

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

***Participação das quimiocinas CXCL1 (KC) e CXCL5 (LIX) e do
LTB₄ na migração de neutrófilos para a cavidade articular em
modelo de artrite induzida por mBSA***

Renata Grespan

**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 CXCL1 (KC) e CXCL5 (LIX) e do LTB₄ na migração de neutrófilos para a cavidade articular em modelo de artrite induzida por mBSA

Dissertação apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Aluna: Renata Grespan

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha

Ribeirão Preto

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Grespan, Renata

Participação das quimiocinas CXCL1 (KC) e CXCL5 (LIX) e do LTB4 na migração de neutrófilos para a cavidade articular em modelo de artrite induzida por mBSA. Ribeirão Preto, 2006. 90 f.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / USP – Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Cunha, Fernando de Queiróz.

Palavras-chave: Artrite Reumatóide, migração de Neutrófilos, quimiocina CXCL1, quimiocina CXCL5, leucotrieno B₄.

“Participação das quimiocinas CXCL1 (KC) e CXCL5 (LIX) e do LTB4 na migração de neutrófilos para a cavidade articular em modelo de artrite induzida por mBSA”.

Renata Grespan

Dissertação apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.
Área de concentração: Farmacologia.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha
FMRP-USP
Orientador

Prof. Dr. Edson Antunes
UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Glória E. P. Souza
FCFRP-USP

Trabalho realizado no Laboratório de Inflamação e Dor do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

“Sabemos da verdade somente quando sabemos pouco; quanto mais sabemos, tanto mais duvidamos.”

Goethe

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Rubens Grespan e Ivete Paixão
Grespan, que me ensinaram a viver, lutar pelos
meus sonhos, ser uma pessoa honesta e
batalhadora. Se hoje sou alguém e estou aqui, devo
isto a vocês que me ensinaram o valor da família e
nunca mediram esforços para me ajudar.*

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha**, pela orientação e oportunidade de trabalhar em seu laboratório.

Ao **prof. Dr. Edson Antunes e à prof^a. Dr^a. Glória E. P. de Souza**, por aceitarem participar da banca examinadora desta dissertação e pela atenção.

À **Sandra Y. Fukada**, pela amizade e principalmente pela participação ativa neste trabalho com competência e dedicação, muito obrigada.

Ao **Marcelo** e à **Sandra**, pela fundamental e preciosa ajuda na correção desta dissertação, vocês me ensinaram muito.

Aos meus companheiros de experimentos, **Henrique** e **Sílvio**, pelas discussões pertinentes aos nossos trabalhos, e pelos agradáveis momentos de descontração.

À todos os amigos do laboratório de Inflamação, pela convivência, pelo aprendizado diário, que com certeza me ensinaram muito, cada um contribuindo de sua maneira. Em especial, à **Sandra, Andressa, Zeca, Diego, Vanessa, Silvio, Henrique, Spiller, Dani Secco, Michel, Thiago, Cléber, Karla, Marcelo, Paulinha e Fabrício**.

Ao **Cléber** e à **Karla**, meus agradecimentos pelo aprendizado nas reuniões do nosso extinto grupo “Migração Cell”.

À **Vanessa, Zeca, Marcelo** e **Henrique** pela ajuda quando muito precisei.

Aos amigos do laboratório de Dor, **Djane** (pessoa admirável), **Mani, Ana, Waldiceu, Beth, Dani Sachs, Celina, Thiago, Luis Fernando, Dionéia, Marcos, Guilherme** e **Cris Silva** pela amizade e agradável convivência.

Aos meus amados pais, **Rubens** e **Ivete**, pelo amor incondicional que vocês me proporcionam e minha imensa admiração pela união, amor e pelo trabalho em suas vidas.

À **Fernanda**, minha irmã do coração, e verdadeira amiga, que mesmo de longe, me apoiou muito em todos os momentos.

Ao meu irmão e minha cunhada, **Marco Aurélio** e **Cristiane**, que sempre acreditaram e torceram por mim. Amo vocês!

Ao meu namorado **Dimas**, pelo companheirismo, amizade, pelos vários momentos de desabafo, e principalmente pelo apoio constante, você foi e, com certeza, é muito importante para mim.

Ao meu amigo, **Diego**, que já sinto saudades, mas a distância não afetará uma amizade como a nossa, você é uma pessoa muito especial para mim.

Às amigas, **Mani** e **Alice**, por proporcionarem um ambiente agradável em casa, pela força nos momentos difíceis e pela amizade sincera. Gosto muito de vocês, amigas!

Ao **prof. Dr. Gustavo Ballejo**, pela sua preciosa ajuda na minha qualificação, e disponibilidade de seu tempo.

Ao **prof. Dr. Francisco Guimarães**, pelos aprendizados, amizade, conversas, e pela suas adoráveis aulas de música.

À **prof^a. Dr^a. Ciomar A. Bersani Amado**, pela orientação na minha iniciação científica, a qual me deu base para a realização deste trabalho.

À **Giuliana**, pela amizade e por sua ajuda fundamental nos ensaios de ELISA, você é um exemplo de pessoa.

À **Fabíola**, pelo auxílio técnico, convívio e amizade.

À **Diva** e **Kátia**, pelo carinho e convivência agradável, obrigada por tudo e desculpa por alguma coisa.

Ao **Jailson Dantas** e à **Célia Miranda**, pessoas queridas, que mesmo longe, serei eternamente grata pelo auxílio técnico na minha iniciação científica.

À **Valéria**, pela amizade e inúmeras conversas.

Ao **Acácio**, pela atenção nas resoluções burocráticas e pelas conversas.

Aos funcionários da secretária **Sônia M. Stefanelli**, **Fátima H. Petean** e **José W. Ramon** pela competência e disposição em ajudar sempre.

Aos técnicos do laboratório de Dor, **Serginho** e **Ieda**, obrigada pelo apoio técnico no laboratório e convivência.

Aos meus **companheiros** de voley, pelas divertidas noites de quinta-feira.

À todos os **amigos** do Departamento de Farmacologia – USP pela amizade e convívio diário. Em especial à Cris Becari e ao Luis Borges.

À **Bia**, por sua fundamental contribuição na limpeza do laboratório, pelo carinho e convívio diário.

À **Eliana**, **Inês**, **Júlio** e **Cris** pelo manejo com os animais do biotério e pelo carinho.

A **todos** que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao **CNPq**, **FAPESP**, **CAPES** e **FAEPA** pelo indispensável auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

À **DEUS**, acima de tudo pela minha saúde, que possibilita a realização das tarefas diárias e pelo perdão incondicional de minhas falhas.

ABREVIATURAS

AIA: artrite induzida por antígeno

ANOVA: análise de variância

C5a: quinto fragmento do sistema complemento ativado

CCL: quimiocina CC ligante

CXCL: quimiocina CXC ligante

DMSO: dimetil sulfoxido

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

ELISA: ensaio imunoenzimático ligado a enzima

ELR: glutamato-leucina-arginina

ENA-78: peptídeo ativador de neutrófilos derivado de células epiteliais

FLAP: proteína ativadora da 5-lipoxigenase

GCP-2: proteína quimiotática para granulócitos

GRO: oncogene regulador do crescimento

i.a.: intra-articular

i.p.: intraperitoneal

ICAM: molécula de adesão intercelular

IFN: interferon

IL: interleucina

IL-1ra: antagonista do receptor de IL-1

IM: imunizado

KC: quimiocina derivada de queratinócitos

kg: kilograma (s)

L: litro (s)

LFA-1: função antigênica-1 associado ao linfócito

LIX: quimiocina CXC induzida por lipopolissacarídeo

LPS: lipopolissacarídeo

LT: leucotrieno

LTB₄: leucotrieno B₄

mBSA: albumina bovina sérica metilada

MCP-4: proteína quimiotática para monócitos

mg: miligrama (s)

min: minuto (s)

MIP: proteína inflamatória de macrófagos

mL: mililitro (s)

MPO: mieloperoxidase

N: número

Na₂CO₃: carbonato de sódio

NaOH: hidróxido de sódio

NAP-2: peptídeo-2 ativador de neutrófilos

NF: fator de necrose tumoral

NF-κB: fator de transcrição nuclear kappa B

NI: não-imunizado

NK: matadora natural

NO: óxido nítrico

PAF: fator de agregação plaquetária

PBS: tampão salina fosfato

PECAM: molécula de adesão célula endotelial-plaqueta

pg: picograma (s)

PGE₂: prostaglandina E₂

RANTES: citocina regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais

s.c.: subcutânea

TCR: receptor de células T

Th: T auxiliar

TNF- α : fator de necrose tumoral

v.o.: via oral

VCAM: molécula de adesão vascular

μ L: microlitro

ng: nanograma

5-LO: enzima 5-lipoxigenase

RESUMO

RESUMO

Os neutrófilos estão envolvidos na resposta inflamatória aguda, e contribuem para a inflamação e destruição da articulação características da artrite reumatóide. Neste estudo, avaliamos a participação de diversos mediadores inflamatórios envolvidos no recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular no modelo de artrite induzida por albumina bovina sérica metilada (mBSA) e o mecanismo pelo qual este recrutamento ocorre. Nós encontramos que a administração intra-articular de mBSA em animais imunizados, porém, não em animais controles, induziu um acúmulo de neutrófilos na cavidade articular de maneira dose e tempo dependentes, o qual era inibido por repertaxina (antagonista dos receptores CXCR1 e CXCR2), por anticorpos anti-CXCL1 e anti-CXCL5, e por MK 886 (inibidor da síntese de leucotrienos), porém, não por BN 50730 (antagonista do receptor de PAF). Confirmando a participação destes mediadores, observamos que as concentrações de CXCL1, CXCL5 e leucotrieno B₄ (LTB₄) estavam elevadas no exsudato articular dos animais imunizados e desafiados com mBSA e ainda, a administração intra-articular destes mediadores quimiotáticos induziu uma elevada migração de neutrófilos. Além disso, a repertaxina inibiu a produção de LTB₄ no exsudato articular e o MK 886 reduziu a migração de neutrófilos para a cavidade articular induzida por CXCL1 e por CXCL5. Em resumo, as quimiocinas CXC (CXCL1 e CXCL5) e LTB₄ atuando seqüencialmente estão envolvidos na migração de neutrófilos no modelo de artrite induzida por mBSA. Desta maneira, a inibição das quimiocinas CXCL1 e CXCL5 e de LTB₄ são sugeridos como novas terapias para a artrite reumatóide.

