estão expressos como média \pm EPM (n=5). * P <0.05 quando comparado ao grupo controle. # P <0.05 quando comparado aos animais injetados com MIP-2 (n=5). (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

Table VII. Migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos induzida por PBS ou MIP-2.

Estímulo	Tratamento	Neutrófilos x 10 ⁶ /cavidade
PBS	-	0,32±0,13
MIP-2	-	5,81±0,73*
	Pirilamina	5,15±0,98
	Cimetidina	5,05±0,99
	Indometacina	4,78±0,85
	IL-1ra	4,10±0,48

Camundongos BALB/c foram injetados i.p. com PBS (controle) ou pré-tratados com veículo ou com as drogas pirilamina (Pir; 30 mg/Kg; sc; 30 min), cimetidina (Cim; 30 mg/Kg; 30 min), indometacina (Indo; 5.0 mg/Kg; s.c.; 1h) ou IL-1ra (10 mg/kg, s.c.; i.v.; 15 min) e injetados i.p. com MIP-2 (30 ng/cavidade). A migração de neutrófilos foi determinada 4h após a administração da quimiocina. Os resultados estão expressos como média±EPM (triplicata); ND = não detectado. *P<0.05 quando comparado ao grupo controle. (“One-way ANOVA” corrigido pelo teste de Bonferroni).

Table VIII. Concentração de MIP-1 α , TNF α e LTB₄ no lavado peritoneal de camundongos injetados i.p. com MIP-2.

		MIP-1 α	TNF α	LTB ₄
MIP-2 ^a	Control	14.05±1.6	50.1±13.5	18.2±3.3
	IgG	45.7±10.4*	439.4±77.1*	231.7±73.4*
	α MIP- α	ND	47.1±10.5 [#]	41.0±3.5 [#]

^a O lavado foi coletado 1.5 h após injeção i.p. com PBS ou MIP-2 (30 ng/cavidade) em camundongos tratados 15 min antes com anticorpo controle (IgG) ou anti-MIP-1 α (α -MIP-1 α). A concentração de MIP-1 α , TNF α e LTB₄ foi determinada por ELISA (pg/mL). Os resultados estão expressos como média±EPM (triplicata); ND = não detectado. *P<0.05 quando comparado ao grupo controle. [#]P<0.05 quando comparado ao grupo tratado com IgG. (“One-way ANOVA” corrigido pelo teste de Bonferroni).

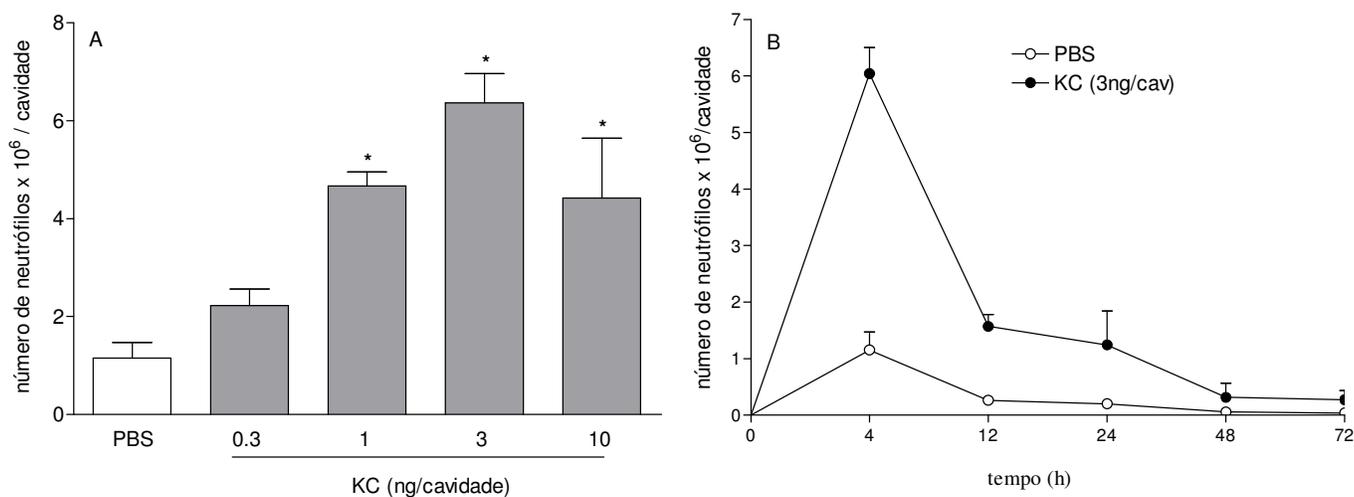


Figure 23. KC induz migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de maneira dose e tempo dependente. As barras representam o número de neutrófilos coletados das cavidades peritoneais de camundongos BALB/c estimulados i.p. 4 h antes com PBS (barra vazia) ou KC (barras cheias). A dose utilizada para cada grupo experimental está indicada em cada barra (0,3; 1, 3 ou 10 ng/cavidade). (B) As barras indicam o número de neutrófilos coletados das cavidades peritoneais de camundongos imunizados após 4; 12; 24; 48 ou 72 h da administração i.p. de PBS ou KC (3 ng/cavidade). Os resultados estão expressos com média±EPM (n=5). * $P < 0.05$ quando comparado ao grupo controle (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

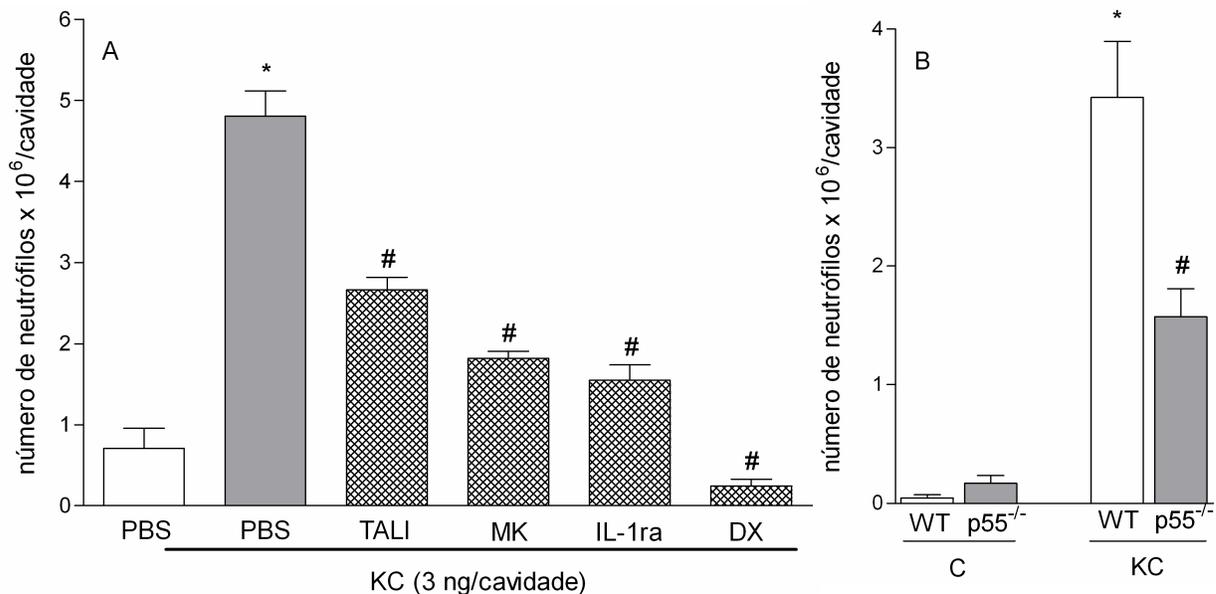


Figure 24. A migração de neutrófilos induzida por KC é inibida pelo pré-tratamento dos animais com dexametasona, MK886 e talidomida. As barras representam o número de neutrófilos coletados das cavidades peritoneais de camundongos BALB/c injetados 4h antes com PBS (barra vazia) ou KC (3 ng/cavidade) em camundongos pré-tratados com PBS (controle), talidomida (Tali; 50 mg/Kg; s.c.; 1h), MK886 (MK; 1.0 mg/Kg; v.o.; 1h), IL-1ra (10 mg/kg, s.c.; i.v.; 15 min) ou dexametasona (DX; 0.5 mg/Kg; s.c.; 1h). (B) Camundongos selvagens (WT; C57bl/6) ou deficientes para o receptor p55 (p55^{-/-}) foram injetados i.p. com PBS (C) ou KC (3 ng/cavidade). A migração de neutrófilos foi avaliada 4 h após administração da quimiocina. Os resultados estão expressos como média±EPM (n=5). **P*<0.05 quando comparado ao grupo controle. #*P*<0.05 quando comparado aos animais tratados com PBS e injetados com KC (n=5). (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

Tabela IX. Migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos induzida por PBS ou KC.

Estímulo	Tratamento	Neutrófilos x 10 ⁶ /cavidade
PBS	-	0,71±0,24
KC	-	4,8±0,31*
	Pirilamina	4,99±0,35
	Cimetidina	4,54±0,29
	Indometacina	4,14±0,88

Camundongos BALB/c foram injetados i.p. com PBS (controle) ou pré-tratados com veículo ou com as drogas pirilamina (Pir; 30 mg/Kg; sc; 30 min), cimetidina (Cim; 30 mg/Kg; 30 min) ou indometacina (Indo; 5.0 mg/Kg; s.c.; 1h) e injetados i.p. com KC (3 ng/cavidade). A migração de neutrófilos foi determinada 4h após a administração da quimiocina. Os resultados estão expressos como média±EPM (triplicata); ND = não detectado. *P<0.05 quando comparado ao grupo controle. (“One-way ANOVA” corrigido pelo teste de Bonferroni).

Table X. Concentração de IL-1 β , TNF α e LTB₄ no lavado peritoneal de camundongos injetados i.p. com KC.

	IL-1 β	TNF α	LTB ₄
PBS	0,73±0,37	0,98±0,51	0,73±0,37
KC	45,7±10,4*	26,0±7,68*	104,72±56,17*

O lavado foi coletado 15 h após injeção i.p. com PBS ou KC (3 ng/cavidade). A concentração de IL-1 β , TNF α e LTB₄ foi determinada por ELISA (pg/mL). Os resultados estão expressos como média±EPM (triplicata); ND = não detectado. *P<0.05 quando comparado ao grupo controle. (“One-way ANOVA” corrigido pelo teste de Bonferroni).

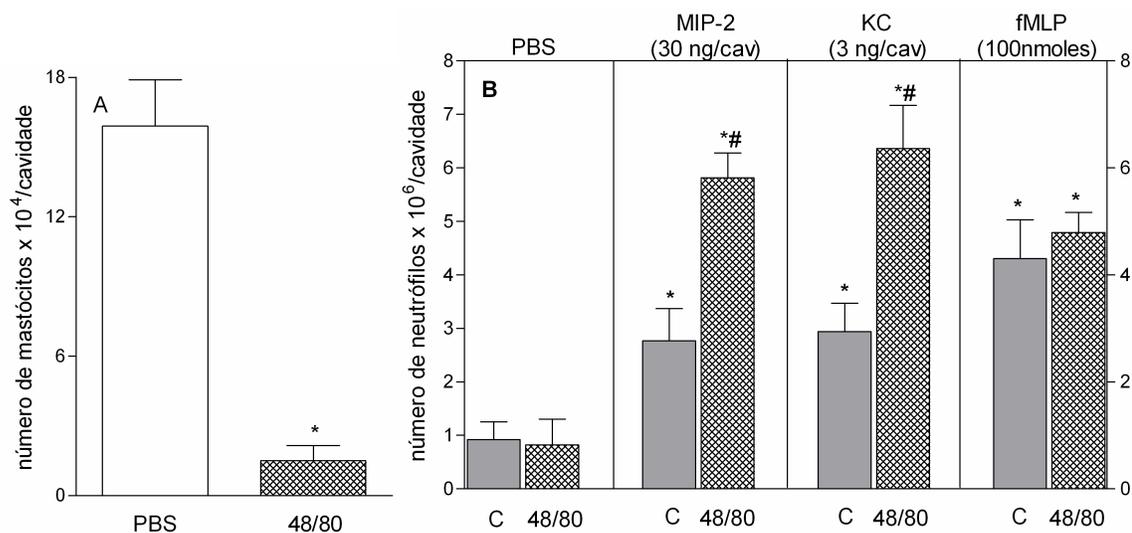


Figura 25. A depleção de mastócitos da cavidade peritoneal potencializa a migração de neutrófilos induzida por MIP-2 ou KC. (A) As barras representam o número de mastócitos coletados de camundongos pré-tratados com (barra vazia) ou com composto 48/80 (48/80). (B) As barras representam a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por PBS (PBS), MIP-2 (30 ng/cavidade), KC (3 ng/cavidade) ou fMLP (100 nmoles/cavidade) em animais controles (C; barras cheias) ou pré-tratados com composto 48/80 (48/80; barras hachuradas). Os resultados estão apresentados como média±EPM (n=5). (A) $^{\#}P < 0,001$ quando comparado com o número de mastócitos encontrados nos animais controle. (B) $^*P < 0,001$ quando comparado com a injeção de PBS nos animais controle. $^{\#}P < 0,05$ quando comparado com a injeção de MIP-2 no grupo controle (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

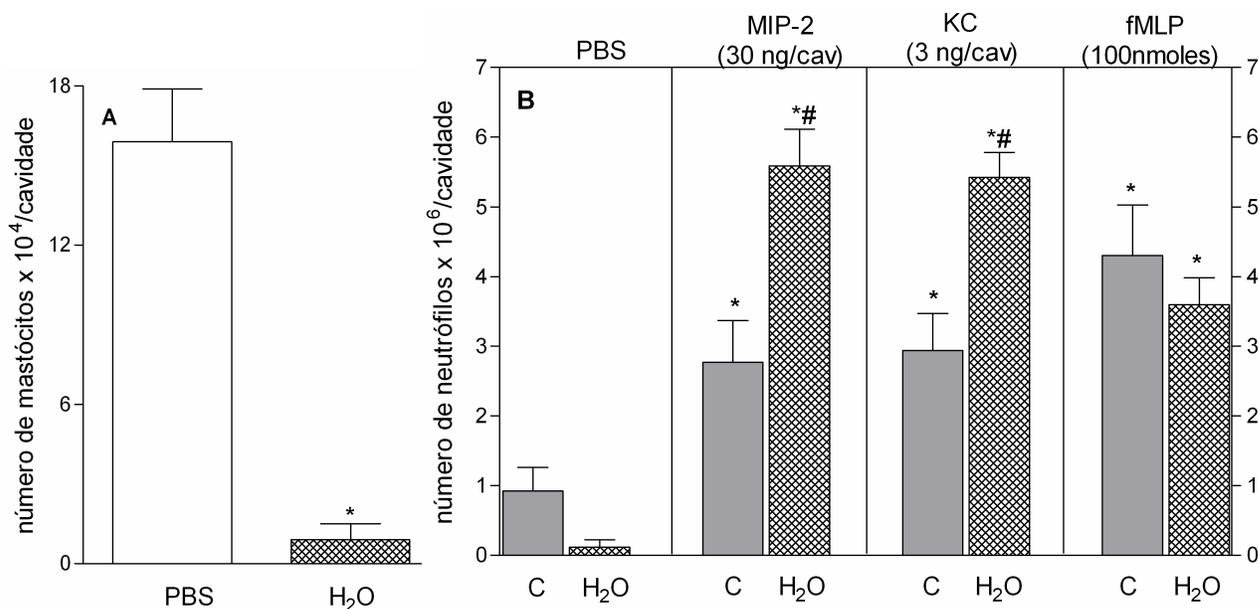


Figura 26. A depleção de mastócitos da cavidade peritoneal potencializa a migração de neutrófilos induzida por MIP-2 ou KC. (A) As barras representam o número de mastócitos coletados de camundongos pré-tratados com (barra vazia) ou com água destilada (H₂O). (B) As barras representam a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por PBS (PBS), MIP-2 (30 ng/cavidade), KC (3 ng/cavidade) ou fMLP (100 nmoles/cavidade) em animais controles (C; barras cheias) ou pré-tratados com água (H₂O; barras hachuradas). Os resultados estão apresentados como média±EPM (n=5). (A) #*P*<0,001 quando comparado com o número de mastócitos encontrados nos animais controle. (B) **P*<0,001 quando comparado com a injeção de PBS nos animais controle. ***P*<0,05 quando comparado com a injeção de MIP-2 no grupo controle (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

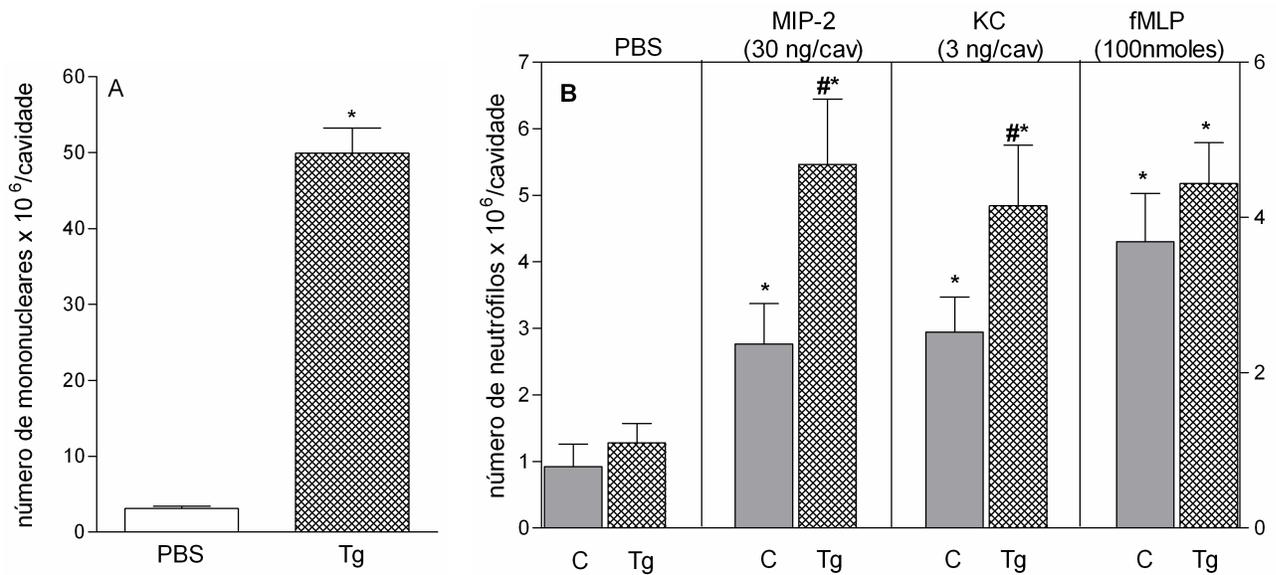


Figura 27. O aumento da população de macrófagos da cavidade peritoneal potencializa a migração de neutrófilos induzida por MIP-2. (A) As barras representam o número de células mononucleares coletadas de camundongos pré-tratados com (barra vazia) ou com tioglicolato 3% (Tg). (B) As barras representam a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por PBS (PBS), MIP-2 (30 ng/cavidade), KC (3 ng/cavidade) ou fMLP (100 nmoles/cavidade) em animais controles (C; barras hachuradas) ou pré-tratados com tioglicolato 3% (Tg; barras cheias). Os resultados estão apresentados como média±EPM (n=5). (A) $^{\#}P<0,001$ quando comparado com o número de células mononucleares encontradas nos animais controle. (B) $*P<0,001$ quando comparado com a injeção de PBS nos animais controle. $^{\#}P<0,05$ quando comparado com a injeção de MIP-2 no grupo controle (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