Palavras chaves: migração de neutrófilos; artrite reumatóide; quimiocina CXCL1; quimiocina CXCL5; leucotrieno B₄.

ABSTRACT

ABSTRACT

Neutrophils are involved in acute inflammatory responses, and contribute to the inflammation and joint destruction characteristic in the rheumatoid arthritis. In this study, we evaluated the participation of several inflammatory mediators involved in the neutrophil migration into the articular cavity on antigen-induced arthritis model and the mechanism underlying this recruitment. We found that intraarticularly administration of methyl-bovine serum albumin (mBSA) in immunized, but not in control mice, induced a dose- and time-dependent neutrophil accumulation, which was inhibited by repertaxin (CXCR1 and CXCR2 receptor antagonist), anti-CXCL1 and anti-CXCL5 antibodies, and by MK 886 (leukotrienes synthesis inhibitor). Confirming the participation of these mediators, high amounts of CXCL1, CXCL5 and leukotriene B₄ (LTB₄) were detected in the articular exudates. Furthermore, we demonstrated that repertaxin inhibits the production of LTB₄ in articular exudates and that neutrophil recruitment induced by CXCL1 and CXCL5 was inhibited by MK 886. In summary, CXC chemokines (CXCL1 and CXCL5) and LTB₄ acting sequentially are involved in the neutrophil migration in mBSA-induced arthritis model. Therefore, inhibition of CXCL1 and CXCL5 chemokines or LTB₄ is suggested as potential therapeutic immunointervention in the rheumatoid arthritis.

Key words: Neutrophil migration; rheumatoid arthritis; CXCL1 chemokine; CXCL5 chemokine; leukotriene B₄.

ÍNDICE

1. Introdução	23
1.1 – Migração de Neutrófilos	24
1.1.1 – Aspectos Gerais	24
1.1.2 – Mediadores envolvidos no recrutamento de neutrófilos	26
1.1.2.1 – Quimiocinas	29
2 – Artrite Reumatóide	32
2. Objetivos	35
3. Materiais e Métodos	37
3.1 – Animais	38
3.2 – Drogas, LTB ₄ , quimiocinas e anticorpos	38
3.3 – Procedimento de imunização e desafio com mBSA	39
3.4 – Migração de neutrófilos para a cavidade articular induzida por mBSA	39
3.4.1 – Contagem total dos leucócitos	39
3.4.2 – Contagem diferencial dos leucócitos	39
3.5 – Técnica histológica	40
3.6 – Dosagens de quimiocinas e LTB ₄	40
3.7 – Protocolos experimentais	42
3.8 – Análise estatística dos resultados	44
3.9 – Preparo de soluções e reagentes	44
4. Resultados	46
4.1 – Modelo de artrite reumatóide induzida por mBSA	47
4.2 – Participação de quimiocinas CXC na migração de neutrófilos para a cavidade articular no modelo de artrite induzida por mBSA	50
4.3 – Participação de LTB ₄ na migração de neutrófilos para a cavidade articular no modelo de artrite induzida por mBSA	55
4.4 – Quimiocinas CXC atuando via LTB ₄ medeiam a migração de neutrófilos para a cavidade articular no modelo de artrite induzida por mBSA	61
5. Discussão	65
6. Referências Bibliográficas	72

1. INTRODUÇÃO

1.1. MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS

1.1.1 – Aspectos Gerais

O processo inflamatório local é desencadeado após o contato do organismo com um agente agressor podendo este ser infeccioso ou não. Neste processo, a mobilização adequada e em tempo hábil dos leucócitos da microcirculação para o foco inflamatório é um evento essencial para a proteção do hospedeiro contra as infecções (MALECH e GALLIN, 1987; WAGNER e ROTH, 2000; MARTIN e LEIBOVICH, 2005). No entanto, em doenças inflamatórias a presença de leucócitos no foco inflamatório é prejudicial ao organismo, contribuindo para o estabelecimento das lesões tissulares (WEISSMANN e KORCHAK, 1984; WEISS, 1989).

Na maioria dos processos inflamatórios, os neutrófilos são os primeiros leucócitos a serem recrutados para o local de injúria tecidual. Estes permanecem de 12 a 24 horas no sítio inflamatório, ocorrendo posteriormente, um processo de morte celular programada (apoptose), e em seguida a fagocitose destas células por macrófagos. Eosinófilos, macrófagos e linfócitos aparecem progressivamente a partir da 6^a hora, permanecendo no sítio inflamatório por cerca de uma semana, porém, se o agente agressor não for removido, ocorre a perpetuação e cronificação do processo (KUBES, 1993; ROSSI e HELLEWELL, 1994; GARRELLY *et al.*, 1991).

O processo da migração de neutrófilos durante a resposta inflamatória é intermediado por diferentes mediadores inflamatórios e quimiotáticos, os quais promovem um aumento nas interações entre os neutrófilos e as células endoteliais, favorecendo a migração destes leucócitos a favor do gradiente de concentração entre a área lesada e as vênulas pós-capilares (HUTTENLOCHER *et al.*, 1995). Deste modo, os neutrófilos apresentam inicialmente um rolamento sobre o endotélio vascular mediado por uma família de moléculas de adesão denominadas selectinas. As selectinas endoteliais (P- e E-selectinas) ligam-se, através de seu domínio lectina, a região sialil-Lewis X de algumas glicoproteínas como as moléculas PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) e ESL-1 (E-selectin ligand-1) presentes na membrana dos leucócitos,

enquanto que a L-selectina, expressa constitutivamente por todos os leucócitos, liga-se a um grupo de oligossacarídeos sialomucina presente na superfície das células endoteliais (WATSON *et al.*, 1990; ALBELDA *et al.*, 1994; YANG *et al.*, 1999). Estas ligações específicas, embora fracas, resultantes da interação entre as selectinas e seus ligantes, favorecem a diminuição da velocidade com que os neutrófilos passam pelos vasos sanguíneos. Este fenômeno de rolamento leucocitário permite que ocorra a ativação das integrinas presentes nos neutrófilos combinada com um aumento na expressão das moléculas da superfamília das imunoglobulinas no endotélio, resultando em uma forte adesão entre os neutrófilos e as células endoteliais. Esta aderência permite que os neutrófilos penetrem principalmente através das junções intercelulares (diapedese) presente nas células endoteliais, degradando a membrana basal com o auxílio de enzimas proteolíticas e se dirijam ao local da inflamação (HUTTENLOCHER *et al.*, 1995; WAGNER e ROTH, 2000; LEY *et al.*, 2002).

Uma vez presente no sítio inflamatório, os neutrófilos são capazes de fagocitar, destruir e degradar os microrganismos, sendo a destruição destes realizada por mecanismos dependentes de oxigênio, nitrogênio e enzimas proteolíticas. Os neutrófilos possuem um sistema enzimático oxidativo, acoplado a membrana plasmática, conhecido como NADPH oxidase, o qual é responsável pelo aumento do metabolismo oxidativo, também conhecido como *explosão respiratória*. Neste sistema, ocorre uma transferência de elétrons do NADPH intracelular para o oxigênio, reduzindo-o a anion superóxido (O_2^-), o qual pode ser rapidamente convertido a peróxido de hidrogênio e este a radicais hidroxilas, denominados genericamente de intermediários reativos do oxigênio (MALECH & GALLIN, 1987; BELLAVITE, 1988). Em geral, as quantidades de peróxido de hidrogênio formado, descrito no processo acima, não são capazes de induzir uma destruição eficaz dos microrganismos. No entanto, os grânulos azurófilos (lisossomos verdadeiros ou grânulos primários) dos neutrófilos contêm a enzima mieloperoxidase (MPO), que na presença de íons Cl^- , converte o peróxido de hidrogênio em hipoclorito, sendo este importante para a destruição do agente injuriante (KLEBANOFF *et al.*, 1970). Uma outra substância altamente reativa utilizada por neutrófilos para exercer

sua função microbicida é o óxido nítrico (NO). Neutrófilos ativados expressam a enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), que leva a produção de NO. Uma vez formado, o NO pode interagir com espécies reativas de oxigênio, levando a formação de múltiplos metabólitos antimicrobianos como peroxinitrito, S-nitrosotiois e o dióxido de nitrogênio (MULLIGAN *et al.*, 1991; MATHEIS *et al.*, 1992). Os neutrófilos também podem destruir os microrganismos por mecanismos independentes de oxigênio, através da ação de substâncias presentes em seus grânulos citoplasmáticos, tais como, defensina, lisozimas, elastases, catepsinas, hidrolases ácidas localizadas nos grânulos azurófilos e por colagenases e lactoferrinas presentes nos grânulos secundários ou específicos (DALE, 1984; LEHRER, 1988).