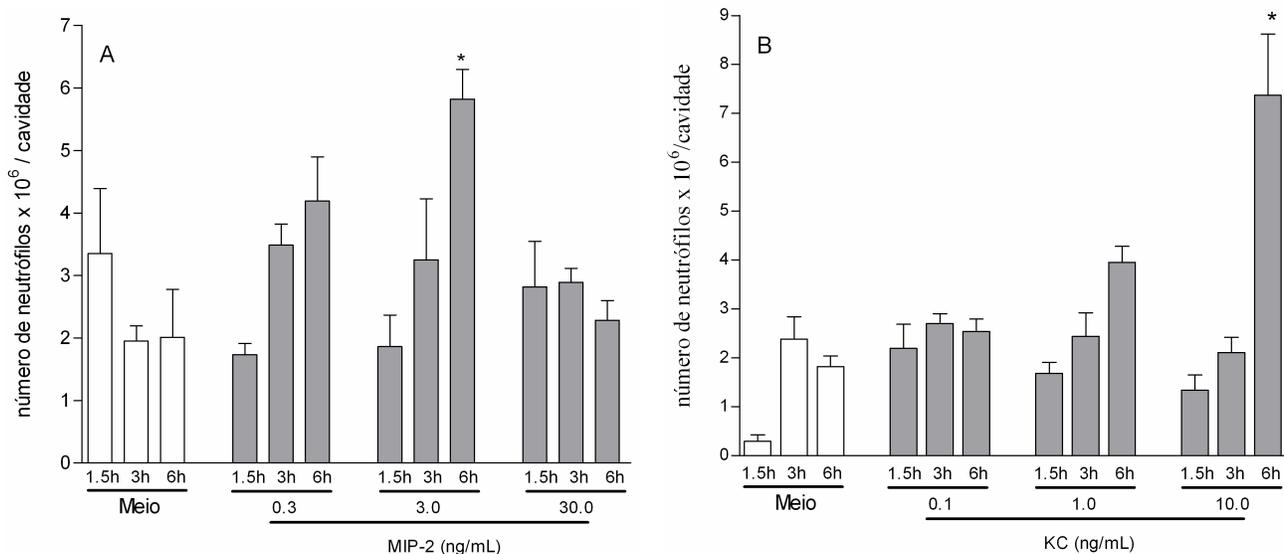


Figura 28. Migração de neutrófilos induzida pelo sobrenadante de macrófagos estimulados com MIP-2 ou KC é concentração e tempo dependente. As barras representam o número de neutrófilos coletados das cavidades peritoneais de camundongos BALB/c injetados i.p. 4h antes com o sobrenadante de macrófagos incubados com meio de cultura (RPMI) por 1,5; 3 ou 6h após estímulo com MIP-2 (0,3; 3,0 e 30 ng/mL), KC (0,1; 1,0 ou 10 ng/mL) ou RPMI. A migração de neutrófilos foi determinada 4 h após injeção i.p. do sobrenadante. Os resultados estão apresentados como média±EPM (n=5). * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

Table XI. Concentração de IL-1 β , TNF α e LTB $_4$ no sobrenadante de macrófagos estimulados com KC ou MIP-2.

	IL-1β	TNFα	LTB$_4$
RPMI	14,05 \pm 1,6	32,56 \pm 13,5	33,6 \pm 5,36
KC	75,4 \pm 10,4*	192,36 \pm 52,36*	78,9 \pm 11,34*
MIP-2	45,65 \pm 16,58 [#]	234,58 \pm 23,58 [#]	82,1 \pm 13,5 [#]

Macrófagos peritoneais foram estimulados por 30 min com meio de cultura (RPMI), KC (10 ng/mL) ou MIP-2 (3 ng/mL) e, após estímulos, adicionados com RPMI. O sobrenadante foi coletado 6 h após estímulo *in vitro*. A concentração de IL-1 β , TNF α e LTB $_4$ foi determinada por ELISA (pg/mL). Os resultados estão expressos como média \pm EPM (triplicata); ND = não detectado. *P<0.05 quando comparado ao grupo controle. [#]P<0.05 quando comparado ao grupo tratado com IgG. (“One-way ANOVA” corrigido pelo teste de Bonferroni).

DISCUSSÃO

Na maioria dos processos inflamatórios decorridos de infecção por agentes patógenos, os neutrófilos são os primeiros leucócitos a serem recrutados para o sítio de agressão celular. A mobilização adequada e em tempo hábil desses leucócitos da microcirculação para o sítio de agressão celular caracteriza-se por ser um evento essencial para a defesa do organismo (Malech e Gallin, 1987). Este leucócito polimorfonuclear é responsável pela liberação de metabólitos tóxicos do oxigênio, proteases e óxido nítrico, os quais, apesar de serem essenciais para a defesa do hospedeiro contra microorganismos invasores, também podem causar danos ao próprio tecido do hospedeiro adjacente ao local inflamado. Neste sentido, patologias caracterizadas por uma excessiva presença de neutrófilos no local injuriado como a síndrome da angustia respiratória, a doença inflamatória intestinal, a injúria da reperfusão miocárdica, a glomerulonefrite, a gota, a artrite reumatóide, dentre outras, sugere-se que pelo menos parte da lesão observada é consequência da liberação de substâncias tóxicas por neutrófilos emigrados (Weissmann e Korchak, 1984; Weiss, 1989; Mulligan *e cols.*, 1991; Matheis *e cols.*, 1992; Muid, 1994; Hachicha *e cols.*, 1995; Hansen, 1995; Rutgers *e cols.*, 2003; Kristjansson *e cols.*, 2004; Wong e Lord, 2004; Cuzzocrea *e cols.*, 2005b; Xiao *e cols.*, 2005). Entretanto, pouco se conhece sobre os mediadores e os mecanismos envolvidos no processo de recrutamento de neutrófilos da microcirculação para a área injuriada. Deste modo, o estudo dos mecanismos envolvidos no recrutamento e na ativação dos neutrófilos é de fundamental importância para a melhor compreensão e possível controle da resposta inflamatória.

Neste estudo, utilizamos um modelo de reação inflamatória imune-específica frente a um antígeno protéico - imunização e desafio com OVA em camundongos imunizados - com o objetivo de investigar a participação de quimiocinas CC como MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES e quimiocinas CXC como KC e MIP-2 no recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal. A OVA é uma proteína bastante utilizada como antígeno em protocolos de imunização, geralmente na forma de antígeno solúvel associado ao adjuvante de Freund. A utilização de antígenos em emulsão água-óleo estimula a produção de anticorpos em grande quantidade por um longo período de tempo, sendo este efeito atribuído à lenta liberação do antígeno. Além disso, a utilização do adjuvante completo de Freund, contendo *M. tuberculosis* é utilizado para dirigir a resposta imune para um padrão Th1 após o desafio com OVA, podendo-se observar alta predominância de neutrófilos na fase aguda do processo (Billiau e Matthys, 2001; Canetti, C. *e cols.*, 2001).

Corroborando com resultados obtidos previamente pelo nosso laboratório, observamos que o desafio i.p. com OVA induziu recrutamento de neutrófilos de forma dose e

tempo dependentes em camundongos imunizados. Além disso, observamos que OVA induz recrutamento de neutrófilos com pico na 4^ªh, voltando a valores semelhante aos valores basais na 24^ªh, onde se observou um significativo infiltrado de eosinófilos e células mononucleares. Cinéticas similares de infiltração celular induzido por desafio antigênico em animais imunizados já foi demonstrado em camundongos e em outras espécies (Sharpe e Smith, 1979; Spicer, B.A.L., S.M.; Smith, H., 1985; Metzger *e cols.*, 1986; Spicer, B.A. *e cols.*, 1986; Zuany-Amorim *e cols.*, 1993; Abe *e cols.*, 1994; Klein *e cols.*, 1995; Canetti, C. *e cols.*, 2001).

Inicialmente, buscamos caracterizar o modelo experimental quanto à participação de linfócitos na migração de neutrófilos observada neste modelo. Em reações inflamatórias de origem imunológica, estudos sugerem que linfócitos T parecem ser responsáveis pelo menos em parte pelo processo de recrutamento celular (Czuprynski e Brown, 1987; Appelberg e Silva, 1989; Appelberg, 1992; Klein *e cols.*, 1995; Canetti, C. *e cols.*, 2001; Issekutz *e cols.*, 2003). Uma vez que fora demonstrado pelo nosso grupo que o recrutamento de neutrófilos em camundongos sensibilizados e desafiados com OVA é dependente da participação de linfócitos T CD₄⁺ (Canetti, C. *e cols.*, 2001), propomos verificar neste estudo se animais deficientes de linfócitos T CD₄⁺ exibiriam uma resposta deficitária no recrutamento de neutrófilos após imunização e desafio com OVA. Para este objetivo, utilizamos animais deficientes para a molécula MHC de classe II. Os linfócitos T passam por processos de seleção durante sua maturação no timo, e um desses processos é denominado seleção positiva. A seleção positiva garante a preservação dos precursores de células T cujos receptores (TCRs) ligam-se com baixa avidéz às moléculas próprias do complexo de histocompatibilidade principal (MHC próprio). Desta forma, linfócitos T maduros derivados de uma dessas células deverão ser capazes de reconhecer peptídeos estranhos exibidos pelas moléculas do MHC. Se o TCR, em uma célula T em desenvolvimento, não puder reconhecer qualquer molécula de MHC no timo, a célula morrerá por apoptose. Portanto, a seleção positiva serve para gerar um repertório de células T restritas ao MHC próprio. Assim sendo, camundongos deficientes para a molécula MHC de classe II, durante a seleção positiva no timo, os precursores de linfócitos T CD₄⁺ não podem reconhecer essa molécula, sendo deletados (Grusby e Glimcher, 1995; Huss e Deeg, 1997; Abbas, 2003). Nossos resultados demonstram que, diferentemente da linhagem selvagem, camundongos deficientes de linfócitos T CD₄⁺, quando sensibilizados e desafiados com OVA, apresentaram ausência de migração de neutrófilos, quando comparados aos animais da linhagem selvagem. De fato, diversos trabalhos mostram a importância dos linfócitos T CD₄⁺ na liberação de mediadores quimioatraentes para neutrófilos em diversos modelos de inflamação (Canetti, C. *e cols.*, 2001; Ferretti *e cols.*, 2003; Schaerli *e cols.*, 2004)

A ausência de migração de neutrófilos nestes animais não foi devido à ineficiência do processo de imunização, pois esplenócitos oriundos destes animais e incubado *in vitro* com OVA liberaram quantidades de IL-2 equivalentes aos esplenócitos obtidos de animais controle (linhagem selvagem). Uma vez que estes animais não possuem linfócitos T CD₄⁺, este resultado sugere que a possivelmente linfócitos T CD₈⁺ possam estar liberando IL-2 frente ao estímulo antigênico. De fato, linfócitos T CD₈⁺ coletados do baço de camundongos liberam quantidades significativas de IL-2 quando estimulados *in vitro* com antígeno (Sonobe *e cols.*, 2004). Por outro lado, observamos uma alta titulação de IgG anti-OVA somente no soro dos animais selvagens imunizados. A literatura descreve que a produção de anticorpos contra antígenos protéicos requer a cooperação entre os linfócitos B e os linfócitos T CD₄⁺. A interação das células T CD₄⁺ com os linfócitos B envolve sequencialmente a apresentação do antígeno pela célula B às células T CD₄⁺, ativação destas e expressão de moléculas de co-estimulatórias (CD28, CD40L, integrinas). O resultado final é a estimulação da expansão clonal das células B, troca de isótipos, maturação da afinidade, secreção de anticorpos antígeno-específicos e diferenciação em células B de memória (Huss e Deeg, 1997; Abbas, 2003). Justificando deste modo, nosso resultado, uma vez que na ausência de linfócitos T CD₄⁺, as células B não seriam ativadas, sendo ineficiente a produção de anticorpos antígeno-específicos, no caso anticorpos anti-OVA.

A participação de linfócitos T CD₈⁺ na migração de neutrófilos induzida pelo desafio com OVA em animais imunizados também foi verificada. Para isto, utilizamos animais deficientes para a cadeia β₂-microglobulina, uma das cadeias constituintes das moléculas MHC de classe I. Uma molécula de classe I completa é um heterodímero consistindo de uma cadeia α-microglonulina, uma cadeia β₂-microglobulina e de um peptídeo antigênico, sendo que a expressão estável das moléculas de classe I nas superfícies celulares requer a presença de todos os três componentes do heterodímero (Koller *e cols.*, 1990; Motyka e Teh, 1998; Abbas, 2003; Cui *e cols.*, 2004). Nesses animais, devido a ausência de cadeia β₂-microglobulina, não há expressão de moléculas de MHC de classe I na superfície celular, acarretando a ausência de linfócitos T CD₈⁺, os quais entram em apoptose após a seleção positiva no timo. Nossos resultados demonstram uma importante participação de linfócitos T CD₈⁺, pois observamos reduzida migração de neutrófilos quando os animais deficientes para β₂-microglobulina foram imunizados e desafiados com OVA. Este resultado sugere que este linfócito poderia estar contribuindo na produção de mediadores inflamatórios envolvidos no recrutamento de neutrófilos. Todavia, pouco se conhece entre a relação das células T CD₈⁺ com a migração de

neutrófilos. Este resultado indica que essas células possam apresentar funções diferentes daquelas citotóxicas, exercendo atividades importantes para o recrutamento celular durante uma resposta inflamatória de origem imune. Neste sentido, a literatura demonstra que linfócitos T CD₈⁺ ativados liberam quantidades significativas de mediadores envolvidos com a migração de neutrófilos, como IL-8, MIP-1 α e TNF α (Kim, J.J. *e cols.*, 1998; Wang, Y. *e cols.*, 1999; Aubertin *e cols.*, 2000; Grob *e cols.*, 2003). Os resultados também demonstram que ausência de migração de neutrófilos nos animais deficientes para linfócitos CD₈⁺ não se deve ao fato destes animais não estarem sensibilizados à OVA, pois esplenócitos oriundos destes animais liberaram a mesma quantidade de IL-2 determinada no sobrenadante de células obtidas de animais selvagens imunizados com OVA. Ademais, foi observado a presença de altos níveis de IgG anti-OVA no soro dos animais $\beta_2^{-/}$ imunizados

Após verificarmos a participação dos linfócitos T CD₄⁺ e linfócitos T CD₈⁺, questionamos se os linfócitos B também estariam contribuindo para a migração de neutrófilos observada no modelo de imunização e desafio com OVA. Para a realização deste objetivo, animais deficientes para linfócitos B, os quais não produzem linfócitos B maduros devido a ausência de expressão de IgM associada à membrana, durante os estágios de maturação da célula B. Desta forma, verificamos que esses animais apresentam reduzida migração de neutrófilos quando imunizados e desafiados com OVA, sugerindo a participação desses linfócitos neste modelo. A literatura descreve que tanto para a geração da imunidade humoral quanto para a ativação das células T CD₄⁺, faz-se necessário a interação entre as células T CD₄⁺ e as células B. Deste modo, linfócitos B apresentam importante função na ativação de linfócitos T CD₄⁺, os quais seriam os responsáveis pela liberação de mediadores envolvidos na migração de neutrófilos (Bishop e Hostager, 2001; Harnett *e cols.*, 2005). Os resultados também demonstram que a ausência de migração de neutrófilos nestes animais não foi devido ao fato destes animais não estarem sensibilizados a OVA, uma vez que esplenócitos oriundos destes animais liberaram a mesma quantidade de IL-2 do que aquela determinada no sobrenadante de células obtidas de animais selvagens imunizados. Embora exista um consenso na literatura sobre um menor papel de anticorpos e complemento na indução de doenças auto-imunes, sabe-se que a resposta humoral está envolvida no dano tecidual, induzindo inclusive migração de leucócitos para o tecido inflamado (Hogarth, 2002). Contudo, em nosso modelo, anticorpos não parecem ter um papel essencial ou não são fator determinante para a migração de neutrófilos, uma vez que observamos que animais CD₈^{-/} produzem anticorpos anti-OVA, e não apresentam migração de neutrófilos após desafio antigênico.

Uma vez que observamos ausência de migração de neutrófilos na inflamação de origem imune induzida em camundongos deficientes de linfócitos T CD4+, T CD8+ e B, investigamos se o mesmo resultado seria observado frente a um estímulo não-imune, como o LPS. Desta forma, resultados obtidos pelo nosso laboratório indicam que a ausência de migração de neutrófilos nesses animais não foi devido à inabilidade destes em recrutar neutrófilos, uma vez que a administração de um agente flogístico como o LPS causou recrutamento semelhante àquele observado em animais selvagens (Nogueira, 2004).

Nossos resultados também demonstram que mastócitos residentes peritoneais são importantes células envolvidas no recrutamento de neutrófilos induzido por OVA em animais imunizados. Nossos resultados demonstram que a migração de neutrófilos induzida por OVA é potencializada pela depleção da população de mastócitos residentes peritoneais através do tratamento crônico o composto 48/80 ou pela administração prévia de água destilada. Este dado sugere que mastócitos residentes peritoneais possuem importante função em modular negativamente o recrutamento de neutrófilos induzido por OVA em camundongos imunizados. Os mastócitos são importantes células secretoras localizadas adjacientemente aos vasos sanguíneos. Vários estudos evidenciam a importância dos mastócitos na modulação da migração de eosinófilos e neutrófilos por diferentes estímulos (Oliveira *e cols.*, 1994; Perretti *e cols.*, 1994; Ribeiro *e cols.*, 1997; Ramos *e cols.*, 2003). Recentemente nosso laboratório demonstrou que mastócitos participam controlando negativamente a migração de neutrófilos induzida por dentina através da liberação de citocinas antiinflamatórias com IL-4 e IL-10 (Silva *e cols.*, 2005). Além disso, a migração de neutrófilos induzida por lectina é controlada por mastócitos residentes peritoneais (Alencar *e cols.*, 2005)

Desde que verificamos um papel modulador dos mastócitos residentes peritoneais na migração de neutrófilos induzida por OVA em camundongos imunizados, buscamos investigar se moléculas com atividade antiinflamatória e sabidamente liberadas por mastócitos, como IL-4 e IL-10 poderiam estar participando da mesma forma. Estas citocinas atuam na diferenciação dos linfócitos Th, polarizando a diferenciação para Th₂, as quais podem reduzir ou suprimir a resposta Th₁, inibindo a produção de citocinas com atividades pró-inflamatórias, como IL-1, TNF α , IL-6, IL-8, entre outras (Mosmann *e cols.*, 1986; Te Velde *e cols.*, 1990; Wang, P. *e cols.*, 1995). Nossos resultados demonstram que o desafio com OVA em animais deficientes de IL-10 imunizados apresenta o mesmo perfil de resposta verificado com o protocolo de depleção de mastócitos. Entretanto, este fato não ocorreu quando animais deficientes de IL-4 foram desafiados e imunizados com OVA, sugerindo que mastócitos poderiam estar controlando negativamente a migração de neutrófilos através da liberação de IL-10.

Uma vez caracterizada a participação de leucócitos na migração de neutrófilos induzida por antígeno em camundongos imunizados, buscamos agora investigar a participação das quimiocinas na migração de neutrófilos observada neste modelo. Como descrito anteriormente, a descoberta das quimiocinas acrescentou um novo alvo para o estudo dos mecanismos envolvidos na migração leucocitária (Oppenheim *e cols.*, 1991; Gale e Mccoll, 1999). As quimiocinas podem participar da adesão dos leucócitos ao endotélio, da transmigração destes para os tecidos subjacentes, tão bem como a ativação de suas funções efetoras (Rankin *e cols.*, 1990; Furie e Randolph, 1995; Ajuebor *e cols.*, 1999; Moser e Willmann, 2004). Para investigarmos a participação de quimiocinas em nosso modelo de inflamação de origem imune, primeiramente verificamos a expressão de RNAm para quimiocinas. Deste modo, células peritoneais oriundas de camundongos imunizados e desafiados com OVA foram submetidas ao ensaio de RPA e RT-PCR. Nossos resultados demonstram uma aumentada expressão de RNAm para as quimiocinas CC RANTES, eotaxina, MIP-1 α , MCP-1 e TCA-3 e para as quimiocinas CXC MIP-2 e KC. Com relação aos receptores de quimiocinas, encontramos uma aumentada expressão de RNAm para o receptor de quimiocinas CC, CCR1, e para o receptor de quimiocinas CXC, o CXCR2. Entretanto não verificamos aumento expressivo para os receptores CCR2 e CCR5. Corroborando com estes resultados, a literatura demonstra a participação destas quimiocinas em diversos modelos de inflamação de origem imune (Das *e cols.*, 1999; Blease *e cols.*, 2000; Miura *e cols.*, 2001; Fokkema *e cols.*, 2003; Gonzalez *e cols.*, 2003; Ji *e cols.*, 2003; Wareing *e cols.*, 2004; Vuk-Pavlovic *e cols.*, 2005). Com o intuito de verificarmos se o RNAm estava sendo bem traduzido, submetemos o lavado peritoneal coletado de camundongos imunizados e desafiados com OVA ao ensaio de ELISA para quimiocinas. Deste modo, verificamos um significativo aumento na produção de MIP-1 α , RANTES, KC e MIP-2. Por outro lado, o ensaio não foi capaz de detectar a produção de MIP-1 β . Este fenômeno poderia ser explicado pela diferença da cinética de liberação de MIP-1 β , ou seja, como MIP-1 β é relacionada com a migração de leucócitos recrutados mais tardiamente, como eosinófilos, macrófagos e linfócitos, possivelmente o RNAm para esta quimiocina possa estar sendo traduzido mais tardiamente.

Diante desses resultados, dirigimos nosso estudo no sentido de investigarmos a participação das quimiocinas CC MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES na migração de neutrófilos induzida por OVA. Para isto, verificamos que o desafio com OVA em camundongos deficientes da quimiocina MIP-1 α previamente sensibilizados não foi capaz de induzir significativo recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal destes animais. Conforme

realizado com outras linhagens de camundongos deficientes, a ausência da migração de neutrófilos em animais deficientes de MIP-1 α não foi devido ao fato destes animais não estarem sensibilizados à OVA, uma vez que esplenócitos oriundos destes animais liberam concentrações de IL-2 semelhantes aos esplenócitos obtidos de animais controle quando incubados *in vitro* com OVA. Além disso, observamos uma alta titulação de IgG anti-OVA no soro coletados de camundongos tanto da linhagem selvagem como MIP-1 α ^{-/-} imunizados. Nossos resultados também demonstram que embora tenhamos detectado a expressão de RNAm para MIP-1 β e RANTES, essas quimiocinas não participam da migração de neutrófilos induzida por OVA em camundongos imunizados, pois o tratamento de camundongos imunizados com anti-RANTES ou anti-MIP-1 β não interferiu com o recrutamento de neutrófilos induzido pelo desafio com OVA. Corroborando com este resultado, resultados recentes demonstram que a migração de neutrófilos em um modelo de peritonite alérgica pode ser inibida com o tratamento dos animais com o anticorpo anti-MIP-1 α (Das *e cols.*, 1999). MIP-1 α pode ser produzida por uma variedade de células, incluindo linfócitos T e B, macrófagos, mastócitos, células epiteliais, fibroblastos e outras (Gao *e cols.*, 1993). A secreção desta quimiocina por macrófagos e linfócitos T pode induzir o influxo de outras células inflamatórias, como neutrófilos. Neste sentido, Alam *e cols.*, demonstraram que a injeção de MIP-1 α na pata de camundongos induz uma acentuada infiltração de neutrófilos (Alam *e cols.*, 1994). Além disso, resultados recentes demonstram que MIP-1 α também induz o recrutamento de neutrófilo humanos *in vitro* (Sato *e cols.*, 2000; Ottonello *e cols.*, 2005)

Uma vez que nosso grupo demonstrou que o recrutamento de neutrófilos em camundongos sensibilizados e desafiados com OVA é dependente da liberação de TNF α e LTB₄ (Canetti, C. *e cols.*, 2001), buscamos investigar se animais deficientes de MIP-1 α também apresentaria uma reduzida concentração desses mediadores. De fato, nossos resultados mostram que, diferentemente dos camundongos da linhagem selvagem, o lavado peritoneal de camundongos deficientes de MIP-1 α sensibilizados e desafiados com OVA, não apresentou aumento significativo nas concentrações de TNF α e LTB₄, sugerindo que esta quimiocina possa ser responsável pela liberação desses mediadores inflamatórios. Nosso próximo passo foi verificar o envolvimento do TNF α e do LTB₄ na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida pela MIP-1 α . A administração i.p. de MIP-1 α induziu, dose-dependentemente, significativa migração de neutrófilos após 4h de sua administração. O envolvimento de TNF α foi verificado por duas ferramentas distintas: a) uso de anticorpos anti-TNF α ; e b) utilização de camundongos deficientes para o receptor p55. Em ambos protocolos

experimentais verificamos uma marcante inibição do acúmulo de neutrófilos quando comparado aos animais controle. Nossos resultados também demonstram a dependência do TNF α para que haja liberação do LTB $_4$, pois camundongos deficientes do receptor p55, diferentemente dos camundongos da linhagem selvagem, não apresentaram aumento significativo na produção de LTB $_4$ após administração de MIP-1 α . A participação do LTB $_4$ no recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzido pela MIP-1 α foi farmacologicamente confirmada, desde que camundongos pré-tratados MK886 (inibidor da FLAP – proteína ativadora da enzima 5-lipoxigenase) não exibiram acúmulo significativo de neutrófilos na cavidade peritoneal, após administração da quimiocina. Desta forma, estes resultados demonstram que do mesmo modo que a migração de neutrófilos observada em animais sensibilizados e desafiados com OVA, a MIP-1 α também induz acúmulo de neutrófilos de uma maneira dependente da liberação de TNF α , tendo o LTB $_4$ como provável mediador final.

A MIP-1 α liga-se a dois subtipos de receptores, o CCR1 e o CCR5. Deste modo, investigamos neste estudo, por qual receptor a MIP-1 α estaria interagindo para promover o acúmulo de neutrófilos. Desta forma, verificamos que a sensibilização e o desafio com OVA não induz migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos deficientes para o receptor CCR1. Corroborando com este resultado, a literatura demonstra que a expressão de CCR1 pode ser induzida em neutrófilos ativados (Cheng *e cols.*, 2001). Além disso, camundongos deficientes para CCR1 demonstraram uma ineficiente migração de neutrófilos quando infectados com *Toxoplasma gondii*, e esta deficiência foi relacionada com uma maior suscetibilidade a doença (Khan *e cols.*, 2001). Mais recentemente, Shahrara e cols demonstraram que o tratamento de ratos com met-RANTES, antagonista competitivo dos receptores CCR1 e CCR5, inibe a inflamação na articulação, a destruição óssea e o recrutamento leucocitário na artrite induzida por adjuvante (Shahrara *e cols.*, 2005). Por outro lado, verificamos um aumento no acúmulo de neutrófilos em animais deficientes do receptor CCR5, quando submetidos ao mesmo protocolo experimental. Conforme esperado, a administração i.p. de MIP-1 α em animais deficientes do receptor CCR1 ou CCR5 apresentou resultado similar ao verificado com a OVA, indicando que o recrutamento de neutrófilos induzido por OVA em camundongos imunizados depende da interação entre a MIP-1 α e o receptor CCR1. O resultado mostrando que animais deficientes para CCR5 respondem de um modo exacerbado ao estímulo com OVA ou MIP-1 α , poderia ser explicado pelo fato de que animais CCR5^{-/-} poderiam estar apresentando maior disponibilidade do receptor CCR1 para

interagirem com MIP-1 α ou liberando outros mediadores quimiotáticos. De fato, animais deficientes para CCR5, quando submetidos a um protocolo de neurite imune, produziram maiores concentrações de IP-10 e MIP-1 β quando comparados aos camundongos da linhagem selvagem (Duan *e cols.*, 2004). Além disso, outra possível explicação consiste na hipótese de que o receptor CCR5 poderia estar relacionado com a liberação de mediadores envolvidos com o controle negativo da migração de neutrófilos.

Concluindo a investigação da participação de quimiocinas CC no modelo de imunização e desafio com OVA, observamos que embora células peritoneais expressem RNAm para as quimiocinas MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES, somente MIP-1 α participa do recrutamento de neutrófilos induzido por OVA. Além disso, os resultados demonstram que MIP-1 α é responsável pela liberação de TNF α e LTB $_4$ através de interação com o receptor CCR1.

De acordo com os dados coletados da literatura até o presente momento, sugere-se também uma possível participação de quimiocinas CXC-ELR⁺ na inflamação de origem imunológica. Neste sentido, resultados recentes demonstram que as quimiocinas KC e MIP-2 participam na modulação do recrutamento de neutrófilos após desafio antigênico, tendo o linfócito T CD4⁺ como responsável pela liberação destas quimiocinas (Knott *e cols.*, 2001). A literatura demonstra que MIP-2 é essencial para a migração de neutrófilos em diversos modelos de inflamação. O uso de anticorpos neutralizantes anti-MIP-2 inibe significativamente a migração de neutrófilos para o tecido renal isquêmico, restaurando a função renal (Miura *e cols.*, 2001). Além disso, anticorpos anti-MIP-2 inibe o acúmulo de neutrófilos para o pulmão, o edema e a injúria pulmonar induzida por *Klebsiella*, por imunocomplexos ou pelo LPS (Greenberger *e cols.*, 1996; Schmal *e cols.*, 1996; Shanley *e cols.*, 1997). Estudos também relatam a presença de quimiocinas CXC em modelos de artrite reumatóide correlacionadas com a migração de neutrófilos (Brennan *e cols.*, 1991; Koch *e cols.*, 1991; Seitz, 1991; Deleuran *e cols.*, 1994; Kasama *e cols.*, 1995; Thornton *e cols.*, 1999; Cuzzocrea *e cols.*, 2005a). Kunkel et al., demonstraram a expressão de MIP-2 no modelo de artrite induzida pelo colágeno em camundongos susceptíveis. Além disso, o tratamento anti-MIP-2 interferiu com o desenvolvimento e progressão da artrite (Kasama *e cols.*, 1995). Mais recentemente, demonstrou-se que a inibição do MIF tanto farmacologicamente como geneticamente inibe significativamente o desenvolvimento da artrite induzida tanto por LPS como por anticorpos anti-colágeno, sendo que este efeito foi correlacionado com a inibição da produção de MIP-2 e ativação da matrizmetaloproteinase 2 (Ichiyama *e cols.*, 2004). Perante a estes resultados,

investigamos o envolvimento de quimiocinas CXC-ELR⁺, particularmente KC e MIP-2, na migração de neutrófilos induzida por OVA em animais imunizados.

Conforme descrito anteriormente, verificamos uma aumentada expressão de RNAm para MIP-2 e KC, correlacionada com aumentada liberação dessas proteínas após o desafio com OVA em animais imunizados. Entretanto, os resultados demonstram que somente MIP-2 parece participar do recrutamento de neutrófilos observado neste modelo, pois o tratamento com anticorpo anti-MIP-2, mas não com anti-KC, inibiu significativamente o acúmulo de neutrófilos para a cavidade peritoneal após desafio antigênico em camundongos imunizados. Esses resultados indicam uma importante participação de MIP-2 na migração de neutrófilos verificada neste modelo e sugerem que esta quimiocina possa estar envolvida na cascata conhecida até o presente momento: MIP-1 α \Rightarrow TNF α \Rightarrow LTB₄.

Nossos resultados também demonstram que a migração de neutrófilos induzida por OVA em animais imunizados dependem da ativação do receptor CXCR2, pois além de observarmos uma aumentada expressão de RNAm para este receptor nas células peritoneais de animais imunizados e desafiados com OVA, também observamos que o pré-tratamento de camundongos imunizados com repertaxina, droga antagonista dos receptores CXCR1 e CXCR2, inibe completamente o recrutamento de neutrófilos induzido por OVA. Conforme esperado, repertaxina também inibiu a migração de neutrófilos induzida pela MIP-2, sugerindo que o recrutamento de neutrófilos induzido pro OVA é dependente da interação da MIP-2 com o receptor CXCR2. Embora a repertaxina possa bloquear os receptores CXCR1 e CXCR2, até o presente momento não foi detectada a expressão do receptor CXCR1 em camundongos. Neste caso, em camundongos, a repertaxina estaria antagonizando somente o receptor CXCR2. De fato, outros autores demonstraram que o bloqueio do receptor CXCR2 em camundongos infectados com aspergillosis pulmonar invasiva promove significativa redução do influxo de neutrófilos para o pulmão (Mehrad *e cols.*, 1999). Além disso, Belperio *e cols.* (2002) observaram que a inibição do receptor CXCR2 em um modelo de injúria pulmonar acarreta em inibição do seqüestro de neutrófilos para o tecido pulmonar e redução da injúria (Belperio *e cols.*, 2002). Resultado similar foi observado no modelo de brônquite em camundongos (Belperio *e cols.*, 2005).

Desde que nossos resultados demonstraram que a migração de neutrófilos em camundongos imunizados e desafiados com OVA é dependente da liberação seqüencial de MIP-1 α , TNF α e LTB₄, dirigimos nosso estudo no sentido de investigar os mediadores envolvidos na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por MIP-2. Neste sentido, verificamos que MIP-2 induz migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de

camundongos de uma maneira dose e tempo dependentes, onde maior número de neutrófilos foi detectado na 4^ah após administração da quimiocina, retornando a valores semelhantes ao basal na 24^ah.

Com o intuito de investigar o envolvimento do TNF- α , pré-tratamos os animais com talidomida e verificamos o seu efeito na migração de neutrófilos induzida pela MIP-2. A talidomida foi primeiramente introduzida no mercado como um sedativo e antiemético para o primeiro trimestre de gestação. Porém foi observado que o uso desta droga por gestantes provocava algumas alterações no desenvolvimento fetal. Logo, estudos demonstraram que esta droga possuía efeitos teratogênicos, fato que levou a retirada da talidomida do mercado (Ashby *et cols.*, 1997; Hales, 1999). O mecanismo envolvido no efeito teratogênico da talidomida ainda não está completamente esclarecido, todavia estudos indicam que este mecanismo envolva a produção de reativos do oxigênio, o que levaria a danificações no DNA (Parman *et cols.*, 1999). Apesar da alta toxicidade da talidomida, estudos clínicos indicaram que esta droga também possui efeito modulatório do sistema imune e propriedades anti-angiogênicas (Calderon *et cols.*, 1997; Yasui *et cols.*, 2005). Estudos também demonstram que a talidomida inibe significativamente a produção de TNF α e IL-12 induzida pelo LPS, sugerindo que este efeito estivesse ligado à uma inibição do fator de transcrição nuclear NF- κ B (Moller, D.R. *et cols.*, 1997; Tavares *et cols.*, 1997; Corral *et cols.*, 1999; Corral e Kaplan, 1999; Mercurio e Manning, 1999). Desta forma, verificamos um possível envolvimento do TNF α na migração de neutrófilos induzida pela MIP-2, pois o pré-tratamento com talidomida inibiu significativamente o acúmulo de neutrófilos desencadeado pela administração desta quimiocina. Confirmando o envolvimento do TNF α , demonstramos reduzida migração de neutrófilos induzida pela MIP-2 tanto em camundongos pré-tratados com anti-TNF α , como em camundongos geneticamente deficientes do receptor tipo I para o TNF α (p55^{-/-}).

Outro importante mediador inflamatório pesquisado foi o LTB₄, ativo mesmo em pequenas quantidades. Esta molécula também é capaz ativar e regular a exposição de moléculas de adesão na membrana dos neutrófilos. Além disso, o LTB₄ é conhecido como o mediador final na migração de neutrófilos induzida por OVA em animais imunizados (Canetti, C. *et cols.*, 2001). Para estudarmos a participação do LTB₄ em nosso modelo experimental, os animais foram pré-tratados com MK 886 e, seguidamente injetados com MIP-2. O MK886 inibe a ativação da 5-lipoxigenase e sua ação é bem caracterizada por estudos “*in vivo*” e “*in vitro*” (Gillard *et cols.*, 1989), seu mecanismo de ação envolve uma inibição da ligação da enzima 5-lipoxigenase citossólica à proteína FLAP (Proteína ativadora da 5-lipoxigenase)

localizada na membrana plasmática (Samuelsson *e cols.*, 1991). Nossos resultados demonstram uma importante participação do LTB₄ na migração de neutrófilos induzida pela MIP-2, pois o pré-tratamento com MK886 inibiu significativamente o recrutamento de neutrófilos induzido pela quimiocina. Deste modo, nossos resultados sugerem que a migração de neutrófilos induzida pela MIP-2 é dependente da produção e liberação de TNF α e LTB₄.

Outros mediadores inflamatórios também foram estudados no recrutamento de neutrófilos induzido pela MIP-2. Para estudarmos a participação de prostaglandinas, utilizamos a indometacina, potente droga inibitória da formação de prostaglandinas atuando diretamente na enzima ciclooxigenase. Dados encontrados na literatura demonstram que a utilização de indometacina inibe a formação de edema e a infiltração de leucócitos na inflamação induzida por Carragenina (Wallace *e cols.*, 1998). Nossos resultados demonstraram que possivelmente os produtos da enzima COX não estejam envolvidos da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por MIP-2, pois o pré-tratamento com indometacina foi ineficaz em reverter este processo. Outro mediador inflamatório investigado foi a histamina. Esta molécula contribui com a vasodilatação capilar e com o aumento da permeabilidade celular das células endoteliais, um processo fundamental para a migração dos neutrófilos da microcirculação para o foco inflamatório. Nossos resultados demonstram que a histamina possivelmente não esteja envolvida na migração de neutrófilos induzida por MIP-2, desde que o tratamento dos animais com antagonistas seletivos de receptores histaminérgicos (H1 e H2) como a pirilamina e a cimetidina, respectivamente, não foram eficazes em reverter a migração de neutrófilos induzida por MIP-2. Nossos resultados também demonstram que o tratamento dos animais com dexametasona, inibiu significativamente a migração de neutrófilos induzida pela MIP-2. A dexametasona é um glicocorticóide que entre outros efeitos inibe a atividade da fosfolipase A2, enzima responsável pela liberação do ácido araquidônico da membrana celular, sendo este efeito exercido provavelmente pela indução da síntese de lipocortina, um peptídeo com atividade anti-fosfolipase A2, como consequência, inibe a produção de eicosanóides como prostaglandinas e leucotrienos (Sautebin *e cols.*, 1992; Czock *e cols.*, 2005). Além desse efeito, a dexametasona inibe a síntese de algumas citocinas pró-inflamatórias, pela capacidade dos glicocorticóides em inibir fatores de transcrição nuclear como o NF- κ B (Auphan *e cols.*, 1995; Scheinman *e cols.*, 1995a; Scheinman *e cols.*, 1995b; Valledor e Ricote, 2004).