Como descrito anteriormente, apesar do recrutamento de neutrófilos durante o processo infeccioso ser crucial para o controle deste evento, a ocorrência de uma resposta inflamatória exacerbada gera efeitos deletérios e indesejáveis, visto que, os neutrófilos liberam enzimas proteolíticas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que contribuem para as lesões teciduais. Este fenômeno pode ocorrer em doenças auto-imunes como a artrite reumatóide, síndrome da glomerulonefrite, doença inflamatória intestinal e vasculite imune (RUTGERS *et al.*, 2003; KRISTJANSSON *et al.*, 2004; WONG e LORD, 2004) e também em doenças de origem não-imunológica, tais como a doença pulmonar obstrutiva crônica e lesão de reperfusão na doença isquêmica do miocárdio (O'DONNELL *et al.*, 2004; SAEED *et al.*, 2005).

1.1.2 – Mediadores envolvidos no recrutamento de neutrófilos

Como descrito acima, a migração direcionada dos neutrófilos ao foco inflamatório é mediada por diferentes fatores inflamatórios e quimiotáticos liberados, principalmente, pelas células residentes. Conforme relatado na literatura, diversas substâncias estão envolvidas no recrutamento de neutrófilos, entre estas, destacam-se os derivados lipídicos como o leucotrieno B₄ (LTB₄) e o fator de agregação plaquetária (PAF), as citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 17 (IL-17), IL-15, IL-18 e a IL-1 β , componentes do sistema complemento como o C5a, e uma variedade de

quimiocinas incluindo quimiocina CXC ligante 8 (CXCL8, IL-8), CXCL1 (oncogene regulador do crescimento, GRO- α), CXCL5 (peptídeo ativador de neutrófilos derivado de células epiteliais, ENA-78), CXCL2 (proteína-2 inflamatória de macrófagos, MIP-2), quimiocina CC ligante 3 (CCL3, proteína 1- α inflamatória de macrófago, MIP-1 α) e CCL4 (proteína 1- β inflamatória de macrófago, MIP-1 β) (MANTOVANI *et al.*, 1997; FIGARELLA-BRANGER *et al.*, 2003, MUNDER *et al.*, 1993; BINDER *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2002; FERNANDES *et al.*, 2005).

O LTB₄ é um produto derivado da cascata do ácido araquidônico produzido, principalmente, por monócitos e por células polimorfonucleares. A síntese dos leucotrienos ocorre a partir da liberação do ácido araquidônico dos fosfolípidos de membrana por ação de enzimas fosfolipases A₂. Em seguida, no envelope nuclear, o ácido araquidônico liberado pode ser metabolizado a 5-HPETE e posteriormente a LTA₄ por ação da enzima 5-lipoxigenase (5-LO). Para que esta enzima possa exercer sua atividade catalítica, ela precisa ser translocada do citoplasma ao núcleo por um mecanismo dependente de cálcio e ser apresentada ao ácido araquidônico através da proteína ativadora da 5-LO (FLAP). O LTA₄ por sua vez é convertido em LTB₄ por ação da enzima LTA₄ hidrolase (DENNIS, 1997; PETERS-GOLDEN e BROCK., 2001).

Diversas ações são atribuídas ao LTB₄, dentre as quais destacam-se a potente atividade quimiotática para neutrófilos, a capacidade de inibir a apoptose de neutrófilos, estimulação do fator nuclear κ B levando a síntese de CXCL8 e indução da produção e liberação de hidrolases lisossomais e de intermediários reativos de oxigênio (SERHAN *et al.*, 1982; VICENTE *et al.*, 2001; LIN *et al.*, 2005; HEBERT *et al.*, 1996; SAMUELSSON *et al.*, 1987; AOKI., 1998). É importante ressaltar que o LTB₄ é cerca de 10 a 1000 vezes mais potente que o PAF na indução de respostas quimiotáticas de neutrófilos, e também atua aumentando a aderência destas células ao endotélio vascular (NOHGAWA *et al.*, 1997).

Para que ocorram as ações biológicas do LTB₄ é necessário a sua ligação com receptores de membrana acoplados à proteína G, conhecidos como BLT1 e BLT2. O receptor BLT1, um receptor de alta afinidade, é expresso exclusivamente nos leucócitos e medeia principalmente a atividade

quimiotática e adesiva do LTB₄, enquanto que o BLT2 é um receptor de baixa afinidade e parece estar envolvido na liberação de enzimas lisossomais, aumento do metabolismo oxidativo, além de também ser descrito como promotor de quimiotaxia (GOLDMAN *et al.*, 1987; YOKOMIZO *et al.*, 1997; CROOKS e STOCKELEY., 1998; YOKOMIZO *et al.*, 2000). Ainda, o LTB₄ possui um receptor nuclear, o PPAR α (fator de transcrição) que quando ativado pelo LTB₄ induz a produção de enzimas envolvidas no metabolismo do LTB₄, aumentando assim a sua degradação (DEVCHAND *et al.*, 1996; LIN *et al.*, 1999).

Outro importante mediador lipídico e quimioatraente para os neutrófilos é o PAF, sendo produzido por diferentes tipos celulares como os monócitos, neutrófilos, células endoteliais, células glomerulares e fibroblastos (MICHEL *et al.*, 1992). Diversos estudos demonstraram que o PAF estimula a agregação plaquetária, ativação e desgranulação de neutrófilos e eosinófilos, síntese de prostaglandinas e LTC₄, entre outros efeitos (BENVENISTE *et al.*, 1981; O'FLAHERTY *et al.*, 1984). INGRAHAM *et al.* (1982) mostraram que a estimulação de neutrófilos humanos com o PAF é capaz de induzir inúmeras atividades celulares incluindo quimiotaxia. Recentemente, GAUDREAULTE *et al.* (2005) mostraram que o PAF, sinalizando através do receptor BLT1 de LTB₄, induz desgranulação e quimiotaxia para neutrófilos humanos.

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que apresenta papel chave em diversos processos, como a inflamação, imuno-modulação, crescimento, angiogênese e citotoxicidade (AGGARWAL e NATARAJAN, 1996; TAYLOR *et al.*, 2004). Está bem descrito na literatura, a participação do TNF- α no recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório (CANETTI *et al.*, 2001; SAUNDERS *et al.*, 2005). Embora, o TNF- α não seja considerado um fator quimiotático clássico, uma vez que não induz migração de neutrófilos *in vitro*, este promove a síntese e liberação de fatores quimiotáticos, como as quimiocinas, tanto pelas células endoteliais quanto pelas células residentes (FACCIOLI *et al.*, 1990).

Diversos estudos demonstraram a participação do TNF- α na migração de neutrófilos em diversos modelos de reação inflamatória, tais como a artrite

reumatóide induzida por colágeno do tipo II e em doenças inflamatórias humanas, como a doença inflamatória intestinal e a artrite reumatóide (BECK e WALLACE, 1997; KUWABARA *et al.*, 2000; CANETTI *et al.*, 2001). Deste modo, terapias com anticorpo neutralizante para o TNF α e com receptores solúveis do TNF- α estão sendo utilizados para reduzir a inflamação em pacientes com artrite reumatóide ou com doença inflamatória intestinal (WOOLEY *et al.*, 1993; REIMOLD, 2002; FLEISCHMANN e SHEALY, 2003).

CANETTI *et al.* (2003) demonstrou que a IL-18 está envolvida na migração de neutrófilos para o sítio inflamatório, através do modelo de artrite induzida por colágeno II. Outra citocina, a IL-17, produzida principalmente por célula T CD4⁺ de memória, tem sido classificada como uma citocina pró-inflamatória, indutora da síntese de quimiocinas, bem como de ICAM-1 e PGE₂, dentre outros mediadores envolvidos na migração neutrofílica (AGGARWAL *et al.*, 2003).

A IL-15 promove a liberação de quimiocinas e citocinas (incluindo TNF- α) de células T sinoviais (McINNIS *et al.*, 1997), além do sinergismo com a IL-2 para a indução da proliferação de clones de células Th1 (SEDER, 1995, 1996). Ademais, suas atividades biológicas incluem a capacidade de ativar neutrófilos, recrutamento e ativação de células T, diferenciação das células NK, produção de IFN- γ , co-estimulação do crescimento de células B e produção de imunoglobulina (WALDMANN e TAGAYA, 1999).

1.1.2.1 – Quimiocinas

As quimiocinas têm sido descritas como importantes quimioatraentes e ativadores de neutrófilos, monócitos, eosinófilos e linfócitos (PERRETI & GETTING, 2003), sendo demonstrada pela primeira vez esta propriedade quimioatraente através de ensaio de quimiotaxia para neutrófilos usando CXCL8 (YOSHIMURA *et al.*, 1987). O nome destas substâncias foi proposto no “III Simpósio Internacional de Citocinas Quimiotáticas” através da junção das palavras quimioatraentes e citocinas (OPPENHEIM, 1991).