Perante o achado de que a migração de neutrófilos induzida pela MIP-2, assim como observado com a OVA e com a MIP-1 α , depende da produção de TNF α e LTB₄, investigamos se havia alguma hierarquia na liberação dessas quimiocinas. Interessantemente, nossos

resultados demonstraram que a migração de neutrófilos induzida pela MIP-2 depende da produção de MIP-1 α , pois MIP-2 não foi capaz de induzir migração de neutrófilos em animais deficientes de MIP-1 α ou em animais pré-tratados com anti-MIP-1 α . Confirmando a dependência da MIP-1 α na migração de neutrófilos induzida por MIP-2, verificamos que a administração desta quimiocina induz a produção e liberação de MIP-1 α , TNF α e LTB $_4$ e que o pré-tratamento dos animais com anti-MIP-1 α inibe completamente a produção e liberação de TNF α e LTB $_4$. Estes resultados sugerem que MIP-2 inicia a liberação sequencial de MIP-1 α , TNF α e LTB $_4$ na migração de neutrófilos observada no modelo de imunização e desafio com OVA. Pelo nosso conhecimento, esta é a primeira demonstração de que uma migração de neutrófilos induzida por uma quimiocina CXC-ELR $^+$, dependente da produção de uma quimiocina CC. De fato, MIP-2 e MIP-1 α foram descritas como quimioatraentes envolvidos na migração de neutrófilos observada em um modelo de DTH (Tumpey *et cols.*, 2002). Entretanto, os autores não verificaram se essas quimiocinas possuíam um padrão hierárquico.

Em resumo, neste estudo demonstramos a importante participação da MIP-2 no acúmulo de neutrófilos na cavidade peritoneal no modelo de inflamação de origem imune. Nossos resultados demonstram que MIP-2 interage com o receptor CXCR2 induzindo a produção de MIP-1 α , a qual interage com o receptor CCR1, induzindo a liberação sequencial de TNF α e LTB $_4$. Esquematizando, a migração de neutrófilos induzida pelo desafio com OVA em camundongos imunizados depende da seguinte cascata de mediadores: MIP-2 \Rightarrow MIP-1 α \Rightarrow TNF α \Rightarrow LTB $_4$. De acordo com os dados da literatura descrevendo que a migração de neutrófilos induzida por quimiocinas CXC em humanos depende da interação entre os receptores CXCR1 e CXCR2, nossos resultados sugerem fortemente que estratégias de bloqueio dos mediadores produzidos na fase aguda do processo inflamatório poderiam ser eficientes em terapias clínicas para inflamações de origem imune mediada pelos neutrófilos.

Embora nossos resultados demonstraram que KC não participa na migração de neutrófilos induzida por OVA em camundongos imunizados, nesta segunda parte deste estudo, buscamos elucidar os mecanismos envolvidos na migração de neutrófilos induzida por KC. Para isto, primeiramente realizamos uma curva dose e tempo resposta para o KC e verificamos que esta quimiocina induz migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos de uma maneira dose e tempo dependente, onde o maior número de neutrófilos foi detectado na 4 $^{\text{a}}$ h após administração da quimiocina, retornando a valores semelhantes ao basal na 24 $^{\text{a}}$ h. Seguidamente, investigamos quais mediadores inflamatórios estariam envolvidos na migração de neutrófilos induzida por KC em camundongos, através da utilização de ferramentas

farmacológicas. Deste modo, camundongos foram pré-tratados com diferentes drogas antiinflamatórias e o efeito de cada droga na migração de neutrófilos induzida por KC foi avaliado. Nossos resultados demonstram que citocinas como o TNF α e a IL-1 β , bem como os leucotrienos estão envolvidos no recrutamento de neutrófilos induzido por KC, desde que o pré-tratamento dos animais com talidomida (droga inibitória da transcrição gênica de citocinas), IL-1ra (antagonista do receptor da IL-1) ou com MK886 (inibidor da 5-lipoxigenase) inibiram significativamente o acúmulo de neutrófilos observado após administração da quimiocina. O envolvimento do TNF α foi confirmado, pois camundongos geneticamente deficientes do receptor tipo I para o TNF α (p55^{-/-}) apresentaram uma deficiente migração de neutrófilos frente ao estímulo com KC. Confirmando o envolvimento desses mediadores inflamatórios, verificamos um aumento da produção e liberação de IL-1 β , TNF α e LTB₄ no lavado peritoneal de camundongos injetados com KC. Por outro lado, nossos resultados também indicam que moléculas como a histamina e os produtos da ciclooxigenase não participam no processo de migração de neutrófilos induzido por KC, pois o tratamento dos animais com antagonistas seletivos de receptores histaminérgicos (pirilamina e cimetidina) ou indometacina, droga inibitória da enzima ciclooxigenase não afetou o recrutamento de neutrófilos induzido por KC.

Seguidamente, direcionamos nosso estudo no sentido de investigar a participação de células residentes peritoneais na migração de neutrófilos induzida por KC e MIP-2. Deste modo, quando estas quimiocinas foram administradas em camundongos depletados de mastócitos peritoneais, observamos que estas células participam modulando negativamente a migração de neutrófilos induzida por KC e MIP-2., visto que a administração destas quimiocinas potencializou o recrutamento de neutrófilos nesses animais. Seguidamente, utilizamos o Tioglicolato como ferramenta farmacológica para estudarmos a participação da população de macrófagos peritoneais. Deste modo, observamos que o aumento da população de macrófagos potencializa o acúmulo de neutrófilos observado após administração de KC e MIP-2. Macrófagos residentes são considerados como a célula chave no controle do recrutamento de neutrófilos em processos inflamatórios induzidos por estímulos exógenos como carragenina, zymosan e LPS ou por mediadores quimiotáticos como IL-1, TNF α , MCP-1 e C5a (Souza *e cols.*, 1988; Faccioli *e cols.*, 1990; Maus, U. *e cols.*, 2001; Maus, U.A. *e cols.*, 2003; Godau *e cols.*, 2004; Silva *e cols.*, 2005).

Confirmando a participação de macrófagos peritoneais na migração de neutrófilos induzida por KC ou MIP-2, nossos resultados demonstram que a administração do

sobrenadante coletado de macrófagos peritoneais incubado *in vitro* com KC ou MIP-2 induziu significativa migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal. De acordo com os resultados *in vivo*, onde observamos que a migração de neutrófilos induzida por KC foi inibida pelo tratamento com drogas inibitórias dos efeitos da IL-1, do TNF α e do LTB $_4$, e que a migração de neutrófilos induzida pela MIP-2 também depende do TNF α e do LTB $_4$, submetemos o sobrenadante de macrófagos peritoneais incubados *in vitro* com estas quimiocinas ao ensaio de ELISA para o TNF α , a IL-1 β e para o LTB $_4$. Nossos resultados demonstram que macrófagos peritoneais estimulados tanto com KC como MIP-2 liberam concentrações significativas destes mediadores, sugerindo que macrófagos peritoneais possam ser a célula fonte de IL-1 β , TNF α e LTB $_4$.

Os estudos sobre as substâncias quimiotáticas envolvidas na migração de neutrófilos para o foco inflamatório ainda não são conclusivos, visto que a maioria das revisões cita que o processo é multimediado, o qual depende do estímulo ou do tecido lesado, onde diferentes fatores quimiotáticos participam do processo. Entender o papel dos diferentes fatores quimiotáticos nos diversos modelos de inflamação, bem como nas patologias humanas, permitirá o desenvolvimento de novas terapias, mais efetivas e com menores efeitos colaterais, para o tratamento dessas patologias. Nesse sentido, quando pegos em conjunto, nossos resultados contribuem significativamente com o entendimento dos mecanismos envolvidos no recrutamento de neutrófilos em um modelo de inflamação de origem imune, demonstrando que quimiocinas como MIP-2 e MIP-1 α possuem um papel central neste processo.

*“O rio atinge seus objetivos
porque aprendeu a
contornar obstáculos.”
Lao Tse*

RESUMO

Neste presente estudo, investigamos o envolvimento da quimiocinas MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, KC e MIP-2, tão bem como os receptores para quimiocinas CC e CXC na migração de neutrófilos induzida por OVA em camundongos imunizados. O desafio i.p. com OVA em camundongos imunizados induziu recrutamento de neutrófilos de maneira dose e tempo dependente. A migração de neutrófilos induzida por OVA foi acompanhada pelo aumento da expressão de RNAm para MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, KC, MIP-2, CCR1 e CXCR2. Além disso, a produção de MIP-1 α , RANTES, KC e MIP-2, mas não de MIP-1 β foi verificada no lavado peritoneal de camundongos imunizados e desafiados com OVA. OVA faliu em induzir migração de neutrófilos em camundongos MIP-1 α ^{-/-} imunizados ou em camundongos WT tratados com α -MIP-2. Entretanto, o tratamento com anticorpos α -RANTES, α -MIP-1 β ou α -KC não inibiu o recrutamento de neutrófilos induzido por OVA em camundongos imunizados. MIP-1 α induz migração de neutrófilos através da indução da síntese de TNF α , and LTB₄, pois: a liberação desses mediadores foi detectada no lavado peritoneal de camundongos WT imunizadas, mas não em camundongos MIP-1 α ^{-/-}; a administração de MIP-1 α em camundongos WT induziu migração de neutrófilos de maneira dose dependente, sendo inibida pelo tratamento com α -TNF α , ou pelo uso de camundongos deficientes para o TNFR1 (p55^{-/-}), ou pelo tratamento com MK 886 (inibidor da 5-lipoxigenase); e ao contrario de camundongos WT, MIP-1 α faliu em induzir a produção de LTB₄ em camundongos p55^{-/-}. Os resultados também demonstram que MIP-1 α liga-se ao receptor CCR1 para induzir migração de neutrófilos, desde que, em contraste com camundongos CCR5^{-/-}, OVA e MIP-1 α faliu em induzir recrutamento de neutrófilos em camundongos CCR1^{-/-}.

Com o intuito de estudarmos a participação de quimiocinas CXC chemokines na migração de neutrófilos induzida por OVA, camundongos BALB/c naïve ou imunizados foram pré-tratados com repertaxina (antagonista do CXCR2). Os resultados demonstram que repertaxina foi efetiva em inibir a migração de neutrófilos induzida por OVA e MIP-2. Assim como MIP-1 α , os resultados mostram que a migração de neutrófilos induzida pela MIP-2 depende da produção de TNF α and LTB₄, uma vez que o pré-tratamento dos camundongos com α -TNF α ou MK886 significativamente inibiu o recrutamento de neutrófilos induzido por esta quimiocina. Seguidamente, testamos a hipótese de que MIP-2 estaria induzindo migração de neutrófilos dependentemente da liberação de MIP-1 α . Deste modo, que MIP-2 faliu em induzir recrutamento de neutrófilos em camundongos MIP-1 α ^{-/-}. Confirmando este resultado, o anticorpo α -MIP-1 α foi efetivo em inibir a migração de neutrófilos induzida por MIP-2. Além disso, MIP-2 induziu a produção de MIP-1 α , TNF α e LTB₄ e, este efeito foi bloqueado pelo tratamento dos camundongos com α -MIP-1 α .

Na segunda parte deste estudo, investigamos os mecanismos envolvidos no recrutamento de neutrófilos induzido por KC e MIP-2 para a cavidade peritoneal de camundongos. Primeiramente, observamos que a administração i.p. de KC ou MIP-2 induz migração de neutrófilos de maneira dose e tempo dependente. Os resultados indicam que o acúmulo de neutrófilos induzido por estas quimiocinas é dependente da produção e liberação de TNF α e LTB $_4$, pois o pré-tratamento dos camundongos com α -TNF α ou MK886 inibiu significativamente a migração de neutrófilos induzida por KC e MIP-2. Confirmando o envolvimento do TNF α , MIP-2 e KC induziram reduzida migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos p55 $^{-/-}$, quando comparados com os camundongos WT. Além disso, a migração de neutrófilos induzida por KC, mas não por MIP-2 foi significativamente inibida pelo tratamento com IL-1ra (antagonista do receptor da IL-1), sugerindo o envolvimento desta citocina na migração de neutrófilos induzida por KC.

A migração de neutrófilos induzida por MIP-2 e KC é dependente de macrófagos residentes peritoneais, desde que a administração destas quimiocinas em camundongos pré-tratados com tioglicolato induziu exarcebada migração de neutrófilos quando comparado com camundongos controle. Confirmando a dependência de macrófagos, a administração i.p. com o sobrenadante de macrófagos estimulados *in vitro* com KC ou MIP-2 induziu significante migração de neutrófilos em camundongos naive. Além disso, significante concentração de IL-1 β , TNF α e LTB $_4$ foi verificada nestes sobrenadantes. Surpreendentemente, a administração de KC e MIP-2 em camundongos depletados de mastócitos residentes peritoneais induziu uma potencializada migração de neutrófilos quando comparada com os camundongos controle.

Em resumo, nossos resultados demonstram que a migração de neutrófilos observada no modelo de imunização e desafio com OVA é mediada pela interação entre MIP-2/CXCR2, induzindo a produção de MIP-1 α , que por sua vez, agindo via CCR1, induz a liberação sequencial de TNF α e LTB $_4$. Com relação a migração de neutrófilos induzida por MIP-2 e KC, os resultados sugerem que estas quimiocinas induzem recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos dependentemente de macrófagos residentes, e liberação de TNF α e LTB $_4$. Interessantemente, observamos também que mastócitos controlam negativamente a migração de neutrófilos induzida por estas quimiocinas.

SUMMARY

We have investigated the involvement of MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, KC and MIP-2, as well as the CC and CXC chemokine receptors on neutrophil migration in murine immune inflammation. The i.p. administration of OVA promoted dose and time-dependent neutrophil recruitment in immunized mice. The neutrophil migration induced by OVA was seemed to be accompanied by increased mRNA expression for MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, KC, MIP-2, CCR1 and CXCR2 in peritoneal cells harvested from OVA-challenged immunized mice, as well as MIP-1 α , RANTES, KC and MIP-2 but not MIP-1 β proteins in the peritoneal exudates. OVA-induced neutrophil migration response was muted in immunized MIP-1 α ^{-/-} mice and it was inhibited by α -MIP-2 treatment. However, the treatment with antibodies against RANTES, MIP-1 β or KC failed to inhibit OVA-induced neutrophil migration. MIP-1 α mediated neutrophil migration in immunized mice through induction of TNF α , and LTB₄ synthesis, since: these mediators were detected in the exudates harvested from OVA-challenged immunized WT but not MIP-1 α ^{-/-} mice; the administration of MIP-1 α induced a dose-dependent neutrophil migration, which was inhibited by treatment with an anti-TNF α antibody, in TNFR1 (p55^{-/-}) deficient mice, or by MK 886 (a 5-lipoxygenase inhibitor) treatment; and MIP-1 α failed to induce LTB₄ production in p55^{-/-} mice. MIP-1 α used CCR1 receptor to promote neutrophil recruitment since, in contrast to CCR5^{-/-} mice, OVA or MIP-1 α failed to induce neutrophil migration in CCR1^{-/-} mice.

To study the involvement of CXC chemokines in OVA-induced neutrophil migration, BALB/c naïve or immunized mice were pretreated with repertaxin (a novel CXCR2 antagonist). Our results shown that repertaxin treatment significantly inhibited the OVA and MIP-2-induced neutrophil migration. Indeed, as MIP-1 α -induced neutrophil recruitment, neutrophils migrate in response to MIP-2 by a mechanism dependent of TNF α and LTB₄ production, once the pretreatment of mice with α -TNF α or MK886 significantly inhibited the neutrophil migration induced by this chemokine. Since it was previously described that the release of TNF α and LTB₄ in OVA-induced neutrophil migration is dependent of MIP-1 α production, we tested the hypothesis that MIP-2 could also induce the release of MIP-1 α . Thus, we observed that MIP-2-induced neutrophil migration was abrogated in MIP-1 α ^{-/-} mice. Confirming this result, it was also blocked by the use of α -MIP-1 α . In addition, significant concentration of MIP-1 α , TNF α and LTB₄ was detected in the peritoneal exudates from MIP-2-injected mice and it was completely inhibited by α -MIP-1 α treatment.

In the second part of this study, we investigated the mechanisms involved in the MIP-2 and KC induced neutrophil recruitment to peritoneal cavities of mice. First, we observed that i.p. injection of MIP-2 or KC in BALB/c mice induced a dose- and time-dependent neutrophil migration into

peritoneal cavities. The results show that MIP-2 and KC induces neutrophil accumulation into peritoneal cavities dependently of TNF α and LTB $_4$, since the pretreatment of mice with α -TNF α or MK886 inhibited the MIP-2-induced neutrophil migration. The involvement of TNF α was confirmed by i.p. injection of MIP-2 or KC in p55 $^{-/-}$ mice, when both chemokines induced a sharp neutrophil migration into peritoneal cavities of these mice, compared to WT mice. Neutrophil migration induced by KC, but not MIP-2 was seemed to be dependent of IL-1, since the treatment with IL-1ra (IL-1 receptor antagonist) significantly inhibited the neutrophil recruitment induced by KC.

MIP-2 and KC-induced neutrophil migration was seem to be dependent of resident macrophages, since the increase of peritoneal macrophages by thioglycolate treatment, significantly enhanced the MIP-2 and KC-induced neutrophil migration. Confirming the dependence of peritoneal macrophages, i.p. injection of supernatant from MIP-2 or KC-stimulated macrophages in naïve mice induced a significant neutrophil migration. In addition, the results show that macrophages stimulated *in vitro* with MIP-2 or KC release significant amount of IL-1 β , TNF α and LTB $_4$. Strikingly, the i.p injection of MIP-2 or KC in peritoneal cavities depleted from mast cell with distilled water or 48/80 treatment significantly increased the neutrophil accumulation triggered by these chemokines.