As quimiocinas são proteínas básicas com cerca de 70 a 125 aminoácidos, com peso molecular entre 6 e 14 Kd e produzidas por genes

distintos localizados nos cromossomos humanos 4, 9, 16 e 17 (MURPHY *et al.*, 2000). Estruturalmente, as quimiocinas apresentam quatro resíduos de cisteína conservados em quase todos os grupos, formando duas pontes dissulfeto intramoleculares essenciais. Com base nestas características estruturais conservadas, as quimiocinas foram classificadas de acordo com o número de aminoácidos presentes entre os dois primeiros resíduos de cisteína. Deste modo, as CC ou α -quimiocinas apresentam estes resíduos adjacientemente ligados, as CXC ou β -quimiocinas possuem um aminoácido entre os resíduos e as CX₃C ou δ -quimiocinas possuem três aminoácidos entre os dois primeiros resíduos de cisteína. Além destas, foi descrita uma quimiocina que possui apenas dois resíduos de cisteína em sua estrutura, denominada de C ou γ -quimiocina (BAGGLIONI *et al.*, 1994; KELNER *et al.*, 1994). As ações biológicas das duas maiores subfamílias de quimiocinas, CXC e CC, diferem quanto à capacidade de estimular diferentes tipos de células efectoras (CLARK-LEWIS *et al.*, 1995). Os neutrófilos são atraídos para o local inflamatório principalmente por quimiocinas CXC como a CXCL8, a CXCL5, as CXCL1/2/3 (oncogene regulador do crescimento (GRO/ $\alpha/\beta/\gamma$)) e a CXCL7 (peptídeo-2 ativador de neutrófilos, NAP-2), enquanto que linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos são atraídos preferencialmente por quimiocinas CC como a CCL13 (proteína quimiotática para monócitos, MCP-4), a CCL5 (citocina regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais, RANTES) e a CCL11 (eotaxina) (AHUJA e MURPHY, 1996; ELSNER *et al.*, 1998; FIGARELLA-BRANGER *et al.*, 2003).

Dentro da subfamília das quimiocinas CXC, estas são divididas de acordo com a presença da seqüência de três aminoácidos (glutamato-leucina-arginina, ELR) localizados próximo ao N-terminal, precedendo a primeira cisteína. A presença desta seqüência parece estar relacionada com a especificidade quimiotática sobre neutrófilos, sendo a classe das CXC-ELR⁺ específicas para células mielóides, enquanto que a classe das CXC-ELR⁻ atraem uma variedade de leucócitos. Entre as quimiocinas CXC-ELR⁺ encontram-se as quimiocinas CXCL8, CXCL5, CXCL1, CXCL2 entre outras, sendo a quimiocina CXCL8 considerada como protótipo de ativação e quimiotaxia para neutrófilos (ROLLINS, 1997; LAING e SECOMBES, 2004).

Algumas destas quimiocinas CXC-ELR⁺ foram detectadas em humanos e também em outras espécies de animais como coelhos e cães, porém, não foram encontradas em camundongos. Neste roedor, as quimiocinas CXCL2 (MIP-2) e CXCL1 (KC), são consideradas homólogas murino das quimiocinas humanas CXCL8 (IL-8) e do grupo das CXCL1/2/3 (GRO- α , - β e - γ), respectivamente (OQUENDO *et al.*, 1989; TEKAMP-OLSON *et al.*, 1990). Ademais, a quimiocina CXCL5 (LIX) encontrada em camundongos, apresenta acentuada homologia com a sequência de aminoácidos da quimiocina humana CXCL5 (ENA-78) (SMITH *et al.*, 1997). Estudos mostram que a quimiocina CXCL5 apresenta um importante papel na hematopoiese, na amplificação de cascata inflamatória e como quimioatraente para neutrófilos (BLACKWELL *et al.*, 2000; CHOONG *et al.*, 2004). Outros trabalhos demonstram que as quimiocinas CXCL1 e CXCL2 apresentam potente atividade quimiotática tanto em modelos experimentais *in vitro* como *in vivo*. A síntese e secreção dessas quimiocinas, como outras quimiocinas CXC-ELR⁺, podem ser induzidas por estímulos exógenos como o LPS e por citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e o TNF- α (INTRONA *et al.*, 1987; SHEN *et al.*, 1989; DRISCOLL *et al.*, 1995a).

Os efeitos específicos das quimiocinas devem-se a ligações específicas destas com receptores acoplados à proteína G, presentes na superfície das células alvo. Muitos dos eventos promovidos pelas quimiocinas são inibidos por toxinas da *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 (BOKOCH, 1995). Em humanos, cinco tipos de receptores (CXCR1 a CXCR5) foram identificados em ligar seletivamente quimiocinas da classe CXC e oito receptores para a classe CC já foram identificados (MURPHY, 1996; ZLOTNIK *et al.*, 1999). Outro tipo de receptor identificado foi denominado de DARC ("Duffy antigen receptor for chemokines") e possui sítio de ligação tanto para a subfamília de quimiocinas CXC como para as CC, entretanto esta interação não induz o processo de sinalização intracelular 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 inflamação (HADLEY e PEIPER, 1997).

Com relação aos receptores CXCR1 e CXCR2, pertencentes à subfamília das quimiocinas CXC, estes são expressos na maioria dos leucócitos, mas parece ser funcional apenas para neutrófilos, monócitos/macrófagos e mastócitos (NILSSON *et al.*, 1999; MURPHY *et al.*, 2000). Estes receptores formam ligações de alta afinidade com a CXCL8 e com a CXCL6 (proteína quimiotática para granulócitos, GCP-2), enquanto que outras quimiocinas como a CXCL7 e a CXCL1 formam ligações de alta afinidade somente com o receptor CXCR2 (LEE., *et al.*, 1992; WUYTS *et al.*, 1997). Desta forma o receptor CXCR1 apresenta uma maior especificidade para a CXCL8 e para a CXCL6 enquanto que o CXCR2 é considerado como sendo um receptor promíscuo, podendo responder a várias quimiocinas CXC. Em humanos, o aumento do recrutamento neutrofilico foi correlacionado positivamente com um aumento da expressão dos genes para CXCL5 e CXCL8 associada com uma maior expressão dos genes para CXCR2 e CXR1, respectivamente (QIU *et al.*, 2003). Embora haja evidências que camundongos expressem somente o receptor CXCR2, recentes resultados demonstram que CXCR1 também é expresso em espécies animais (FU *et al.*, 2005). Neste contexto, substâncias que inibam estes receptores de quimiocinas, assim como repertaxina, têm sido testadas para reduzir a ativação e recrutamento de neutrófilos.

2. ARTRITE REUMATÓIDE

A artrite reumatóide é uma doença inflamatória crônica com patogênese auto-imune que resulta em destruição da cartilagem e osso, sendo caracterizada por infiltrado de neutrófilos, células T, células B e macrófagos na sinóvia e fluido nos espaços peri-articulares (HARRIS, 1990). Embora os modelos experimentais não mimetizam a complexidade da artrite reumatóide humana, estes modelos apresentam muitas características histológicas semelhantes à artrite reumatóide humana (TRENTHAM *et al.*, 1977). Nos últimos anos, tem sido muito utilizado o modelo de artrite induzida por antígeno (AIA), sendo a proteína albumina bovina sérica metilada (mBSA) utilizada na forma de antígeno solúvel associada ao adjuvante de Freud, o qual é usado para dirigir a resposta imune para um padrão de resposta Th1. Deste modo,

estudos em modelos experimentais têm resultado em um melhor entendimento do papel de diferentes tipos celulares e mediadores inflamatórios no desenvolvimento da artrite.

Dentre os diferentes tipos celulares envolvidos na artrite, estudos têm demonstrado que os neutrófilos desempenham um papel crucial na artrite, onde eles regulam e orquestram não apenas a resposta inflamatória aguda, mas também a inflamação crônica e regulação imune (KASAMA *et al.*, 2005). O envolvimento dos neutrófilos na patogênese da artrite reumatóide tem sido demonstrado utilizando-se diferentes modelos experimentais, como por exemplo, o modelo animal K/BxN (WIPKE e ALLEN, 2001). Recentemente, foi descoberto que camundongos K/BxN desenvolvem artrite espontaneamente, sendo estes animais provenientes do cruzamento de animais NOD com animais KRN. Os animais NOD possuem o MHC II com alteração genética na molécula Ag⁷ e desta forma tem a capacidade de apresentar um peptídeo resultante da clivagem da glicose-6-fosfato isomerase (GPI) ao receptor de células T (TCR) transgênico de animais KRN. O resultado desta interação é a produção de citocinas, que estimula a produção de anticorpos contra os peptídeos da GPI (auto-anticorpos). A transferência de soro de animais K/BxN, que contém os auto-anticorpos para animais C57/Bl6, também induz uma reação inflamatória específica na articulação mimetizando o modelo animal K/BxN, indicando que a transferência destes auto-anticorpos é suficiente para induzir inflamação na articulação (KOUSKOFF *et al.*, 1996). Utilizando-se este modelo, demonstrou-se que animais depletados de neutrófilos com o uso de anticorpo monoclonal, mostraram-se resistentes aos efeitos inflamatórios do soro artritogênico de animais K/BxN. Interessantemente, a depleção dos neutrófilos 5 dias após a transferência do soro reverteu a reação inflamatória das articulações (WIPKE e ALLEN, 2001). Estes resultados demonstram o papel fundamental dos neutrófilos na iniciação e manutenção do processo inflamatório nas articulações.

Como descrito anteriormente, as citocinas e quimiocinas participam do recrutamento de neutrófilos em várias condições inflamatórias, como também na artrite reumatóide (HARRIS, 1990; KOCH *et al.*, 1991). A importância das citocinas e quimiocinas na fisiopatologia da artrite reumatóide foi demonstrada

tanto em humanos quanto em modelos animais (FELDMANN *et al.*, 1996). De fato, vários desses mediadores têm sido encontrados no líquido sinovial de pacientes com artrite, como o TNF- α , a IL-1 β e a CXCL8 (FONTANA *et al.*, 1982; DI GIOVINE *et al.*, 1988; BRENNAN *et al.*, 1990). Além disto, modelos experimentais de artrite, como por exemplo a artrite induzida por colágeno, podem ser efetivamente tratados com anticorpos monoclonais contra o TNF α ou com antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra) apresentando uma melhora na doença bem como uma menor incidência (THORBECKE *et al.*, 1992; PIGUET *et al.*, 1992; WOOLEY *et al.*, 1993).