In summary, we have demonstrated that neutrophil migration observed in the OVA-induced neutrophil migration is mediated by MIP-2/CXCR2 binding, inducing MIP-1 α production, which *via* CCR1 induces the sequential release of TNF α and LTB $_4$. Concerning to MIP-2 and KC-induce neutrophil migration, the results suggest that these chemokines induces neutrophil recruitment to peritoneal cavities dependently of resident macrophages, TNF α and LTB $_4$ release. Interestingly, we also observed that MIP-2 and KC-induced neutrophil migration is negatively controlled by peritoneal mast cells.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A. K. L. Maturation, Activation, and Regulation of Lymphocytes. In: (Ed.). Cellular and Molecular Immunology, 2003. Maturation, Activation, and Regulation of Lymphocytes., p.127-216
- Abe, T., K. Yoshida, *et al.* Effects of ZCR-2060 on allergic airway inflammation and cell activation in guinea-pigs. J Pharm Pharmacol, v.46, n.11, Nov, p.876-82. 1994.
- Adams, D. O. e T. A. Hamilton. Molecular transductional mechanisms by which IFN gamma and other signals regulate macrophage development. Immunol Rev, v.97, Jun, p.5-27. 1987.
- Aggarwal, B. B. e K. Natarajan. Tumor necrosis factors: developments during the last decade. Eur Cytokine Netw, v.7, n.2, Apr-Jun, p.93-124. 1996.
- Ahuja, S. K. e P. M. Murphy. The CXC chemokines growth-regulated oncogene (GRO) alpha, GRObeta, GROgamma, neutrophil-activating peptide-2, and epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78 are potent agonists for the type B, but not the type A, human interleukin-8 receptor. J Biol Chem, v.271, n.34, Aug 23, p.20545-50. 1996.
- Ajuebor, M. N., A. M. Das, *et al.* Role of resident peritoneal macrophages and mast cells in chemokine production and neutrophil migration in acute inflammation: evidence for an inhibitory loop involving endogenous IL-10. J Immunol, v.162, n.3, Feb 1, p.1685-91. 1999.
- Ajuebor, M. N., L. Virag, *et al.* Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of neutrophil migration in zymosan-induced inflammation. Immunology, v.95, n.4, Dec, p.625-30. 1998.
- Alam, R., P. A. Forsythe, *et al.* Interleukin-8 and RANTES inhibit basophil histamine release induced with monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant peptide-1 and histamine releasing factor. Am J Respir Cell Mol Biol, v.7, n.4, Oct, p.427-33. 1992a.
- _____. Macrophage inflammatory protein-1 alpha activates basophils and mast cells. J Exp Med, v.176, n.3, Sep 1, p.781-6. 1992b.
- Alam, R., D. Kumar, *et al.* Macrophage inflammatory protein-1 alpha and monocyte chemoattractant peptide-1 elicit immediate and late cutaneous reactions and activate murine mast cells in vivo. J Immunol, v.152, n.3, Feb 1, p.1298-303. 1994.
- Alencar, V. B., G. A. Brito, *et al.* Helianthus tuberosus agglutinin directly induces neutrophil migration, which can be modulated/inhibited by resident mast cells. Biochem Cell Biol, v.83, n.5, Oct, p.659-66. 2005.
- Andreaskos, E. Common and uncommon features of rheumatoid arthritis and chronic obstructive pulmonary disease: clues to a future therapy. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord, v.4, n.2, Jun, p.85-92. 2004.
- Ansel, K. M., R. B. Harris, *et al.* CXCL13 is required for B1 cell homing, natural antibody production, and body cavity immunity. Immunity, v.16, n.1, Jan, p.67-76. 2002.
- Aoki, Y., D. Qiu, *et al.* Leukotriene B4 mediates histamine induction of NF-kappaB and IL-8 in human bronchial epithelial cells. Am J Physiol, v.274, n.6 Pt 1, Jun, p.L1030-9. 1998.
- Appelberg, R. CD4+ T cells are required for antigen-specific recruitment of neutrophils by BCG-immune spleen cells. Immunology, v.75, n.3, Mar, p.414-9. 1992.
- Appelberg, R. e M. T. Silva. T cell-dependent chronic neutrophilia during mycobacterial infections. Clin Exp Immunol, v.78, n.3, Dec, p.478-83. 1989.
- Ashby, J., H. Tinwell, *et al.* Thalidomide: lack of mutagenic activity across phyla and genetic endpoints. Mutat Res, v.396, n.1-2, Dec 12, p.45-64. 1997.
- Aubertin, A. M., R. Le Grand, *et al.* Generation of CD8+ T cell-generated suppressor factor and beta-chemokines by targeted iliac lymph node immunization in rhesus monkeys challenged with SHIV-89.6P by the rectal route. AIDS Res Hum Retroviruses, v.16, n.4, Mar 1, p.381-92. 2000.

- Auphan, N., J. A. Didonato, *et al.* Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. Science, v.270, n.5234, Oct 13, p.286-90. 1995.
- Baggiolini, M., B. Dewald, *et al.* Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. Adv Immunol, v.55, p.97-179. 1994.
- Banick, P. D., Q. Chen, *et al.* Nitric oxide inhibits neutrophil beta 2 integrin function by inhibiting membrane-associated cyclic GMP synthesis. J Cell Physiol, v.172, n.1, Jul, p.12-24. 1997.
- Bellavite, P. The superoxide-forming enzymatic system of phagocytes. Free Radic Biol Med, v.4, n.4, p.225-61. 1988.
- Bellavite, P., F. Corso, *et al.* Activation of NADPH-dependent superoxide production in plasma membrane extracts of pig neutrophils by phosphatidic acid. J Biol Chem, v.263, n.17, Jun 15, p.8210-4. 1988.
- Belperio, J. A., M. P. Keane, *et al.* Role of CXCR2/CXCR2 ligands in vascular remodeling during bronchiolitis obliterans syndrome. J Clin Invest, v.115, n.5, May 2, p.1150-62. 2005.
- _____. Critical role for CXCR2 and CXCR2 ligands during the pathogenesis of ventilator-induced lung injury. J Clin Invest, v.110, n.11, Dec, p.1703-16. 2002.
- Berg, K. Identification, production, and characterization of murine monoclonal antibody (LO-22) recognizing 12 native species of human alpha interferon. J Interferon Res, v.4, n.4, Fall, p.481-91. 1984.
- Beutler, B., D. Greenwald, *et al.* Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. Nature, v.316, n.6028, Aug 8-14, p.552-4. 1985.
- Billiau, A. e P. Matthys. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. J Leukoc Biol, v.70, n.6, Dec, p.849-60. 2001.
- Bishop, G. A. e B. S. Hostager. B lymphocyte activation by contact-mediated interactions with T lymphocytes. Curr Opin Immunol, v.13, n.3, Jun, p.278-85. 2001.
- Black, R. A., C. T. Rauch, *et al.* A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. Nature, v.385, n.6618, Feb 20, p.729-33. 1997.
- Blease, K., B. Mehrad, *et al.* Enhanced pulmonary allergic responses to Aspergillus in CCR2-/- mice. J Immunol, v.165, n.5, Sep 1, p.2603-11. 2000.
- Bokoch, G. M. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. Blood, v.86, n.5, Sep 1, p.1649-60. 1995.
- Bombini, G., C. Canetti, *et al.* Tumour necrosis factor-alpha mediates neutrophil migration to the knee synovial cavity during immune inflammation. Eur J Pharmacol, v.496, n.1-3, Aug 2, p.197-204. 2004.
- Bonder, C. S., M. N. Ajuebor, *et al.* Essential role for neutrophil recruitment to the liver in concanavalin A-induced hepatitis. J Immunol, v.172, n.1, Jan 1, p.45-53. 2004.
- Borgeat, P. e B. Samuelsson. Transformation of arachidonic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes. Formation of a novel dihydroxyeicosatetraenoic acid. J Biol Chem, v.254, n.8, Apr 25, p.2643-6. 1979.
- Brain, S., R. Camp, *et al.* The release of leukotriene B4-like material in biologically active amounts from the lesional skin of patients with psoriasis. J Invest Dermatol, v.83, n.1, Jul, p.70-3. 1984.
- Brain, S. D., R. D. Camp, *et al.* Psoriasis and leukotriene B4. Lancet, v.2, n.8301, Oct 2, p.762-3. 1982.
- Brandtzaeg, P., G. Haraldsen, *et al.* Immunopathology of human inflammatory bowel disease. Springer Semin Immunopathol, v.18, n.4, p.555-89. 1997.

- Brennan, F. M., M. Field, *et al.* Cytokine expression in rheumatoid arthritis. Br J Rheumatol, v.30 Suppl 1, p.76-80. 1991.
- Burgos, R. A., M. A. Hidalgo, *et al.* Determination of specific receptor sites for platelet activating factor in bovine neutrophils. Am J Vet Res, v.65, n.5, May, p.628-36. 2004.
- Calderon, P., M. Anzilotti, *et al.* Thalidomide in dermatology. New indications for an old drug. Int J Dermatol, v.36, n.12, Dec, p.881-7. 1997.
- Campion, G. V., M. E. Lebsack, *et al.* Dose-range and dose-frequency study of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis. The IL-1Ra Arthritis Study Group. Arthritis Rheum, v.39, n.7, Jul, p.1092-101. 1996.
- Canetti, C., J. S. Silva, *et al.* Tumour necrosis factor-alpha and leukotriene B(4) mediate the neutrophil migration in immune inflammation. Br J Pharmacol, v.134, n.8, Dec, p.1619-28. 2001.
- Canetti, C. A., B. P. Leung, *et al.* IL-18 enhances collagen-induced arthritis by recruiting neutrophils via TNF-alpha and leukotriene B4. J Immunol, v.171, n.2, Jul 15, p.1009-15. 2003.
- Carolan, E. J., D. A. Mower, *et al.* Cytokine-induced neutrophil transepithelial migration is dependent upon epithelial orientation. Am J Respir Cell Mol Biol, v.17, n.6, Dec, p.727-32. 1997.
- Carreras, M. C., G. A. Pargament, *et al.* Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during the respiratory burst of human neutrophils. FEBS Lett, v.341, n.1, Mar 14, p.65-8. 1994.
- Carswell, E. A., L. J. Old, *et al.* An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proc Natl Acad Sci U S A, v.72, n.9, Sep, p.3666-70. 1975.
- Casale, T. B., R. A. Erger, *et al.* Platelet-activating factor-induced human eosinophil transendothelial migration: evidence for a dynamic role of the endothelium. Am J Respir Cell Mol Biol, v.8, n.1, Jan, p.77-82. 1993.
- Chaudhuri, A., J. Polyakova, *et al.* Cloning of glycoprotein D cDNA, which encodes the major subunit of the Duffy blood group system and the receptor for the Plasmodium vivax malaria parasite. Proc Natl Acad Sci U S A, v.90, n.22, Nov 15, p.10793-7. 1993.
- Cheng, S. S., J. J. Lai, *et al.* Granulocyte-macrophage colony stimulating factor up-regulates CCR1 in human neutrophils. J Immunol, v.166, n.2, Jan 15, p.1178-84. 2001.
- Cherwinski, H. M., J. H. Schumacher, *et al.* Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. J Exp Med, v.166, n.5, Nov 1, p.1229-44. 1987.
- Clark-Lewis, I., K. S. Kim, *et al.* Structure-activity relationships of chemokines. J Leukoc Biol, v.57, n.5, May, p.703-11. 1995.
- Clark-Lewis, I., C. Schumacher, *et al.* Structure-activity relationships of interleukin-8 determined using chemically synthesized analogs. Critical role of NH₂-terminal residues and evidence for uncoupling of neutrophil chemotaxis, exocytosis, and receptor binding activities. J Biol Chem, v.266, n.34, Dec 5, p.23128-34. 1991.
- Colotta, F., F. Re, *et al.* Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. Science, v.261, n.5120, Jul 23, p.472-5. 1993.
- Columbo, M., E. M. Horowitz, *et al.* Substance P activates the release of histamine from human skin mast cells through a pertussis toxin-sensitive and protein kinase C-dependent mechanism. Clin Immunol Immunopathol, v.81, n.1, Oct, p.68-73. 1996.
- Corral, L. G., P. A. Haslett, *et al.* Differential cytokine modulation and T cell activation by two distinct classes of thalidomide analogues that are potent inhibitors of TNF-alpha. J Immunol, v.163, n.1, Jul 1, p.380-6. 1999.

- Corral, L. G. e G. Kaplan. Immunomodulation by thalidomide and thalidomide analogues. Ann Rheum Dis, v.58 Suppl 1, Nov, p.I107-13. 1999.
- Crooks, S. W. e R. A. Stockley. Leukotriene B4. Int J Biochem Cell Biol, v.30, n.2, Feb, p.173-8. 1998.
- Cui, J., L. Sofer, *et al.* Patterns of gene expression in the developing chick thymus. Dev Dyn, v.229, n.3, Mar, p.480-8. 2004.
- Cunha, F. Q. e S. H. Ferreira. The release of a neutrophil chemotactic factor from peritoneal macrophages by endotoxin: inhibition by glucocorticoids. Eur J Pharmacol, v.129, n.1-2, Sep 23, p.65-76. 1986.
- Cunnane, G., A. Madigan, *et al.* The effects of treatment with interleukin-1 receptor antagonist on the inflamed synovial membrane in rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford), v.40, n.1, Jan, p.62-9. 2001.
- Cuzzocrea, S., E. Ayroldi, *et al.* Role of glucocorticoid-induced TNF receptor family gene (GITR) in collagen-induced arthritis. Faseb J, v.19, n.10, Aug, p.1253-65. 2005a.
- Cuzzocrea, S., A. Rossi, *et al.* 5-Lipoxygenase modulates colitis through the regulation of adhesion molecule expression and neutrophil migration. Lab Invest, v.85, n.6, Jun, p.808-22. 2005b.
- Czock, D., F. Keller, *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. Clin Pharmacokinet, v.44, n.1, p.61-98. 2005.
- Czuprynski, C. J. e J. F. Brown. Dual regulation of anti-bacterial resistance and inflammatory neutrophil and macrophage accumulation by L3T4+ and Lyt 2+ Listeria-immune T cells. Immunology, v.60, n.2, Feb, p.287-93. 1987.
- Da Rocha, F. A., M. M. Teixeira, *et al.* Blockade of leukotriene B4 prevents articular incapacitation in rat zymosan-induced arthritis. Eur J Pharmacol, v.497, n.1, Aug 16, p.81-6. 2004.
- Dale, M. The neutrophil leukocyte: Blackwell Scientific Publications. 1984. 36-52 p. (Textbook of Immunopharmacology)
- Das, A. M., M. N. Ajuebor, *et al.* Contrasting roles for RANTES and macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 alpha) in a murine model of allergic peritonitis. Clin Exp Immunol, v.117, n.2, Aug, p.223-9. 1999.
- Davidson, E. M., S. A. Rae, *et al.* Leukotriene B4 in synovial fluid. J Pharm Pharmacol, v.34, n.6, Jun, p.410. 1982.
- De Souza, G. E. e S. H. Ferreira. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. Agents Actions, v.17, n.1, Oct, p.97-103. 1985.
- Dean, M., M. Carrington, *et al.* Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. Science, v.273, n.5283, Sep 27, p.1856-62. 1996.
- Deem, R. L., F. Shanahan, *et al.* Triggered human mucosal T cells release tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma which kill human colonic epithelial cells. Clin Exp Immunol, v.83, n.1, Jan, p.79-84. 1991.
- Deleuran, B., L. Iversen, *et al.* Interleukin-8 secretion and 15-lipoxygenase activity in rheumatoid arthritis: in vitro anti-inflammatory effects by interleukin-4 and interleukin-10, but not by interleukin-1 receptor antagonist protein. Br J Rheumatol, v.33, n.6, Jun, p.520-5. 1994.
- Den Broeder, A. A., G. J. Wanten, *et al.* Neutrophil migration and production of reactive oxygen species during treatment with a fully human anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody in patients with rheumatoid arthritis. J Rheumatol, v.30, n.2, Feb, p.232-7. 2003.
- Desouza, I. A., S. Hyslop, *et al.* Mouse macrophages release a neutrophil chemotactic mediator following stimulation by staphylococcal enterotoxin type A. Inflamm Res, v.50, n.4, Apr, p.206-12. 2001.

_____. Evidence for the involvement of a macrophage-derived chemotactic mediator in the neutrophil recruitment induced by staphylococcal enterotoxin B in mice. Toxicol, v.40, n.12, Dec, p.1709-17. 2002.

Devchand, P. R., H. Keller, *et al.* The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. Nature, v.384, n.6604, Nov 7, p.39-43. 1996.

Di Rosa, M., J. P. Giroud, *et al.* Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. J Pathol, v.104, n.1, May, p.15-29. 1971.

Dripps, D. J., B. J. Brandhuber, *et al.* Interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist binds to the 80-kDa IL-1 receptor but does not initiate IL-1 signal transduction. J Biol Chem, v.266, n.16, Jun 5, p.10331-6. 1991.

Driscoll, K. E., D. G. Hassenbein, *et al.* Cloning, expression, and functional characterization of rat MIP-2: a neutrophil chemoattractant and epithelial cell mitogen. J Leukoc Biol, v.58, n.3, Sep, p.359-64. 1995a.

Driscoll, K. E., J. K. Maurer, *et al.* Alveolar macrophage cytokine and growth factor production in a rat model of crocidolite-induced pulmonary inflammation and fibrosis. J Toxicol Environ Health, v.46, n.2, Oct, p.155-69. 1995b.

Duan, R. S., Z. Chen, *et al.* CCR5 deficiency does not prevent P0 peptide 180-199 immunized mice from experimental autoimmune neuritis. Neurobiol Dis, v.16, n.3, Aug, p.630-7. 2004.

Dubois, C. M., F. W. Ruscetti, *et al.* In vivo interleukin-1 (IL-1) administration indirectly promotes type II IL-1 receptor expression on hematopoietic bone marrow cells: novel mechanism for the hematopoietic effects of IL-1. Blood, v.78, n.11, Dec 1, p.2841-7. 1991.

Echtenacher, B., D. N. Mannel, *et al.* Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. Nature, v.381, n.6577, May 2, p.75-7. 1996.

Edwards, S. W. e M. B. Hallett. Seeing the wood for the trees: the forgotten role of neutrophils in rheumatoid arthritis. Immunol Today, v.18, n.7, Jul, p.320-4. 1997.

Elsner, J., R. Hochstetter, *et al.* Human eotaxin represents a potent activator of the respiratory burst of human eosinophils. Eur J Immunol, v.26, n.8, Aug, p.1919-25. 1996.

Elsner, J., H. Petering, *et al.* Eotaxin-2 activates chemotaxis-related events and release of reactive oxygen species via pertussis toxin-sensitive G proteins in human eosinophils. Eur J Immunol, v.28, n.7, Jul, p.2152-8. 1998.

Engeman, T., A. V. Gorbachev, *et al.* The intensity of neutrophil infiltration controls the number of antigen-primed CD8 T cells recruited into cutaneous antigen challenge sites. J Leukoc Biol, v.76, n.5, Nov, p.941-9. 2004.

Faccioli, L. H., G. E. Souza, *et al.* Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration "in vivo" by indirect mechanisms. Agents Actions, v.30, n.3-4, Jun, p.344-9. 1990.

Feldmann, M., F. Brennan, *et al.* Analysis of cytokine expression in rheumatoid synovium has provided new insights into the pathogenesis of rheumatoid arthritis and new therapeutic opportunities. Transplant Proc, v.33, n.3, May, p.2085-6. 2001.

Feniger-Barish, R., I. Yron, *et al.* IL-8-induced migratory responses through CXCR1 and CXCR2: association with phosphorylation and cellular redistribution of focal adhesion kinase. Biochemistry, v.42, n.10, Mar 18, p.2874-86. 2003.

Fernandes, E. S., G. F. Passos, *et al.* Cytokines and neutrophils as important mediators of platelet-activating factor-induced kinin B1 receptor expression. Br J Pharmacol, v.146, n.2, Sep, p.209-16. 2005.

Ferreira, S. Are the macrophages the body's alarm cells? Agents Actions, v.10, p.229. 1980.