Com relação as quimiocinas, foi demonstrado, utilizando-se o modelo de AIA, que o tratamento com um antagonista não peptídico do receptor CXCR2, efetivamente reduz a migração de neutrófilos, o que se correlaciona muito bem com uma diminuição das lesões observadas (PODOLIN *et al.*, 2002). De modo semelhante, o tratamento com anticorpo contra CXCL5 antes do estabelecimento da AIA leva a uma diminuição da severidade da inflamação do joelho, mostrando a participação da quimiocina CXCL5, ligante do receptor CXCR2, na progressão da artrite (HALLORAN *et al.*, 1999). Outro grupo de pesquisadores relatou que a quimiocina CXCL1 também apresenta um importante papel na migração de neutrófilos para a articulação em pacientes com artrite reumatóide, sendo que a CXCL1 é responsável por 28% da atividade quimiotática para neutrófilos enquanto que a ação combinada de CXCL1, CXCL5 e CXCL8 é responsável por 50% da atividade quimiotática no fluido sinovial (KOCH *et al.*, 1995).

Além das quimiocinas, é descrito que o LTB₄ provoca ativação neutrofílica e está envolvido na artrite reumatóide (DADVIDSON *et al.*, 1983; FORD-HUTCHINSON, 1990). Um recente estudo utilizando o modelo de artrite induzida por colágeno, evidenciou que a IL-18 ativa a produção de TNF- α , o qual induz a síntese de LTB₄, que por sua vez atrai neutrófilos para o sítio inflamatório, onde estes podem contribuir para a resposta inflamatória aguda e crônica (CANETTI *et al.*, 2003).

Embora, vários mediadores inflamatórios participem no recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular, os mecanismos pelos quais estes mediadores induzem migração neutrofílica na artrite reumatóide não estão totalmente entendidos.

2. OBJETIVOS

Objetivos da Pesquisa

Como relatado anteriormente, os mediadores inflamatórios são essenciais no recrutamento de neutrófilos para o local inflamatório. Apesar destes mediadores estarem envolvidos em doenças inflamatórias de origem imune, como por exemplo, na artrite reumatóide, os mecanismos pelos quais estes induzem migração neutrofílica não estão totalmente elucidados. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo investigar os mediadores, bem como os mecanismos envolvidos na migração de neutrófilos para a cavidade articular em modelo de artrite reumatóide experimental.

Objetivos Específicos:

1. Caracterizar o perfil dose e tempo-resposta da migração de neutrófilos para a cavidade articular no modelo de artrite induzida por mBSA;
2. Investigar a participação das quimiocinas CXC (CXCL1 e CXCL5), dos mediadores lipídicos (LTB₄ e PAF) e da citocina TNF- α no recrutamento de neutrófilos induzido por mBSA em camundongos imunizados;
3. Avaliar o potencial de cada um dos mediadores inflamatórios envolvidos neste modelo em induzir migração de neutrófilos, quando administrados separadamente;
4. Investigar uma possível seqüência na liberação destes mediadores envolvidos na migração de neutrófilos para a cavidade articular no modelo de artrite experimental induzido por mBSA.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Animais

Foram utilizados camundongos Balb/c, machos e fêmeas, pesando entre 18-22 g. Os animais foram mantidos sob condições de temperatura (22-25°C), sem restrição hídrica ou dietética (*ad libitum*) e ciclo claro/escuro controlados. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o comitê de ética para animais de experimentação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

3.2 – Drogas, LTB₄, quimiocinas e anticorpos

Drogas, LTB₄, quimiocinas e anticorpos	Veículo
– Albumina bovina sérica metilada (mBSA) (Sigma, St Louis, MO, EUA)	Adjuvante de Freud (FA)
– MK 886 (Calbiochem, Canadá)	Carboximetilcelulose 0,1%
– BN 50730 (Sigma, St Louis, MO, EUA)	Salina 0,9%
– Talidomida (Champion Farmoquímico, Brasil)	Salina 0,9%
– Antagonista dos receptores CXCR1 e CXCR2 para quimiocinas (repertaxina) (Dompe Pharmaceuticals, L'Aquila, Itália)	Salina 0,9%
– LTB₄ (Cayman, Michigan, EUA)	Salina 0,9%
– CXCL1 (Peptotech, México)	Salina 0,9%
– CXCL5 (Peptotech, México)	Salina 0,9%
– Anticorpo anti-CXCL1 murino (Peptotech, México)	Salina 0,9%
– Anticorpo anti-CXCL5 murino (Peptotech, México)	Salina 0,9%

3.3 – Procedimento de imunização e desafio com mBSA - (Modelo de artrite induzida por antígeno)

Camundongos Balb/c foram imunizados, através de injeção subcutânea (s.c.), com uma emulsão contendo 200 μ L de volumes iguais de PBS e adjuvante completo de Freud (CFA), na qual estava dissolvida 500 μ g de mBSA. No 7^o e 14^o dia após a primeira imunização foram administrados (s.c.) reforços da emulsão com adjuvante incompleto de Freud (IFA). Os animais falso-imunizados receberam o mesmo tratamento aplicado aos demais, porém sem a administração de mBSA. No 21^o dia, os animais imunizados foram desafiados com mBSA (10 μ g/cavidade) através de injeção intra-articular (articulação fêmur-tibial).

3.4 – Migração de neutrófilos para a cavidade articular induzida por mBSA

Para a avaliação da migração de neutrófilos, os camundongos foram sacrificados 24 horas após o desafio com mBSA e realizado o lavado intra-articular (2x) com 5 μ l de PBS contendo EDTA (1 mM). Este lavado foi diluído em 90 μ L de PBS/EDTA e a partir deste, realizadas a contagem total e diferencial dos leucócitos.

3.4.1 – Contagem total dos leucócitos

Alíquotas de 10 μ L do lavado articular foram diluídas em líquido de Turk, na proporção de 1:2, sendo a contagem total dos leucócitos realizada em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio óptico (aumento de 100x) e contador manual e expressa como número de células x 10⁴/cavidade articular.

3.4.2 – Contagem diferencial dos leucócitos

As lâminas para contagem diferencial foram preparadas por citocentrifugação de uma alíquota do lavado intra-articular (citospin; Shandon Lipshaw Inc, Pittsburgh, Pennsylvania, USA) e coradas pelo corante panótico

rápido (LaborClin; Produtos para Laboratório Ltda, Pinhais, PR, Brasil). As células foram examinadas em microscópio óptico através da objetiva de imersão em óleo (aumento de 1000 x), sendo contadas 100 células por lâmina, diferenciando-se quatro tipos celulares: neutrófilos, eosinófilos, mononucleares e mastócitos. A quantificação de cada tipo celular presente na cavidade articular foi calculada pela percentagem dessas células contadas nos esfregaços e pela quantidade de células totais obtidas na contagem total. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos x 10⁴/cavidade.

3.5 – Técnica histológica

A região da articulação fêmur-tibial foi isolada e imersa em formol tamponado a 10%, para fixação durante 24 horas. Em seguida os tecidos foram descalcificados em ácido tri-cloroacético (10%) por aproximadamente 18 horas. Esses tecidos foram então desidratados e incluídos em blocos de parafina. Cortes de 6 µm de espessura foram dispostos em lâmina de microscopia. As lâminas foram coradas segundo a técnica de coloração com Hematoxilina e Eosina. Os cortes foram analisados em microscópio (Nikon, Japão) com aumento de 50x e 1000x, as imagens foram captadas por câmera digital (Coolpix 4500, Roper Scientific, Japão) armazenadas em computador e editadas utilizando o software Adobe Photo Shop 9.0.

3.6 – Dosagens de quimiocinas e LTB₄

Os camundongos foram sacrificados 3 ou 12 horas após o desafio para a quantificação das quimiocinas (CXCL1 e CXCL5) e de LTB₄. Para tal, foi realizado o lavado articular e centrifugado por 10 minutos a 180g. As dosagens de CXCL1 e de CXCL5 foram determinadas através do método imunoenzimático ligado a enzima (ELISA) e de LTB₄ através do método imunoenzimático (EIA) descritos a seguir:

Placas de microtitulação (96 poços) foram recobertas com 50 µL/ poço do anticorpo específico anti-CXCL1 (2 µg/mL) ou anti-CXCL5 (1 µg/mL). Estes anticorpos foram diluídos em solução de ligação (binding buffer) pH 9.0 e

incubados por 18-24 horas a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas três vezes com PBS/Tween-20 (0.05% Sigma) e incubadas por 2 horas em temperatura ambiente com 100 µL de uma solução a 1% de albumina bovina no intuito de evitar ligações não específicas. Em seguida, as amostras e o padrão (curva padrão) contendo as quimiocinas CXCL1 e CXCL5 em várias diluições foram adicionados nas placas (50 µL) e incubados por 18-24 horas a 4°C. Após esse período, as placas foram novamente lavadas e incubadas com 50 µL dos anticorpos policlonais biotinizados específicos para CXCL1 (0,2µg/mL) e para CXCL5 (0,1µg/mL) por 1h em temperatura ambiente. As placas foram lavadas e o conjugado avidina-HRP diluída 1:5000 foi adicionado para cada poço e as placas incubadas por 30 minutos. As placas foram lavadas e 50 µL do substrato dihidrocloro de 1,2-fenilenodiamina (OPD, sol 0,4 mg OPD – 0,4 µL H₂O₂ – 1mL tampão) foi adicionado. Após 15 min, a reação foi interrompida com 50 µL de H₂SO₄ (1 M) e a densidade óptica (DO) medida a 490 nm em espectrofotômetro (Spectra Max-250, Molecular Devices). Os resultados foram expressos em pg/ mL de CXCL1 ou CXCL5, baseando-se na curva padrão para cada quimiocina.