- Ferretti, S., O. Bonneau, *et al.* IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. J Immunol, v.170, n.4, Feb 15, p.2106-12. 2003.
- Fierro, I. M., C. Barja-Fidalgo, *et al.* The involvement of nitric oxide in the anti-Candida albicans activity of rat neutrophils. Immunology, v.89, n.2, Oct, p.295-300. 1996.
- Fierro, I. M., V. Nascimento-Dasilva, *et al.* Induction of NOS in rat blood PMN in vivo and in vitro: modulation by tyrosine kinase and involvement in bactericidal activity. J Leukoc Biol, v.65, n.4, Apr, p.508-14. 1999.
- Figarella-Branger, D., M. Civatte, *et al.* Cytokines, chemokines, and cell adhesion molecules in inflammatory myopathies. Muscle Nerve, v.28, n.6, Dec, p.659-82. 2003.
- Fink, M. P., B. P. O'sullivan, *et al.* A novel leukotriene B4-receptor antagonist in endotoxin shock: a prospective, controlled trial in a porcine model. Crit Care Med, v.21, n.12, Dec, p.1825-37. 1993.
- Fisher, C. J., Jr., G. J. Slotman, *et al.* Initial evaluation of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of sepsis syndrome: a randomized, open-label, placebo-controlled multicenter trial. Crit Care Med, v.22, n.1, Jan, p.12-21. 1994.
- Fleischmann, R. e D. Shealy. Developing a new generation of TNFalpha antagonists for the treatment of rheumatoid arthritis. Mol Intery, v.3, n.6, Sep, p.310-8. 2003.
- Fokkema, S. J., B. G. Loos, *et al.* Monocyte-derived RANTES is intrinsically elevated in periodontal disease while MCP-1 levels are related to inflammation and are inversely correlated with IL-12 levels. Clin Exp Immunol, v.131, n.3, Mar, p.477-83. 2003.
- Fong, T. A. e T. R. Mosmann. Alloreactive murine CD8+ T cell clones secrete the Th1 pattern of cytokines. J Immunol, v.144, n.5, Mar 1, p.1744-52. 1990.
- Ford-Hutchinson, A. W. Leukotrienes: their formation and role as inflammatory mediators. Fed Proc, v.44, n.1 Pt 1, Jan, p.25-9. 1985.
- Ford-Hutchinson, A. W., M. A. Bray, *et al.* Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. Nature, v.286, n.5770, Jul 17, p.264-5. 1980.
- Fowler, A. A., 3rd, B. J. Fisher, *et al.* Nitric oxide regulates interleukin-8 gene expression in activated endothelium by inhibiting NF-kappaB binding to DNA: effects on endothelial function. Biochem Cell Biol, v.77, n.3, p.201-8. 1999.
- Fuhler, G. M., G. J. Knol, *et al.* Impaired interleukin-8- and GROalpha-induced phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase result in decreased migration of neutrophils from patients with myelodysplasia. J Leukoc Biol, v.77, n.2, Feb, p.257-66. 2005.
- Furie, M. B. e G. J. Randolph. Chemokines and tissue injury. Am J Pathol, v.146, n.6, Jun, p.1287-301. 1995.
- Gadaleta, D. e J. M. Davis. Pulmonary failure and the production of leukotrienes. J Am Coll Surg, v.178, n.3, Mar, p.309-19. 1994.
- Gale, L. M. e S. R. Mccoll. Chemokines: extracellular messengers for all occasions? Bioessays, v.21, n.1, Jan, p.17-28. 1999.
- Galkina, S. I., E. V. Dormeneva, *et al.* Endothelium-leukocyte interactions under the influence of the superoxide-nitrogen monoxide system. Med Sci Monit, v.10, n.9, Sep, p.BR307-16. 2004.
- Galli, S. J. Complexity and redundancy in the pathogenesis of asthma: reassessing the roles of mast cells and T cells. J Exp Med, v.186, n.3, Aug 4, p.343-7. 1997.
- Gallin, J. Fundamental Immunology. In: W. E. Paul (Ed.). Inflammation. New York: Raven Press Ltd, 1993. Fundamental Immunology, p.1015-32

- Gambero, A., S. M. Thomazzi, *et al.* Signalling pathways regulating human neutrophil migration induced by secretory phospholipases A2. Toxicon, v.44, n.5, Oct, p.473-81. 2004.
- Gambineri, E., T. R. Torgerson, *et al.* Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. Curr Opin Rheumatol, v.15, n.4, Jul, p.430-5. 2003.
- Gao, J. L., D. B. Kuhns, *et al.* Structure and functional expression of the human macrophage inflammatory protein 1 alpha/RANTES receptor. J Exp Med, v.177, n.5, May 1, p.1421-7. 1993.
- Garcia-Vicuna, R., M. V. Gomez-Gavero, *et al.* CC and CXC chemokine receptors mediate migration, proliferation, and matrix metalloproteinase production by fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients. Arthritis Rheum, v.50, n.12, Dec, p.3866-77. 2004.
- Gaudreault, E., J. Stankova, *et al.* Involvement of leukotriene B4 receptor 1 signaling in platelet-activating factor-mediated neutrophil degranulation and chemotaxis. Prostaglandins Other Lipid Mediat, v.75, n.1-4, Jan, p.25-34. 2005.
- Genant, H. K. Interleukin-1 receptor antagonist treatment of rheumatoid arthritis patients: radiologic progression and correlation of Genant/Sharp and Larsen scoring methods. Semin Arthritis Rheum, v.30, n.5 Suppl 2, Apr, p.26-32. 2001.
- Gerard, C. e B. J. Rollins. Chemokines and disease. Nat Immunol, v.2, n.2, Feb, p.108-15. 2001.
- Germann, T., J. Szeliga, *et al.* Administration of interleukin 12 in combination with type II collagen induces severe arthritis in DBA/1 mice. Proc Natl Acad Sci U S A, v.92, n.11, May 23, p.4823-7. 1995.
- Gillard, J., A. W. Ford-Hutchinson, *et al.* L-663,536 (MK-886) (3-[1-(4-chlorobenzyl)-3-t-butyl-thio-5-isopropylindol-2-yl]-2,2 - dimethylpropanoic acid), a novel, orally active leukotriene biosynthesis inhibitor. Can J Physiol Pharmacol, v.67, n.5, May, p.456-64. 1989.
- Giri, J. G., R. Robb, *et al.* HepG2 cells predominantly express the type II interleukin 1 receptor (biochemical and molecular characterization of the IL-1 receptor). Cytokine, v.4, n.1, Jan, p.18-23. 1992.
- Girolomoni, G., S. Pastore, *et al.* Targeting tumor necrosis factor-alpha as a potential therapy in inflammatory skin diseases. Curr Opin Investig Drugs, v.3, n.11, Nov, p.1590-5. 2002.
- Godau, J., T. Heller, *et al.* C5a initiates the inflammatory cascade in immune complex peritonitis. J Immunol, v.173, n.5, Sep 1, p.3437-45. 2004.
- Goedkoop, A. Y., M. C. Kraan, *et al.* Early effects of tumour necrosis factor alpha blockade on skin and synovial tissue in patients with active psoriasis and psoriatic arthritis. Ann Rheum Dis, v.63, n.7, Jul, p.769-73. 2004.
- Goldman, D. W., L. A. Gifford, *et al.* Molecular and cellular properties of human polymorphonuclear leukocyte receptors for leukotriene B4. Fed Proc, v.46, n.1, Jan, p.200-3. 1987.
- Gonzalez, A., J. H. Sahaza, *et al.* Production of pro-inflammatory cytokines during the early stages of experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. Med Mycol, v.41, n.5, Oct, p.391-9. 2003.
- Graninger, W. e J. Smolen. Treatment of rheumatoid arthritis by TNF-blocking agents. Int Arch Allergy Immunol, v.127, n.1, Jan, p.10-4. 2002.
- Greenberger, M. J., R. M. Strieter, *et al.* Neutralization of macrophage inflammatory protein-2 attenuates neutrophil recruitment and bacterial clearance in murine *Klebsiella pneumoniae*. J Infect Dis, v.173, n.1, Jan, p.159-65. 1996.
- Grob, M., P. Schmid-Grendelmeier, *et al.* Altered intracellular expression of the chemokines MIP-1alpha, MIP-1beta and IL-8 by peripheral blood CD4+ and CD8+ T cells in mild allergic asthma. Allergy, v.58, n.3, Mar, p.239-45. 2003.

- Grusby, M. J. e L. H. Glimcher. Immune responses in MHC class II-deficient mice. Ann Rev Immunol, v.13, p.417-35. 1995.
- Gubler, U., A. O. Chua, *et al.* Recombinant human interleukin 1 alpha: purification and biological characterization. J Immunol, v.136, n.7, Apr 1, p.2492-7. 1986.
- Hachicha, M., P. H. Naccache, *et al.* Inflammatory microcrystals differentially regulate the secretion of macrophage inflammatory protein 1 and interleukin 8 by human neutrophils: a possible mechanism of neutrophil recruitment to sites of inflammation in synovitis. J Exp Med, v.182, n.6, Dec 1, p.2019-25. 1995.
- Hachicha, M., P. Rathanaswami, *et al.* Production of monocyte chemotactic protein-1 in human type B synoviocytes. Synergistic effect of tumor necrosis factor alpha and interferon-gamma. Arthritis Rheum, v.36, n.1, Jan, p.26-34. 1993.
- Hadley, T. J. e S. C. Peiper. From malaria to chemokine receptor: the emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen. Blood, v.89, n.9, May 1, p.3077-91. 1997.
- Hales, B. F. Thalidomide on the comeback trail. Nat Med, v.5, n.5, May, p.489-90. 1999.
- Hansen, P. R. Role of neutrophils in myocardial ischemia and reperfusion. Circulation, v.91, n.6, Mar 15, p.1872-85. 1995.
- Hardy, R. R. e K. Hayakawa. B cell development pathways. Ann Rev Immunol, v.19, p.595-621. 2001.
- Harnett, M. M., E. Katz, *et al.* Differential signalling during B-cell maturation. Immunol Lett, v.98, n.1, Apr 15, p.33-44. 2005.
- Hebert, C. A., R. V. Vitangcol, *et al.* Scanning mutagenesis of interleukin-8 identifies a cluster of residues required for receptor binding. J Biol Chem, v.266, n.28, Oct 5, p.18989-94. 1991.
- Hebert, M. J., T. Takano, *et al.* Sequential morphologic events during apoptosis of human neutrophils. Modulation by lipoxygenase-derived eicosanoids. J Immunol, v.157, n.7, Oct 1, p.3105-15. 1996.
- Heit, B., P. Colarusso, *et al.* Fundamentally different roles for LFA-1, Mac-1 and {alpha}4-integrin in neutrophil chemotaxis. J Cell Sci, Oct 25. 2005.
- Heller, T., M. Hennecke, *et al.* Selection of a C5a receptor antagonist from phage libraries attenuating the inflammatory response in immune complex disease and ischemia/reperfusion injury. J Immunol, v.163, n.2, Jul 15, p.985-94. 1999.
- Hensley, K., J. Fedynyshyn, *et al.* Message and protein-level elevation of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and TNF alpha-modulating cytokines in spinal cords of the G93A-SOD1 mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. Neurobiol Dis, v.14, n.1, Oct, p.74-80. 2003.
- Herlin, T., K. Fogh, *et al.* Changes in lipoxygenase products from synovial fluid in carrageenan induced arthritis in dogs. Apmis, v.96, n.7, Jul, p.601-4. 1988.
- Hogarth, P. M. Fc receptors are major mediators of antibody based inflammation in autoimmunity. Curr Opin Immunol, v.14, n.6, Dec, p.798-802. 2002.
- Holmes, W. E., J. Lee, *et al.* Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. Science, v.253, n.5025, Sep 13, p.1278-80. 1991.
- Horuk, R., C. E. Chitnis, *et al.* A receptor for the malarial parasite Plasmodium vivax: the erythrocyte chemokine receptor. Science, v.261, n.5125, Aug 27, p.1182-4. 1993.
- Hosaka, S., T. Akahoshi, *et al.* Expression of the chemokine superfamily in rheumatoid arthritis. Clin Exp Immunol, v.97, n.3, Sep, p.451-7. 1994.

- Huang, J. J., R. C. Newton, *et al.* Characterization of murine IL-1 beta. Isolation, expression, and purification. J Immunol, v.140, n.11, Jun 1, p.3838-43. 1988.
- Huss, R. e H. J. Deeg. Intrathymic maturation of CD4+ T-lymphocytes in an MHC class II deficient transplant model. Tissue Antigens, v.49, n.1, Jan, p.70-3. 1997.
- Huttenlocher, A., R. R. Sandborg, *et al.* Adhesion in cell migration. Curr Opin Cell Biol, v.7, n.5, Oct, p.697-706. 1995.
- Ichiyama, H., S. Onodera, *et al.* Inhibition of joint inflammation and destruction induced by anti-type II collagen antibody/lipopolysaccharide (LPS)-induced arthritis in mice due to deletion of macrophage migration inhibitory factor (MIF). Cytokine, v.26, n.5, Jun 7, p.187-94. 2004.
- Introna, M., R. C. Bast, Jr., *et al.* The effect of LPS on expression of the early "competence" genes JE and KC in murine peritoneal macrophages. J Immunol, v.138, n.11, Jun 1, p.3891-6. 1987.
- Issekutz, A. C., S. Nakazato, *et al.* Differential roles of VLA-4(CD49d/CD29) and LFA-1(CD11a/CD18) integrins and E- and P-selectin during developing and established active or adoptively transferred adjuvant arthritis in the rat. Immunol Cell Biol, v.81, n.5, Oct, p.397-408. 2003.
- Izzo, A. A. PAF and the digestive tract. A review. J Pharm Pharmacol, v.48, n.11, Nov, p.1103-11. 1996.
- Ji, J., J. Sun, *et al.* Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. Infect Immun, v.71, n.8, Aug, p.4278-88. 2003.
- Jones, S. A., M. Wolf, *et al.* Different functions for the interleukin 8 receptors (IL-8R) of human neutrophil leukocytes: NADPH oxidase and phospholipase D are activated through IL-8R1 but not IL-8R2. Proc Natl Acad Sci U S A, v.93, n.13, Jun 25, p.6682-6. 1996.
- Joosten, L. A., M. M. Helsen, *et al.* Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. A comparative study using anti-TNF alpha, anti-IL-1 alpha/beta, and IL-1Ra. Arthritis Rheum, v.39, n.5, May, p.797-809. 1996.
- Kagari, T., H. Doi, *et al.* The importance of IL-1 beta and TNF-alpha, and the noninvolvement of IL-6, in the development of monoclonal antibody-induced arthritis. J Immunol, v.169, n.3, Aug 1, p.1459-66. 2002.
- Kantor, A. B. e L. A. Herzenberg. Origin of murine B cell lineages. Annu Rev Immunol, v.11, p.501-38. 1993.
- Kaplan, A. P. Chemokines, chemokine receptors and allergy. Int Arch Allergy Immunol, v.124, n.4, Apr, p.423-31. 2001.
- Kapp, A., G. Zeck-Kapp, *et al.* The chemokine RANTES is more than a chemoattractant: characterization of its effect on human eosinophil oxidative metabolism and morphology in comparison with IL-5 and GM-CSF. J Invest Dermatol, v.102, n.6, Jun, p.906-14. 1994.
- Kasama, T., Y. Miwa, *et al.* Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, v.4, n.3, Jun, p.273-9. 2005.
- Kasama, T., R. M. Strieter, *et al.* Interleukin-10 expression and chemokine regulation during the evolution of murine type II collagen-induced arthritis. J Clin Invest, v.95, n.6, Jun, p.2868-76. 1995.
- _____. Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 alpha. J Exp Med, v.178, n.1, Jul 1, p.63-72. 1993.
- Katrib, A., M. D. Smith, *et al.* Reduced chemokine and matrix metalloproteinase expression in patients with rheumatoid arthritis achieving remission. J Rheumatol, v.30, n.1, Jan, p.10-21. 2003.
- Kawakami, M. e A. Cerami. Studies of endotoxin-induced decrease in lipoprotein lipase activity. J Exp Med, v.154, n.3, Sep 1, p.631-9. 1981.

- Kelso, A. e A. L. Glasebrook. Secretion of interleukin 2, macrophage-activating factor, interferon, and colony-stimulating factor by alloreactive T lymphocyte clones. J Immunol, v.132, n.6, Jun, p.2924-31. 1984.
- Kennedy, M. K., K. S. Picha, *et al.* CD40/CD40 ligand interactions are required for T cell-dependent production of interleukin-12 by mouse macrophages. Eur J Immunol, v.26, n.2, Feb, p.370-8. 1996.
- Khan, I. A., P. M. Murphy, *et al.* Mice lacking the chemokine receptor CCR1 show increased susceptibility to *Toxoplasma gondii* infection. J Immunol, v.166, n.3, Feb 1, p.1930-7. 2001.
- Khreiss, T., L. Jozsef, *et al.* Activation of extracellular signal-regulated kinase couples platelet-activating factor-induced adhesion and delayed apoptosis of human neutrophils. Cell Signal, v.16, n.7, Jul, p.801-10. 2004.
- Kiehl, M. G., H. Ostermann, *et al.* Inflammatory mediators in bronchoalveolar lavage fluid and plasma in leukocytopenic patients with septic shock-induced acute respiratory distress syndrome. Crit Care Med, v.26, n.7, Jul, p.1194-9. 1998.
- Kim, J. J., L. K. Nottingham, *et al.* CD8 positive T cells influence antigen-specific immune responses through the expression of chemokines. J Clin Invest, v.102, n.6, Sep 15, p.1112-24. 1998.
- Kim, S. H., E. R. Lechman, *et al.* Ex vivo gene delivery of IL-1Ra and soluble TNF receptor confers a distal synergistic therapeutic effect in antigen-induced arthritis. Mol Ther, v.6, n.5, Nov, p.591-600. 2002.
- Klein, A., F. Q. Cunha, *et al.* The role of lymphocytes in the neutrophil migration induced by ovalbumin in immunized rats. Immunology, v.84, n.4, Apr, p.577-84. 1995.
- Knott, P. G., P. R. Gater, *et al.* Rapid up-regulation of CXC chemokines in the airways after Ag-specific CD4+ T cell activation. J Immunol, v.166, n.2, Jan 15, p.1233-40. 2001.
- Knudsen, E., H. B. Benestad, *et al.* Macrophages in spleen and liver direct the migration pattern of rat neutrophils during inflammation. Eur J Haematol, v.73, n.2, Aug, p.109-22. 2004.
- Koch, A. E., S. L. Kunkel, *et al.* Synovial tissue macrophage as a source of the chemotactic cytokine IL-8. J Immunol, v.147, n.7, Oct 1, p.2187-95. 1991.
- _____. Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. J Clin Invest, v.90, n.3, Sep, p.772-9. 1992.
- _____. Epithelial neutrophil activating peptide-78: a novel chemotactic cytokine for neutrophils in arthritis. J Clin Invest, v.94, n.3, Sep, p.1012-8. 1994.
- Koller, B. H., P. Marrack, *et al.* Normal development of mice deficient in beta 2M, MHC class I proteins, and CD8+ T cells. Science, v.248, n.4960, Jun 8, p.1227-30. 1990.
- Kosonen, O., H. Kankaanranta, *et al.* Nitric oxide-releasing compounds inhibit neutrophil adhesion to endothelial cells. Eur J Pharmacol, v.382, n.2, Oct 8, p.111-7. 1999.
- Kristjansson, G., P. Venge, *et al.* Clinical and subclinical intestinal inflammation assessed by the mucosal patch technique: studies of mucosal neutrophil and eosinophil activation in inflammatory bowel diseases and irritable bowel syndrome. Gut, v.53, n.12, Dec, p.1806-12. 2004.
- Kroese, F. G., W. A. Ammerlaan, *et al.* Location and function of B-cell lineages. Ann N Y Acad Sci, v.651, May 4, p.44-58. 1992.
- Kuijpers, T. W., B. C. Hakkert, *et al.* Neutrophil migration across monolayers of cytokine-prestimulated endothelial cells: a role for platelet-activating factor and IL-8. J Cell Biol, v.117, n.3, May, p.565-72. 1992.
- Kuijpers, T. W., J. M. Van Den Berg, *et al.* The impact of platelet-activating factor (PAF)-like mediators on the functional activity of neutrophils: anti-inflammatory effects of human PAF-acetylhydrolase. Clin Exp Immunol, v.123, n.3, Mar, p.412-20. 2001.