A concentração de LTB₄ nas amostras foi determinada através do uso de um LTB₄ EIA kit (Cayman Chemical) de acordo com as normas do fabricante. Brevemente, placa de microtitulação pré-coberta com anticorpo monoclonal anti-LTB₄ foi adicionada com LTB₄ recombinante murino em diluições seriadas (curva-padrão; base 2) ou com as amostras. Logo após, em todos os poços foram adicionados a enzima LTB₄-acetilcolinesterase e o anticorpo anti- LTB₄ e a placa foi incubada “overnight” à temperatura ambiente. Após incubação, a placa foi lavada e cada poço foi adicionado com 200 µL 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 (pg/mL), baseando-se na curva padrão.

3.7 – Protocolos Experimentais

Efeito da repertaxina, anticorpos anti-CXCL1 e anti-CXCL5, talidomida e soro anti-TNF α sobre o recrutamento de neutrófilos induzido por mBSA em camundongos imunizados

Os animais imunizados foram pré-tratados s.c. com o veículo (0,2 mL; PBS), ou com repertaxina, antagonista dos receptores CXCR1 e CXCR2, na dose de 30 mg/Kg, 30 minutos antes ou 8 horas após o desafio com mBSA ou com talidomida, inibidor da síntese de TNF- α , na dose de 50 mg/kg, 1 hora antes ou 8 horas após o desafio com mBSA. Os anticorpos anti-CXCL1 (i.a.; 250 ng/cavidade) ou anti-CXCL5 (i.a.; 250 ng/cavidade) ou o soro anti-TNF α foram administrados concomitantemente com a mBSA. O lavado articular foi coletado 24 horas após o desafio com a mBSA (i.a.; 10 μ g/cavidade; 10 μ L). Em seguida, a migração dos neutrófilos foi determinada nas amostras do lavado, sendo também avaliada em camundongos não-imunizados (NI) e desafiados com mBSA e, em camundongos imunizados e desafiados com PBS (controle; 10 μ L).

Efeito do MK 886 e BN 50730 sobre a migração de neutrófilos à cavidade articular em animais imunizados e desafiados com mBSA

Os animais imunizados foram pré-tratados v.o. com o veículo (0,1 mL de PBS; v.o.), ou com MK 886, droga inibidora da proteína acopladora FLAP e por conseguinte da síntese de leucotrienos, na dose de 1 mg/kg, 1 h antes do desafio. Outro grupo de animais imunizados foram tratados s.c., 30 min antes e 8 h após o desafio, com BN 50730, antagonista do receptor de PAF. A migração de neutrófilos foi avaliada 24 horas após o desafio com mBSA (i.a.; 10 μ g/cavidade; 10 μ L), sendo também avaliada em camundongos não-imunizados (NI) e desafiados com mBSA e em camundongos imunizados e desafiados com PBS (controle; 10 μ L).

Migração de neutrófilos para a cavidade articular induzida por CXCL1, CXCL5 e por LTB₄

Os animais foram injetados i.a. com PBS (controle), ou com a quimiocina CXCL1 (1 e 10 ng/cavidade), ou com a CXCL5 (1 e 10 ng/cavidade), ou com o LTB₄ (5 ou 50 ng/cavidade). A migração dos neutrófilos foi determinada 6 h após a administração dos estímulos inflamatórios.

Efeito da repertaxina sobre os níveis de LTB₄ presente no exudato articular de camundongos imunizados e desafiados com mBSA

Para a dosagem de LTB₄, os camundongos imunizados foram pré-tratados s.c. com o veículo (0,2 mL; PBS), ou com repertaxina, antagonista dos receptores CXCR1 e CXCR2, na dose de 30 mg/Kg, 30 minutos antes do desafio com mBSA. Os animais não-imunizados foram injetados i.a. com mBSA e animais imunizados foram desafiados com PBS (i.a.; 10 µL; grupo controle). O lavado articular foi coletado 3 horas após a administração dos estímulos. Em seguida, amostras do lavado foram centrifugadas a 180 g por 10 minutos, para a realização do EIA.

Efeito do MK 886 sobre o recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular induzida por CXCL1 ou por CXCL5

Os camundongos foram pré-tratados v.o. com o veículo (0,1 mL de PBS; v.o.), ou com MK 886, droga inibidora da proteína acopladora FLAP e por conseguinte da síntese de leucotrienos, na dose de 1 mg/kg, 1 h antes da administração i.a. das quimiocinas. A migração de neutrófilos foi avaliada 6 horas após a administração i.a. de CXCL1 ou de CXCL5, na dose de 10 ng/cavidade, sendo também avaliada em animais do grupo controle (injetados i.a. com 10 µL de PBS).

Efeito da repertaxina sobre a migração de neutrófilos à cavidade articular induzida por LTB₄

Os animais imunizados foram pré-tratados s.c. com o veículo (0,2 mL; PBS), ou com repertaxina, antagonista dos receptores CXCR1 e CXCR2, na dose de 30 mg/Kg, 30 minutos antes da administração de LTB₄. A migração de neutrófilos foi avaliada 6 horas após a administração i.a. de LTB₄, na dose de 50 ng/cavidade, sendo também avaliada em animais do grupo controle (injetados i.a. com 10 µL de PBS).

3.8 – Análise estatística dos resultados

Nos casos de diferentes tratamentos, o teste de análise de variância (ANOVA) foi utilizado para comparar as alterações entre eles. Em todos os casos, comparações individuais foram testadas com teste t de Bonferroni (comparações múltiplas) ou teste t de Student (comparação entre duas amostras) para amostras não pareadas. O número (n) de animais por grupo experimental está descrito nas figuras. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para valores de $P < 0.05$.

3.9 – Preparo de soluções e reagentes

Solução de Tampão Salina-fosfato (PBS):

Cloreto de Sódio (NaCl, Merck).....	8,0 g
Cloreto de Potássio (KCl, Merck).....	0,2 g
Fosfato de Sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄ , Merck).....	1,15 g
Fosfato de Potássio monobásico (KH ₂ PO ₄ , Merck).....	0,2 g
Água deionizada Milli-Q q.s.p.....	1L

O pH foi ajustado para 7,2 com NaOH ou HCl e a solução autoclavada e estocada em garrafas estéreis a 4°C antes de ser utilizada.

PBS/EDTA (1mM)

PBS.....100 mL
EDTA (Merck).....37,2 mg

Líquido de Turk

Ácido acético glacial P.A. (Merck)20 mL
Azul de metileno (Merck).....0,5 g
Água Milli-Q q.s.p.....1 L

Corante Panótico Rápido (LaborClin)

Panótico rápido nº 1: solução de triarilmetano a 0,1%.
Panótico rápido nº 2: solução de xantenos a 0,1%.
Panótico rápido nº 3: solução de tiazinas a 0,1%.

Tampões utilizados para o ensaio de ELISA

Solução de ligação (binding buffer) pH 9.0

Na₂PO₄ (Merck)..... 0.1M

Tampão substrato pH 5.0

Ácido cítrico (Merck).....34.7mM
Na₂PO₄ (Merck).....66.7 mM

Substrato

OPD (Sigma).....0.4 mg
H₂O₂ (Merck).....0.4µL
Tampão substrato q.s.p.....1 mL

4. RESULTADOS

4.1 – Modelo de artrite reumatóide induzida por mBSA

Animais imunizados e desafiados com mBSA (1, 3 ou 10 μg /cavidade) apresentaram um significativo aumento no número de neutrófilos presentes na cavidade articular de maneira dose e tempo-dependente (**Figura 1**). Como demonstrado na **Figura 1A**, quando comparado com os animais imunizados e desafiados com PBS (controle), observamos que a administração (i.a.) de mBSA nas doses de 3 e 10 μg /cavidade induziram um recrutamento significativo de neutrófilos para a cavidade articular em animais imunizados, sendo a migração induzida na dose de 10 μg superior à induzida pela dose de 3 μg . Demonstramos também que a administração de mBSA (i.a.) em animais não-imunizados não foi capaz de promover uma significativa migração de neutrófilos (**Figura 1A**). Ademais, nos animais imunizados e desafiados com mBSA (i.a.; 10 μg /cavidade) houve um acentuado acúmulo de neutrófilos na 6^a e 12^a hs, com pico na 24^a h, tendo um declínio na 48^a h e voltando aos níveis basais na 96^a h após o desafio (**Figura 1B**). As características histológicas mostraram que, 24 h após o desafio com mBSA, a articulação do joelho afetada exibiu proeminente recrutamento de neutrófilos (**Figura 1D**), quando comparado com a articulação de camundongos imunizados com PBS (**Figura 1C**).

A eficácia do protocolo de imunização com mBSA e adjuvante de Freund foi verificada através da titulação de IgG anti-mBSA presente no soro dos animais utilizados. Desta maneira, verificamos que camundongos imunizados apresentaram quantidades elevadas do anticorpo em todas as diluições realizadas (**Tabela 1**). Em contrapartida, a titulação do soro obtido de animais não-imunizados apresentou baixa concentração de IgG anti-mBSA (**Tabela 1**).

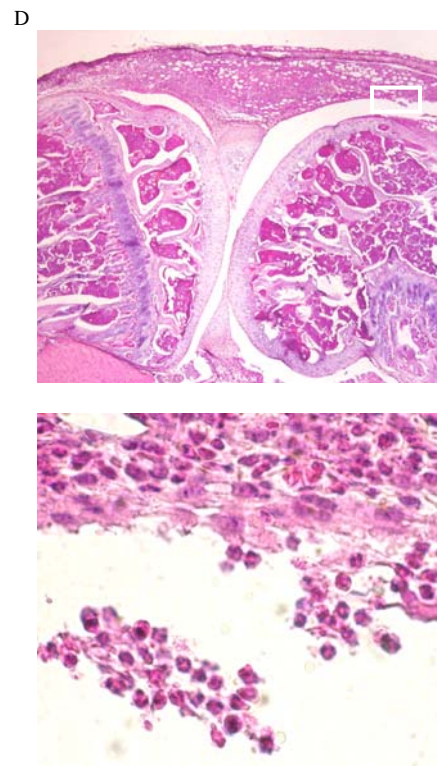
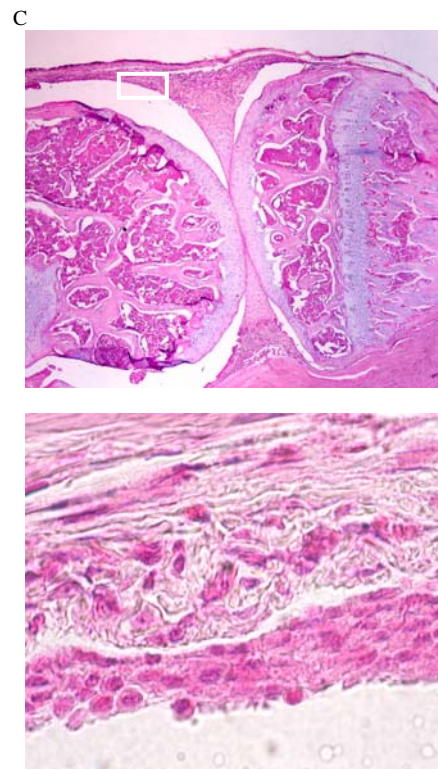
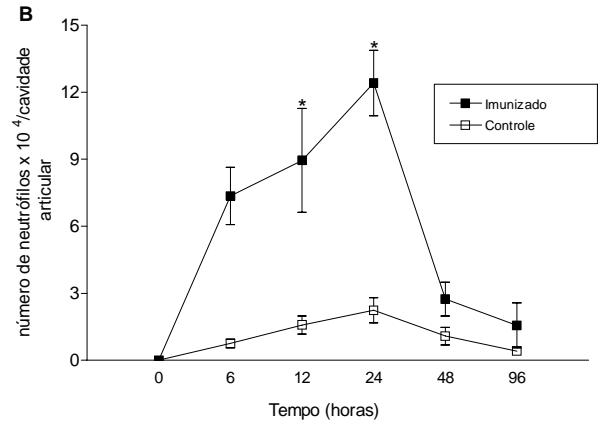
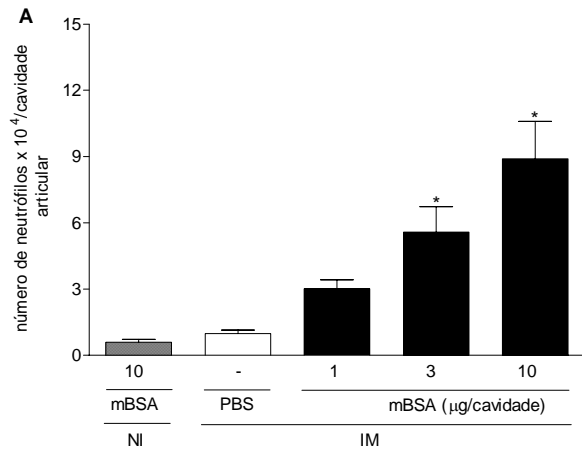


Tabela 1. Titulação de IgG α -mBSA do soro de camundongos não-imunizados ou imunizados com mBSA

Diluição	Animais não-imunizados	Animais imunizados
10^2	0,240 \pm 0,104	0,756 \pm 0,018
10^3	0,219 \pm 0,091	0,748 \pm 0,036
10^4	0,161 \pm 0,022	0,734 \pm 0,009
10^5	0,104 \pm 0,016	0,733 \pm 0,013
10^6	0,090 \pm 0,017	0,675 \pm 0,037

Os resultados estão expressos como média \pm EPM e são representativos de dois diferentes experimentos (n=5) * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo não-imunizado (Teste t de Student).

4.2 – Participação de quimiocinas CXC na migração de neutrófilos para a cavidade articular no modelo de artrite induzida por mBSA

Com o intuito de avaliar o envolvimento de quimiocinas CXC e TNF- α na migração de neutrófilos induzida por mBSA em animais imunizados, submetemos os animais imunizados, 30 min antes e 8 h após o desafio, ao tratamento com repertaxina (30 mg/Kg; s.c.), antagonista do receptor CXCR2, e observamos que houve uma significativa redução na migração de neutrófilos, 24 horas após o desafio com mBSA (i.a.; 10 μ g/cavidade; **Figura 2**). Ainda, a administração concomitante do anticorpo anti-CXCL1 (i.a.; 250 ng/cavidade) ou do anticorpo anti-CXCL5 (i.a.; 250 ng/cavidade) com a mBSA (i.a.; 10 μ g/cavidade) também reduziu significativamente o recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular (**Figura 2**). Entretanto, os animais imunizados pré-tratados 1 h antes e 8 h após o desafio com talidomida (50 mg/kg; s.c.), inibidor da síntese de TNF- α , ou administrado soro anti-TNF α junto com a mBSA, não apresentaram diminuição do recrutamento neutrofílico (**Figura 2**), indicando que o TNF- α , diferentemente das quimiocinas CXC, não está envolvido nesta migração de neutrófilos induzida por mBSA em animais imunizados. Ademais, a talidomida quando administrada nesta mesma dose é capaz de inibir a migração de neutrófilos induzida por LPS. Confirmando resultados anteriores, a administração i.a de PBS ou mBSA.; (10 μ g/cavidade) em animais imunizados ou em animais não-imunizados, respectivamente, não foram capazes de induzir uma significativa migração de neutrófilos (**Figura 2**).

Uma vez observado que o bloqueio do receptor CXCR2 e que os anticorpos anti-CXCL1 e anti-CXCL5 modulam negativamente a migração de neutrófilos nos animais imunizados e desafiados com mBSA, investigamos se os níveis das quimiocinas CXC (CXCL1 e CXCL5) estariam aumentados nos exsudatos articulares obtidos destes animais. Nossos resultados demonstram um aumento significativo na concentração de CXCL1 presente no exsudato articular coletado 3 e 12 h após o desafio com mBSA (i.a.; 10 μ g/cavidade) em animais imunizados em relação aos animais imunizados e desafiados com PBS (**Figura 3A**). Com relação à concentração de CXCL5, observamos um aumento significativo nos níveis de CXCL5 coletado 3 h após o desafio com mBSA (i.a.;

10 μg /cavidade) em animais imunizados em relação aos animais imunizados e desafiados com PBS, entretanto, 12 h após o desafio, não foi observado diferença significativa na concentração de CXCL5 entre os dois grupos (**Figura 3B**).

Considerando estes resultados, testamos a hipótese da capacidade de indução da migração de neutrófilos promovida pelo CXCL1 e pelo CXCL5. Deste modo, a administração (i.a.) de CXCL1 (**Figura 4A**) e de CXCL5 (**Figura 4B**), na dose de 10 ng/cavidade induziram uma significativa migração de neutrófilos em camundongos Balb/c 6 h após o estímulo.

Estes resultados em conjunto, sugerem o envolvimento das quimiocinas ligantes do receptor CXCR2, CXCL1 e CXCL5, no recrutamento de neutrófilos induzido por mBSA em camundongos imunizados.

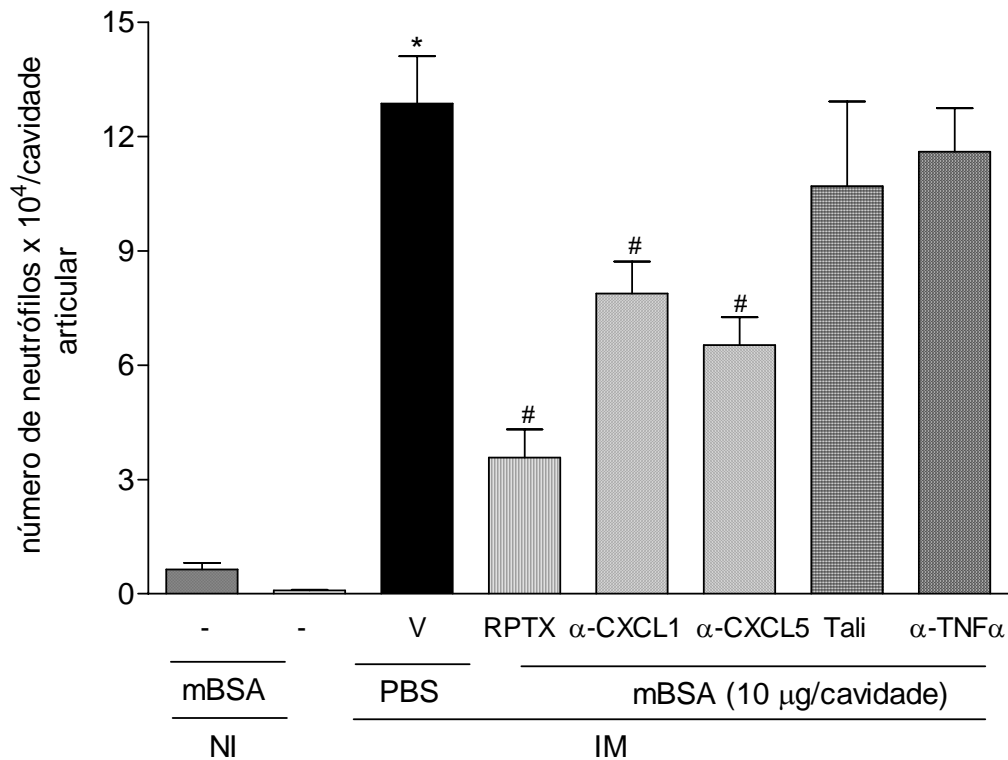


Figura 2. Repertaxina, anticorpos anti-CXCL1 e anti-CXCL5 reduzem a migração de neutrófilos induzida por mBSA em animais imunizados.