- Laing, K. J. e C. J. Secombes. Chemokines. Dev Comp Immunol, v.28, n.5, May 3, p.443-60. 2004.
- Lapham, C. K., J. Ouyang, *et al.* Evidence for cell-surface association between fusin and the CD4-gp120 complex in human cell lines. Science, v.274, n.5287, Oct 25, p.602-5. 1996.
- Lee, B., M. Sharron, *et al.* Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A, v.96, n.9, Apr 27, p.5215-20. 1999.
- Lee, J., R. Horuk, *et al.* Characterization of two high affinity human interleukin-8 receptors. J Biol Chem, v.267, n.23, Aug 15, p.16283-7. 1992.
- Lehrer, R. I., T. Ganz, *et al.* Neutrophils and host defense. Ann Intern Med, v.109, n.2, Jul 15, p.127-42. 1988.
- Ley, K. Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. Immunol Rev, v.186, Aug, p.8-18. 2002.
- Lin, F., C. M. Nguyen, *et al.* Neutrophil migration in opposing chemoattractant gradients using microfluidic chemotaxis devices. Ann Biomed Eng, v.33, n.4, Apr, p.475-82. 2005.
- Lin, Q., S. E. Ruuska, *et al.* Ligand selectivity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. Biochemistry, v.38, n.1, Jan 5, p.185-90. 1999.
- Lin, T. J., R. Garduno, *et al.* Pseudomonas aeruginosa activates human mast cells to induce neutrophil transendothelial migration via mast cell-derived IL-1 alpha and beta. J Immunol, v.169, n.8, Oct 15, p.4522-30. 2002.
- Liu, R., W. A. Paxton, *et al.* Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. Cell, v.86, n.3, Aug 9, p.367-77. 1996.
- Locati, M. e P. M. Murphy. Chemokines and chemokine receptors: biology and clinical relevance in inflammation and AIDS. Annu Rev Med, v.50, p.425-40. 1999.
- Lodi, P. J., D. S. Garrett, *et al.* High-resolution solution structure of the beta chemokine hMIP-1 beta by multidimensional NMR. Science, v.263, n.5154, Mar 25, p.1762-7. 1994.
- Luster, A. D. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. N Engl J Med, v.338, n.7, Feb 12, p.436-45. 1998.
- Mack, M., J. Cihak, *et al.* Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice. J Immunol, v.166, n.7, Apr 1, p.4697-704. 2001.
- Malaviya, R., T. Ikeda, *et al.* Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. Nature, v.381, n.6577, May 2, p.77-80. 1996.
- Malech, H. L. e J. I. Gallin. Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases. N Engl J Med, v.317, n.11, Sep 10, p.687-94. 1987.
- Mancini, J. A., M. Abramovitz, *et al.* 5-lipoxygenase-activating protein is an arachidonate binding protein. FEBS Lett, v.318, n.3, Mar 8, p.277-81. 1993.
- Martin, M., R. Brigelius-Flohe, *et al.* Signal transduction by the IL-1 type I receptor: evidence for the involvement of a receptor-coupled protein kinase. Behring Inst Mitt, n.96, Jun, p.32-44. 1995.
- Matheis, G., M. P. Sherman, *et al.* Role of L-arginine-nitric oxide pathway in myocardial reoxygenation injury. Am J Physiol, v.262, n.2 Pt 2, Feb, p.H616-20. 1992.
- Mathiak, G., D. Szewczyk, *et al.* Platelet-activating factor (PAF) in experimental and clinical sepsis. Shock, v.7, n.6, Jun, p.391-404. 1997.

- Matsukawa, A., T. Yoshimura, *et al.* Analysis of the cytokine network among tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta, interleukin-8, and interleukin-1 receptor antagonist in monosodium urate crystal-induced rabbit arthritis. Lab Invest, v.78, n.5, May, p.559-69. 1998.
- Maus, U., J. Huwe, *et al.* Alveolar JE/MCP-1 and endotoxin synergize to provoke lung cytokine upregulation, sequential neutrophil and monocyte influx, and vascular leakage in mice. Am J Respir Crit Care Med, v.164, n.3, Aug 1, p.406-11. 2001.
- Maus, U., K. Von Grote, *et al.* The role of CC chemokine receptor 2 in alveolar monocyte and neutrophil immigration in intact mice. Am J Respir Crit Care Med, v.166, n.3, Aug 1, p.268-73. 2002.
- Maus, U. A., K. Waelsch, *et al.* Monocytes are potent facilitators of alveolar neutrophil emigration during lung inflammation: role of the CCL2-CCR2 axis. J Immunol, v.170, n.6, Mar 15, p.3273-8. 2003.
- Medyer, J. F., T. J. Goletz, *et al.* CD40 ligand/CD40 stimulation regulates the production of IFN-gamma from human peripheral blood mononuclear cells in an IL-12- and/or CD28-dependent manner. J Immunol, v.160, n.4, Feb 15, p.1701-7. 1998.
- Mchugh, R. S. e E. M. Shevach. The role of suppressor T cells in regulation of immune responses. J Allergy Clin Immunol, v.110, n.5, Nov, p.693-702. 2002.
- Mease, P. TNFalpha therapy in psoriatic arthritis and psoriasis. Ann Rheum Dis, v.63, n.7, Jul, p.755-8. 2004.
- Mehrad, B., R. M. Strieter, *et al.* CXC chemokine receptor-2 ligands are necessary components of neutrophil-mediated host defense in invasive pulmonary aspergillosis. J Immunol, v.163, n.11, Dec 1, p.6086-94. 1999.
- Mekori, Y. A. e D. D. Metcalfe. Mast cells in innate immunity. Immunol Rev, v.173, Feb, p.131-40. 2000.
- Mendonca, V. O., I. Vugman, *et al.* Maturation of adult rat peritoneal and mesenteric mast cells. A morphological and histofluorescence study. Cell Tissue Res, v.243, n.3, p.635-9. 1986.
- Mercurio, F. e A. M. Manning. Multiple signals converging on NF-kappaB. Curr Opin Cell Biol, v.11, n.2, Apr, p.226-32. 1999.
- Metzger, W. J., H. B. Richerson, *et al.* Bronchoalveolar lavage of allergic asthmatic patients following allergen bronchoprovocation. Chest, v.89, n.4, Apr, p.477-83. 1986.
- Meurer, R., G. Van Riper, *et al.* Formation of eosinophilic and monocytic intradermal inflammatory sites in the dog by injection of human RANTES but not human monocyte chemoattractant protein 1, human macrophage inflammatory protein 1 alpha, or human interleukin 8. J Exp Med, v.178, n.6, Dec 1, p.1913-21. 1993.
- Michail, S. e F. Abernathy. A new model for studying eosinophil migration across cultured intestinal epithelial monolayers. J Pediatr Gastroenterol Nutr, v.39, n.1, Jul, p.56-63. 2004.
- Min, D. J., M. L. Cho, *et al.* Augmented production of chemokines by the interaction of type II collagen-reactive T cells with rheumatoid synovial fibroblasts. Arthritis Rheum, v.50, n.4, Apr, p.1146-55. 2004.
- Miura, M., X. Fu, *et al.* Neutralization of Gro alpha and macrophage inflammatory protein-2 attenuates renal ischemia/reperfusion injury. Am J Pathol, v.159, n.6, Dec, p.2137-45. 2001.
- Miyazaki, S., F. Ishikawa, *et al.* Intraperitoneal injection of lipopolysaccharide induces dynamic migration of Gr-1high polymorphonuclear neutrophils in the murine abdominal cavity. Clin Diagn Lab Immunol, v.11, n.3, May, p.452-7. 2004.
- Molesworth-Kenyon, S. J., J. E. Oakes, *et al.* A novel role for neutrophils as a source of T cell-recruiting chemokines IP-10 and Mig during the DTH response to HSV-1 antigen. J Leukoc Biol, v.77, n.4, Apr, p.552-9. 2005.
- Moller, A., U. Lippert, *et al.* Human mast cells produce IL-8. J Immunol, v.151, n.6, Sep 15, p.3261-6. 1993.

- Moller, D. R., M. Wysocka, *et al.* Inhibition of IL-12 production by thalidomide. J Immunol, v.159, n.10, Nov 15, p.5157-61. 1997.
- Monteiro, M. C., L. G. Nogueira, *et al.* Effect of salivary gland extract of *Leishmania* vector, *Lutzomyia longipalpis*, on leukocyte migration in OVA-induced immune peritonitis. Eur J Immunol, v.35, n.8, Aug, p.2424-33. 2005.
- Moser, B., C. Schumacher, *et al.* Neutrophil-activating peptide 2 and gro/melanoma growth-stimulatory activity interact with neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8 receptors on human neutrophils. J Biol Chem, v.266, n.16, Jun 5, p.10666-71. 1991.
- Moser, B. e K. Willmann. Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. Ann Rheum Dis, v.63 Suppl 2, Nov, p.ii84-ii89. 2004.
- Mosmann, T. R., H. Cherwinski, *et al.* Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol, v.136, n.7, Apr 1, p.2348-57. 1986.
- Motyka, B. e H. S. Teh. Naturally occurring low affinity peptide/MHC class I ligands can mediate negative selection and T cell activation. J Immunol, v.160, n.1, Jan 1, p.77-86. 1998.
- Muguruma, K., P. W. Gray, *et al.* The central role of PAF in necrotizing enterocolitis development. Adv Exp Med Biol, v.407, p.379-82. 1997.
- Muid, R. E. T., B.M.; Dale, M.M. The neutrophil leukocyte., v.3. 1994. 35-48 p. (Textbook of Immunopharmacology)
- Mulligan, M. S., J. M. Hevel, *et al.* Tissue injury caused by deposition of immune complexes is L-arginine dependent. Proc Natl Acad Sci U S A, v.88, n.14, Jul 15, p.6338-42. 1991.
- Murphy, P. M. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. Annu Rev Immunol, v.12, p.593-633. 1994.
- _____. Chemokine receptors: structure, function and role in microbial pathogenesis. Cytokine Growth Factor Rev, v.7, n.1, Jun, p.47-64. 1996.
- Murphy, P. M. e H. L. Tiffany. Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. Science, v.253, n.5025, Sep 13, p.1280-3. 1991.
- Nakae, H., S. Endo, *et al.* Relationship between leukotriene B4 and prostaglandin I2 in patients with sepsis. Res Commun Mol Pathol Pharmacol, v.86, n.1, Oct, p.37-42. 1994.
- Nakamura, K., A. Kitani, *et al.* Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. J Exp Med, v.194, n.5, Sep 3, p.629-44. 2001a.
- Nakamura, K., M. Okada, *et al.* Macrophage inflammatory protein-2 induced by TNF-alpha plays a pivotal role in concanavalin A-induced liver injury in mice. J Hepatol, v.35, n.2, Aug, p.217-24. 2001b.
- Nathan, C. F. Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. J Clin Invest, v.80, n.6, Dec, p.1550-60. 1987.
- Neote, K., D. Digregorio, *et al.* Molecular cloning, functional expression, and signaling characteristics of a C-C chemokine receptor. Cell, v.72, n.3, Feb 12, p.415-25. 1993.
- Niki, Y., H. Yamada, *et al.* Macrophage- and neutrophil-dominant arthritis in human IL-1 alpha transgenic mice. J Clin Invest, v.107, n.9, May, p.1127-35. 2001.
- Nogueira, L. G. Mecanismos Envolvidos na Migração de Neutrófilos Induzida por mBSA em Camundongos Imunizados. Imunologia, USP, Ribeirão Preto, 2004.

- Oda, T. e M. Katori. Inhibition site of dexamethasone on extravasation of polymorphonuclear leukocytes in the hamster cheek pouch microcirculation. J Leukoc Biol, v.52, n.3, Sep, p.337-42. 1992.
- O'donnell, R. A., C. Peebles, *et al.* Relationship between peripheral airway dysfunction, airway obstruction, and neutrophilic inflammation in COPD. Thorax, v.59, n.10, Oct, p.837-42. 2004.
- Oliveira, S. H., L. H. Faccioli, *et al.* Role of resident peritoneal cells in eosinophil migration induced by saline. Int Arch Allergy Immunol, v.104, n.4, Aug, p.323-31. 1994.
- O'Neill, L. A. Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily. Curr Top Microbiol Immunol, v.270, p.47-61. 2002.
- O'Neill, L. A. e C. Greene. Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. J Leukoc Biol, v.63, n.6, Jun, p.650-7. 1998.
- Oppenheim, J. J., C. O. Zachariae, *et al.* Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. Annu Rev Immunol, v.9, p.617-48. 1991.
- Ottonello, L., F. Montecucco, *et al.* CCL3 (MIP-1alpha) induces in vitro migration of GM-CSF-primed human neutrophils via CCR5-dependent activation of ERK 1/2. Cell Signal, v.17, n.3, Mar, p.355-63. 2005.
- Panayi, G. S., V. M. Corrigall, *et al.* Pathogenesis of rheumatoid arthritis. The role of T cells and other beasts. Rheum Dis Clin North Am, v.27, n.2, May, p.317-34. 2001.
- Parman, T., M. J. Wiley, *et al.* Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide teratogenicity. Nat Med, v.5, n.5, May, p.582-5. 1999.
- Partsch, G., E. Wagner, *et al.* T cell derived cytokines in psoriatic arthritis synovial fluids. Ann Rheum Dis, v.57, n.11, Nov, p.691-3. 1998.
- Paxton, W. A., S. R. Martin, *et al.* Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high-risk sexual exposure. Nat Med, v.2, n.4, Apr, p.412-7. 1996.
- Perretti, M. e R. J. Flower. Modulation of IL-1-induced neutrophil migration by dexamethasone and lipocortin 1. J Immunol, v.150, n.3, Feb 1, p.992-9. 1993.
- Perretti, M., J. G. Harris, *et al.* A role for endogenous histamine in interleukin-8-induced neutrophil infiltration into mouse air-pouch: investigation of the modulatory action of systemic and local dexamethasone. Br J Pharmacol, v.112, n.3, Jul, p.801-8. 1994.
- Petering, H., R. Hochstetter, *et al.* Detection of MCP-4 in dermal fibroblasts and its activation of the respiratory burst in human eosinophils. J Immunol, v.160, n.2, Jan 15, p.555-8. 1998.
- Piccirillo, C. A., J. J. Letterio, *et al.* CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. J Exp Med, v.196, n.2, Jul 15, p.237-46. 2002.
- Pierer, M., J. Rethage, *et al.* Chemokine secretion of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts stimulated by Toll-like receptor 2 ligands. J Immunol, v.172, n.2, Jan 15, p.1256-65. 2004.
- Premack, B. A. e T. J. Schall. Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection. Nat Med, v.2, n.11, Nov, p.1174-8. 1996.
- Proudfoot, A. E., C. A. Power, *et al.* Characterisation of the RANTES/MIP-1 alpha receptor (CC CKR-1) stably transfected in HEK 293 cells and the recombinant ligands. FEBS Lett, v.376, n.1-2, Nov 27, p.19-23. 1995.
- Puneet, P., S. Mochhala, *et al.* Chemokines in acute respiratory distress syndrome. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v.288, n.1, Jan, p.L3-15. 2005.

- Radi, Z. A., M. E. Kehrl, Jr., *et al.* Cell adhesion molecules, leukocyte trafficking, and strategies to reduce leukocyte infiltration. J Vet Intern Med, v.15, n.6, Nov-Dec, p.516-29. 2001.
- Rae, S. A., E. M. Davidson, *et al.* Leukotriene B4, an inflammatory mediator in gout. Lancet, v.2, n.8308, Nov 20, p.1122-4. 1982.
- Raghavan, S. e J. Holmgren. CD4+CD25+ suppressor T cells regulate pathogen induced inflammation and disease. FEMS Immunol Med Microbiol, v.44, n.2, May 1, p.121-7. 2005.
- Rajaratnam, K., I. Clark-Lewis, *et al.* 1H NMR solution structure of an active monomeric interleukin-8. Biochemistry, v.34, n.40, Oct 10, p.12983-90. 1995.
- Ramos, C. D., N. E. Heluy-Neto, *et al.* Neutrophil migration induced by IL-8-activated mast cells is mediated by CINC-1. Cytokine, v.21, n.5, Mar 7, p.214-23. 2003.
- Rankin, J. A., I. Sylvester, *et al.* Macrophages cultured in vitro release leukotriene B4 and neutrophil attractant/activation protein (interleukin 8) sequentially in response to stimulation with lipopolysaccharide and zymosan. J Clin Invest, v.86, n.5, Nov, p.1556-64. 1990.
- Rathanaswami, P., M. Hachicha, *et al.* Expression of the cytokine RANTES in human rheumatoid synovial fibroblasts. Differential regulation of RANTES and interleukin-8 genes by inflammatory cytokines. J Biol Chem, v.268, n.8, Mar 15, p.5834-9. 1993.
- Reimold, A. M. TNFalpha as therapeutic target: new drugs, more applications. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, v.1, n.4, Dec, p.377-92. 2002.
- Reis E Sousa, C. e R. N. Germain. Major histocompatibility complex class I presentation of peptides derived from soluble exogenous antigen by a subset of cells engaged in phagocytosis. J Exp Med, v.182, n.3, Sep 1, p.841-51. 1995.
- Ribeiro, R. A., M. V. Souza-Filho, *et al.* Role of resident mast cells and macrophages in the neutrophil migration induced by LTb4, fMLP and C5a des arg. Int Arch Allergy Immunol, v.112, n.1, Jan, p.27-35. 1997.
- Rios-Santos, F., C. F. Benjamim, *et al.* A critical role of leukotriene B4 in neutrophil migration to infectious focus in cecal ligaton and puncture sepsis. Shock, v.19, n.1, Jan, p.61-5. 2003.
- Robson, R. L., R. M. Mcloughlin, *et al.* Differential regulation of chemokine production in human peritoneal mesothelial cells: IFN-gamma controls neutrophil migration across the mesothelium in vitro and in vivo. J Immunol, v.167, n.2, Jul 15, p.1028-38. 2001.
- Rock, K. L., S. Gamble, *et al.* Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules. Science, v.249, n.4971, Aug 24, p.918-21. 1990.
- Rollin, S., C. Lemieux, *et al.* VEGF-mediated endothelial P-selectin translocation: role of VEGF receptors and endogenous PAF synthesis. Blood, v.103, n.10, May 15, p.3789-97. 2004.
- Rollins, B. J. Chemokines. Blood, v.90, n.3, Aug 1, p.909-28. 1997.
- Rot, A., M. Krieger, *et al.* RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes. J Exp Med, v.176, n.6, Dec 1, p.1489-95. 1992.
- Rubanyi, G. M. Vascular effects of oxygen-derived free radicals. Free Radic Biol Med, v.4, n.2, p.107-20. 1988.
- Rumsaeng, V., W. W. Cruikshank, *et al.* Human mast cells produce the CD4+ T lymphocyte chemoattractant factor, IL-16. J Immunol, v.159, n.6, Sep 15, p.2904-10. 1997.
- Russell, J. H. e T. J. Ley. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. Annu Rev Immunol, v.20, p.323-70. 2002.
- Rutgers, A., P. Heeringa, *et al.* The role of myeloperoxidase in the pathogenesis of systemic vasculitis. Clin Exp Rheumatol, v.21, n.6 Suppl 32, Nov-Dec, p.S55-63. 2003.

- Sabroe, I., A. Hartnell, *et al.* Differential regulation of eosinophil chemokine signaling via CCR3 and non-CCR3 pathways. J Immunol, v.162, n.5, Mar 1, p.2946-55. 1999.
- Sadouk, M. B., J. P. Pelletier, *et al.* Human synovial fibroblasts coexpress IL-1 receptor type I and type II mRNA. The increased level of the IL-1 receptor in osteoarthritic cells is related to an increased level of the type I receptor. Lab Invest, v.73, n.3, Sep, p.347-55. 1995.
- Saeed, S. A., M. A. Waqar, *et al.* Myocardial ischaemia and reperfusion injury: reactive oxygen species and the role of neutrophil. J Coll Physicians Surg Pak, v.15, n.8, Aug, p.507-14. 2005.
- Sakaguchi, S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. Annu Rev Immunol, v.22, p.531-62. 2004.
- Salgame, P., J. S. Abrams, *et al.* Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. Science, v.254, n.5029, Oct 11, p.279-82. 1991.
- Sallusto, F., D. Lenig, *et al.* Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. J Exp Med, v.187, n.6, Mar 16, p.875-83. 1998.
- Samson, M., O. Labbe, *et al.* Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene. Biochemistry, v.35, n.11, Mar 19, p.3362-7. 1996a.
- Samson, M., F. Libert, *et al.* Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. Nature, v.382, n.6593, Aug 22, p.722-5. 1996b.
- Samuelsson, B., S. E. Dahlen, *et al.* Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. Science, v.237, n.4819, Sep 4, p.1171-6. 1987.
- Samuelsson, B., J. Z. Haeggstrom, *et al.* Leukotriene biosynthesis. Ann N Y Acad Sci, v.629, p.89-99. 1991.
- Sar, B., K. Oishi, *et al.* Induction of interleukin 8 (IL-8) production by Pseudomonas nitrite reductase in human alveolar macrophages and epithelial cells. Microbiol Immunol, v.43, n.5, p.409-17. 1999.
- Sato, E., K. L. Simpson, *et al.* Inhibition of MIP-1alpha-induced human neutrophil and monocyte chemotactic activity by reactive oxygen and nitrogen metabolites. J Lab Clin Med, v.135, n.2, Feb, p.161-9. 2000.
- Saunders, B. M., S. Tran, *et al.* Transmembrane TNF is sufficient to initiate cell migration and granuloma formation and provide acute, but not long-term, control of Mycobacterium tuberculosis infection. J Immunol, v.174, n.8, Apr 15, p.4852-9. 2005.
- Sautebin, L., R. Carnuccio, *et al.* Lipocortin and vasocortin: two species of anti-inflammatory proteins mimicking the effects of glucocorticoids. Pharmacol Res, v.25, n.1, Jan, p.1-12. 1992.
- Scapigliati, G., P. Bossu, *et al.* Quantitation of biologically active IL-1 by a sensitive assay based on immobilized human IL-1 receptor type II (IL-1RII). J Immunol Methods, v.138, n.1, Apr 8, p.31-8. 1991.
- Schaerli, P., M. Britschgi, *et al.* Characterization of human T cells that regulate neutrophilic skin inflammation. J Immunol, v.173, n.3, Aug 1, p.2151-8. 2004.
- Schall, T. J., K. Bacon, *et al.* Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. Nature, v.347, n.6294, Oct 18, p.669-71. 1990.
- Scheinman, R. I., P. C. Cogswell, *et al.* Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. Science, v.270, n.5234, Oct 13, p.283-6. 1995a.
- Scheinman, R. I., A. Gualberto, *et al.* Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. Mol Cell Biol, v.15, n.2, Feb, p.943-53. 1995b.

- Schmal, H., T. P. Shanley, *et al.* Role for macrophage inflammatory protein-2 in lipopolysaccharide-induced lung injury in rats. J Immunol, v.156, n.5, Mar 1, p.1963-72. 1996.
- Scott, M. J., W. G. Cheadle, *et al.* Leukotriene B4 receptor (BLT-1) modulates neutrophil influx into the peritoneum but not the lung and liver during surgically induced bacterial peritonitis in mice. Clin Diagn Lab Immunol, v.11, n.5, Sep, p.936-41. 2004.
- Secco, D. D., J. A. Paron, *et al.* Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. Nitric Oxide, v.9, n.3, Nov, p.153-64. 2003.
- Seder, R. A., J. L. Boulay, *et al.* CD8+ T cells can be primed in vitro to produce IL-4. J Immunol, v.148, n.6, Mar 15, p.1652-6. 1992.
- Seitz, M. [The role of IL-6 and IL-8 in inflammatory processes in chronic polyarthritis]. Verh Dtsch Ges Inn Med, v.97, p.331-2. 1991.
- Serhan, C. N., A. Radin, *et al.* Leukotriene B4 is a complete secretagogue in human neutrophils: a kinetic analysis. Biochem Biophys Res Commun, v.107, n.3, Aug, p.1006-12. 1982.
- Shahrara, S., A. E. Proudfoot, *et al.* Amelioration of rat adjuvant-induced arthritis by Met-RANTES. Arthritis Rheum, v.52, n.6, Jun, p.1907-19. 2005.
- Shanley, T. P., H. Schmal, *et al.* Requirement for C-X-C chemokines (macrophage inflammatory protein-2 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant) in IgG immune complex-induced lung injury. J Immunol, v.158, n.7, Apr 1, p.3439-48. 1997.
- Sharon, P. e W. F. Stenson. Enhanced synthesis of leukotriene B4 by colonic mucosa in inflammatory bowel disease. Gastroenterology, v.86, n.3, Mar, p.453-60. 1984.
- Sharpe, T. J. e H. Smith. Effects of drugs on the acute inflammation following intraperitoneal injection of antigen into actively sensitised rats. Int Arch Allergy Appl Immunol, v.60, n.2, p.216-21. 1979.
- Sheikh, S., M. Rahman, *et al.* Differing mechanisms of leukocyte recruitment and sensitivity to conditioning by shear stress for endothelial cells treated with tumour necrosis factor-alpha or interleukin-1beta. Br J Pharmacol, v.145, n.8, Aug, p.1052-61. 2005.
- Shen, X. Y., T. A. Hamilton, *et al.* Lipopolysaccharide-induced expression of the competence gene KC in vascular endothelial cells is mediated through protein kinase C. J Cell Physiol, v.140, n.1, Jul, p.44-51. 1989.
- Shevach, E. M. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. Nat Rev Immunol, v.2, n.6, Jun, p.389-400. 2002.
- Shu, U., M. Kiniwa, *et al.* Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction. Eur J Immunol, v.25, n.4, Apr, p.1125-8. 1995.
- Shuck, M. E., T. E. Eessalu, *et al.* Cloning, heterologous expression and characterization of murine interleukin 1 receptor antagonist protein. Eur J Immunol, v.21, n.11, Nov, p.2775-80. 1991.
- Siemasko, K. e M. R. Clark. The control and facilitation of MHC class II antigen processing by the BCR. Curr Opin Immunol, v.13, n.1, Feb, p.32-6. 2001.
- Silva, T. A., V. S. Lara, *et al.* Macrophages and mast cells control the neutrophil migration induced by dentin proteins. J Dent Res, v.84, n.1, Jan, p.79-83. 2005.
- Singh, S. K., H. Morbach, *et al.* Differential expression of chemokines in synovial cells exposed to different *Borrelia burgdorferi* isolates. Clin Exp Rheumatol, v.23, n.3, May-Jun, p.311-22. 2005.
- Singh, V. P., C. S. Patil, *et al.* Effect of 5-lipoxygenase inhibition on events associated with inflammatory bowel disease in rats. Indian J Exp Biol, v.42, n.7, Jul, p.667-73. 2004.

- Slater, T. F. Free-radical mechanisms in tissue injury. Biochem J, v.222, n.1, Aug 15, p.1-15. 1984.
- Sonobe, Y., H. Nakane, *et al.* Regulation of Con A-dependent cytokine production from CD4+ and CD8+ T lymphocytes by autosecretion of histamine. Inflamm Res, v.53, n.3, Mar, p.87-92. 2004.
- Souza, G. E., F. Q. Cunha, *et al.* Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. Agents Actions, v.24, n.3-4, Jul, p.377-80. 1988.
- Spicer, B. A., P. A. Hatt, *et al.* Effect of drugs on the increase in cell numbers in the peritoneal cavity of the actively sensitised mouse after intraperitoneal challenge with antigen. Int Arch Allergy Appl Immunol, v.81, n.1, p.81-4. 1986.
- Spicer, B. A. L., S.M.; Smith, H. The effects of drugs on leukocyte changes following the injection of Ag into peritoneal cavities of actively sensitised rats. Agents and Actions, v.17, p.498-505. 1985.
- Stevens, R. L. Mast cell proteoglycans. Prog Clin Biol Res, v.297, p.131-43; discussion 43-4. 1989.
- Stevens, R. L. e K. F. Austen. Recent advances in the cellular and molecular biology of mast cells. Immunol Today, v.10, n.11, Nov, p.381-6. 1989.
- Su, S. B., N. Mukaida, *et al.* Preparation of specific polyclonal antibodies to a C-C chemokine receptor, CCR1, and determination of CCR1 expression on various types of leukocytes. J Leukoc Biol, v.60, n.5, Nov, p.658-66. 1996.
- Syrbe, U., J. Siveke, *et al.* Th1/Th2 subsets: distinct differences in homing and chemokine receptor expression? Springer Semin Immunopathol, v.21, n.3, p.263-85. 1999.
- Takata, H., H. Tomiyama, *et al.* Cutting edge: expression of chemokine receptor CXCR1 on human effector CD8+ T cells. J Immunol, v.173, n.4, Aug 15, p.2231-5. 2004.
- Takemura, R. e Z. Werb. Secretory products of macrophages and their physiological functions. Am J Physiol, v.246, n.1 Pt 1, Jan, p.C1-9. 1984.
- Taktak, Y. S. e M. Lee. A solid phase enzyme immunoassay for serum amyloid A (SAA) protein. Clinical evaluation. J Immunol Methods, v.136, n.1, Jan 24, p.11-6. 1991.
- Tanaka, Y., D. H. Adams, *et al.* T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta. Nature, v.361, n.6407, Jan 7, p.79-82. 1993.
- Tateda, K., T. A. Moore, *et al.* Chemokine-dependent neutrophil recruitment in a murine model of Legionella pneumonia: potential role of neutrophils as immunoregulatory cells. Infect Immun, v.69, n.4, Apr, p.2017-24. 2001.
- Taub, D. D., M. Anver, *et al.* T lymphocyte recruitment by interleukin-8 (IL-8). IL-8-induced degranulation of neutrophils releases potent chemoattractants for human T lymphocytes both in vitro and in vivo. J Clin Invest, v.97, n.8, Apr 15, p.1931-41. 1996.
- Tavares, J. L., A. Wangoo, *et al.* Thalidomide reduces tumour necrosis factor-alpha production by human alveolar macrophages. Respir Med, v.91, n.1, Jan, p.31-9. 1997.
- Taylor, P. C., A. M. Peters, *et al.* Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum, v.43, n.1, Jan, p.38-47. 2000.
- Taylor, P. C., R. O. Williams, *et al.* Tumour necrosis factor alpha as a therapeutic target for immune-mediated inflammatory diseases. Curr Opin Biotechnol, v.15, n.6, Dec, p.557-63. 2004.
- Te Velde, A. A., R. J. Huijbens, *et al.* Interleukin-4 (IL-4) inhibits secretion of IL-1 beta, tumor necrosis factor alpha, and IL-6 by human monocytes. Blood, v.76, n.7, Oct 1, p.1392-7. 1990.

- Thornton, S., L. E. Duwel, *et al.* Association of the course of collagen-induced arthritis with distinct patterns of cytokine and chemokine messenger RNA expression. Arthritis Rheum, v.42, n.6, Jun, p.1109-18. 1999.
- Tokumura, A. A family of phospholipid autacoids: occurrence, metabolism and bioactions. Prog Lipid Res, v.34, n.2, p.151-84. 1995.
- Trent, J. T. e F. A. Kerdel. Tumor necrosis factor alpha inhibitors for the treatment of dermatologic diseases. Dermatol Nurs, v.17, n.2, Apr, p.97-107. 2005.
- Trkola, A., T. Dragic, *et al.* CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. Nature, v.384, n.6605, Nov 14, p.184-7. 1996.
- Tsuji, F., K. Oki, *et al.* Involvement of leukotriene B4 in arthritis models. Life Sci, v.64, n.3, p.PL51-6. 1999.
- Tumpey, T. M., R. Fenton, *et al.* Role for macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2), MIP-1alpha, and interleukin-1alpha in the delayed-type hypersensitivity response to viral antigen. J Virol, v.76, n.16, Aug, p.8050-7. 2002.
- Valledor, A. F. e M. Ricote. Nuclear receptor signaling in macrophages. Biochem Pharmacol, v.67, n.2, Jan 15, p.201-12. 2004.
- Van Deuren, M., J. Van Der Ven-Jongekrijg, *et al.* The pattern of interleukin-1beta (IL-1beta) and its modulating agents IL-1 receptor antagonist and IL-1 soluble receptor type II in acute meningococcal infections. Blood, v.90, n.3, Aug 1, p.1101-8. 1997.
- Van Parijs, L. e A. K. Abbas. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. Science, v.280, n.5361, Apr 10, p.243-8. 1998.
- Vannier, E., R. De Waal Malefyt, *et al.* Interleukin-13 (IL-13) induces IL-1 receptor antagonist gene expression and protein synthesis in peripheral blood mononuclear cells: inhibition by an IL-4 mutant protein. Blood, v.87, n.8, Apr 15, p.3307-15. 1996.
- Vita, N., S. Lefort, *et al.* Functional linkage of the Gro beta and IL-8 receptors on the surface of human neutrophils. Eur Cytokine Netw, v.4, n.3, May-Jun, p.197-204. 1993.
- Vukmanovic-Stejic, M., B. Vyas, *et al.* Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes. Blood, v.95, n.1, Jan 1, p.231-40. 2000.
- Vuk-Pavlovic, Z., E. K. Mo, *et al.* Surfactant Protein D Enhances Pneumocystis Infection in Immune Suppressed Mice. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, Sep 30. 2005.
- Wajant, H., F. Henkler, *et al.* The TNF-receptor-associated factor family: scaffold molecules for cytokine receptors, kinases and their regulators. Cell Signal, v.13, n.6, Jun, p.389-400. 2001.
- Wakabayashi, G., J. A. Gelfand, *et al.* A specific receptor antagonist for interleukin 1 prevents Escherichia coli-induced shock in rabbits. Faseb J, v.5, n.3, Mar 1, p.338-43. 1991.
- Wallace, J. L., A. Bak, *et al.* Cyclooxygenase 1 contributes to inflammatory responses in rats and mice: implications for gastrointestinal toxicity. Gastroenterology, v.115, n.1, Jul, p.101-9. 1998.
- Wang, P., P. Wu, *et al.* Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. J Biol Chem, v.270, n.16, Apr 21, p.9558-63. 1995.
- Wang, Y., L. Tao, *et al.* Allo-immunization elicits CD8+ T cell-derived chemokines, HIV suppressor factors and resistance to HIV infection in women. Nat Med, v.5, n.9, Sep, p.1004-9. 1999.
- Wanten, G., A. Kusters, *et al.* Lipid effects on neutrophil calcium signaling induced by opsonized particles: platelet activating factor is only part of the story. Clin Nutr, v.23, n.4, Aug, p.623-30. 2004.

- Wareing, M. D., A. B. Lyon, *et al.* Chemokine expression during the development and resolution of a pulmonary leukocyte response to influenza A virus infection in mice. J Leukoc Biol, v.76, n.4, Oct, p.886-95. 2004.
- Watt, I. e M. Cobby. Treatment of rheumatoid arthritis patients with interleukin-1 receptor antagonist: radiologic assessment. Semin Arthritis Rheum, v.30, n.5 Suppl 2, Apr, p.21-5. 2001.
- Weiss, S. J. Tissue destruction by neutrophils. N Engl J Med, v.320, n.6, Feb 9, p.365-76. 1989.
- Weissmann, G. e H. Korchak. Rheumatoid arthritis. The role of neutrophil activation. Inflammation, v.8 Suppl, Jun, p.S3-14. 1984.
- Werb, Z., J. R. Chin, *et al.* The cell and molecular biology of apolipoprotein E synthesis by macrophages. Ciba Found Symp, v.118, p.155-71. 1986.
- Wong, S. H. e J. M. Lord. Factors underlying chronic inflammation in rheumatoid arthritis. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), v.52, n.6, Nov-Dec, p.379-88. 2004.
- Wooley, P. H., J. Dutcher, *et al.* Influence of a recombinant human soluble tumor necrosis factor receptor FC fusion protein on type II collagen-induced arthritis in mice. J Immunol, v.151, n.11, Dec 1, p.6602-7. 1993.
- Wu, L., N. P. Gerard, *et al.* CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. Nature, v.384, n.6605, Nov 14, p.179-83. 1996.
- Wuyts, A., N. Van Osselaer, *et al.* Characterization of synthetic human granulocyte chemotactic protein 2: usage of chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 and in vivo inflammatory properties. Biochemistry, v.36, n.9, Mar 4, p.2716-23. 1997.
- Xiao, H., P. Heeringa, *et al.* The role of neutrophils in the induction of glomerulonephritis by anti-myeloperoxidase antibodies. Am J Pathol, v.167, n.1, Jul, p.39-45. 2005.
- Yasui, K., N. Kobayashi, *et al.* Thalidomide as an immunotherapeutic agent: the effects on neutrophil-mediated inflammation. Curr Pharm Des, v.11, n.3, p.395-401. 2005.
- Yokomizo, T., T. Izumi, *et al.* Leukotriene B4: metabolism and signal transduction. Arch Biochem Biophys, v.385, n.2, Jan 15, p.231-41. 2001.
- Yokomizo, T., K. Kato, *et al.* A second leukotriene B(4) receptor, BLT2. A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. J Exp Med, v.192, n.3, Aug 7, p.421-32. 2000.
- York, I. A. e K. L. Rock. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. Annu Rev Immunol, v.14, p.369-96. 1996.
- Yoshida, H., H. Soh, *et al.* Beneficial effects of n-9 eicosatrienoic acid on experimental bowel lesions. Surf Today, v.33, n.8, p.600-5. 2003.
- Yoshimura, T., K. Matsushima, *et al.* Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin 1 (IL 1). J Immunol, v.139, n.3, Aug 1, p.788-93. 1987.
- Zhang, X. W., Q. Liu, *et al.* CXC chemokines, MIP-2 and KC, induce P-selectin-dependent neutrophil rolling and extravascular migration in vivo. Br J Pharmacol, v.133, n.3, Jun, p.413-21. 2001.
- Zheng, L., H. Teschler, *et al.* Alveolar macrophage TNF-alpha release and BAL cell phenotypes in sarcoidosis. Am J Respir Crit Care Med, v.152, n.3, Sep, p.1061-6. 1995.
- Zimmerman, G. A., D. E. Lorant, *et al.* Juxtacrine intercellular signaling: another way to do it. Am J Respir Cell Mol Biol, v.9, n.6, Dec, p.573-7. 1993.
- Zimmerman, G. A., T. M. McIntyre, *et al.* Adhesion and signaling in vascular cell-cell interactions. J Clin Invest, v.100, n.11 Suppl, Dec 1, p.S3-5. 1997.

Zimmerman, G. A., S. M. Prescott, *et al.* Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. Immunol Today, v.13, n.3, Mar, p.93-100. 1992.

Zuany-Amorim, C., D. Leduc, *et al.* Characterization and pharmacological modulation of antigen-induced peritonitis in actively sensitized mice. Br J Pharmacol, v.110, n.2, Oct, p.917-24. 1993.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)