Os animais foram pré-tratados 30 min antes ou 8 h depois do desafio com PBS (veículo; V), repertaxina (RPTX; 30 mg/Kg.; s.c.) ou 1 h antes e 8 h depois com PBS (veículo; V), talidomida (Tali; 50 mg/Kg; s.c.) e desafiados i.a. com mBSA (10 μg/cavidade). Os anticorpos anti-CXCL1 (α-CXCL1; i.a.; 250 ng/cavidade) ou anti-CXCL5 (α-CXCL5; i.a.; 250 ng/cavidade) ou o soro anti-TNF-α (α-TNFα) ou seus respectivos controles, anticorpo anti-IgG e soro controle, foram administrados juntos com a mBSA (i.a.; 10 μg/cavidade). A migração de neutrófilos foi avaliada 24 h após o desafio, sendo também avaliada em camundongos não-imunizados (NI) e desafiados com mBSA e em camundongos imunizados e desafiados com PBS (controle). Os resultados estão expressos como média ± EPM (n=5). **P*<0,05 quando comparado aos animais controle. #*P*<0,05 quando comparado aos animais imunizados e desafiados com mBSA (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

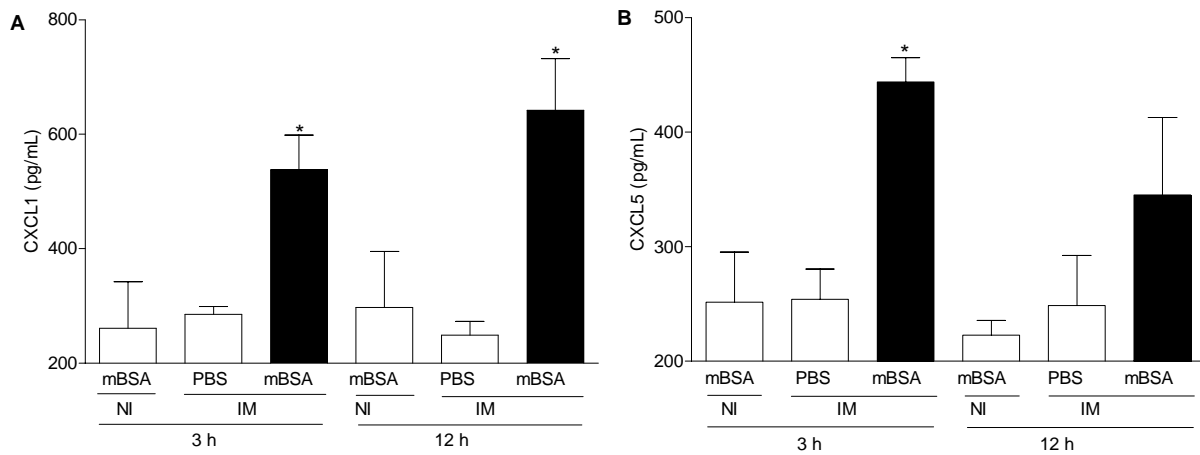


Figura 3. Concentrações de CXCL1 e CXCL5 nos exsudatos articulares de camundongos imunizados e desafiados com mBSA. As concentrações de CXCL1 (A) e CXCL5 (B) foram determinadas 3 e 12 h após o desafio com PBS (controle) ou mBSA (10 µg/cavidade) em camundongos imunizados (IM). As concentrações de CXCL1 e de CXCL5 também foram determinadas em camundongos não-imunizados (NI) e desafiados com mBSA. Os resultados estão expressos como média ± EPM (n=3). * $P < 0,05$ quando comparado aos animais controle (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

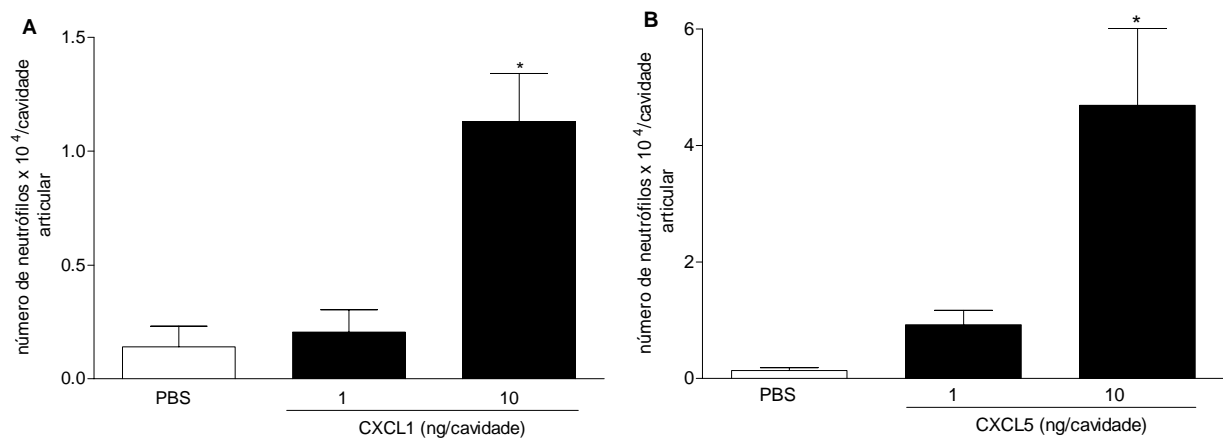


Figura 4. CXCL1 e CXCL5 induzem migração de neutrófilos para a cavidade articular. As barras representam o número de neutrófilos coletados das cavidades articulares de camundongos Balb/c desafiados 6 h antes com PBS, CXCL1 (**A**; 1 ou 10 ng/cavidade) ou CXCL5 (**B**; 1 ou 10 ng/cavidade). Os resultados estão expressos como média \pm EPM (n=5). * $P < 0,05$ quando comparado aos animais controle (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

4.3 – Participação de LTB₄ na migração de neutrófilos para a cavidade articular no modelo de artrite induzida por mBSA

Nosso próximo passo foi investigar o envolvimento do LTB₄ e do PAF sobre o influxo de neutrófilos induzido por mBSA em animais imunizados. Como mostra a **Figura 5**, o pré-tratamento dos animais imunizados com MK 886 (1 mg/kg; v.o.; 1 h antes do desafio), droga inibidora da proteína ativadora da 5-lipoxigenase (FLAP) e por conseguinte da síntese de leucotrienos, promoveu uma inibição significativa no recrutamento neutrofílico 24 h após o desafio com mBSA (i.a.; 10 µg/cavidade; **Figura 5**). Porém, os animais imunizados pré-tratados 30 min antes e 8 h após o desafio com BN 50730 (BN, s.c., 10 mg/Kg), antagonista do receptor de PAF, não apresentaram diminuição do recrutamento neutrofílico (**Figura 5**), excluindo a participação do PAF na migração de neutrófilos induzida por mBSA em animais imunizados. Corroborando a participação do leucotrieno na migração de neutrófilos induzida por mBSA, a **Figura 6** mostra que animais deficientes para a enzima 5-lipoxigenase (5-LO^{-/-}) imunizados apresentaram uma redução na migração de neutrófilos após o desafio com mBSA (i.a.; 10 µg/cavidade), quando comparados com seu controle (WT; 129 sv). Observamos também que a administração i.a de PBS ou mBSA.; (10 µg/cavidade) em animais imunizados ou em animais não-imunizados, respectivamente, não foram capazes de induzir uma significativa migração de neutrófilos (**Figura 6**).

Conforme mostra a **Figura 7**, houve um aumento significativo na concentração de LTB₄ presente no exsudato articular coletado 3 e 12 h após o desafio com mBSA (i.a.; 10 µg/cavidade) em animais imunizados em relação aos animais imunizados e desafiados com PBS. Também foi observado que animais não-imunizados apresentaram baixa concentração de LTB₄ nos tempos indicados. A partir do achado de que a migração de neutrófilos após imunização e desafio com mBSA é mediada por LTB₄, verificamos se a administração do LTB₄ também é capaz de induzir migração de neutrófilos de maneira semelhante ao observado em animais imunizados com mBSA. Deste modo, a administração de LTB₄ (i.a.; 50 ng/cavidade) induziu uma significativa

migração de neutrófilos em camundongos Balb/c 6 h após o estímulo (**Figura 8**).

Estes resultados em conjunto, mostram a participação do LTB₄ no recrutamento de neutrófilos promovido pela administração de mBSA em camundongos imunizados.

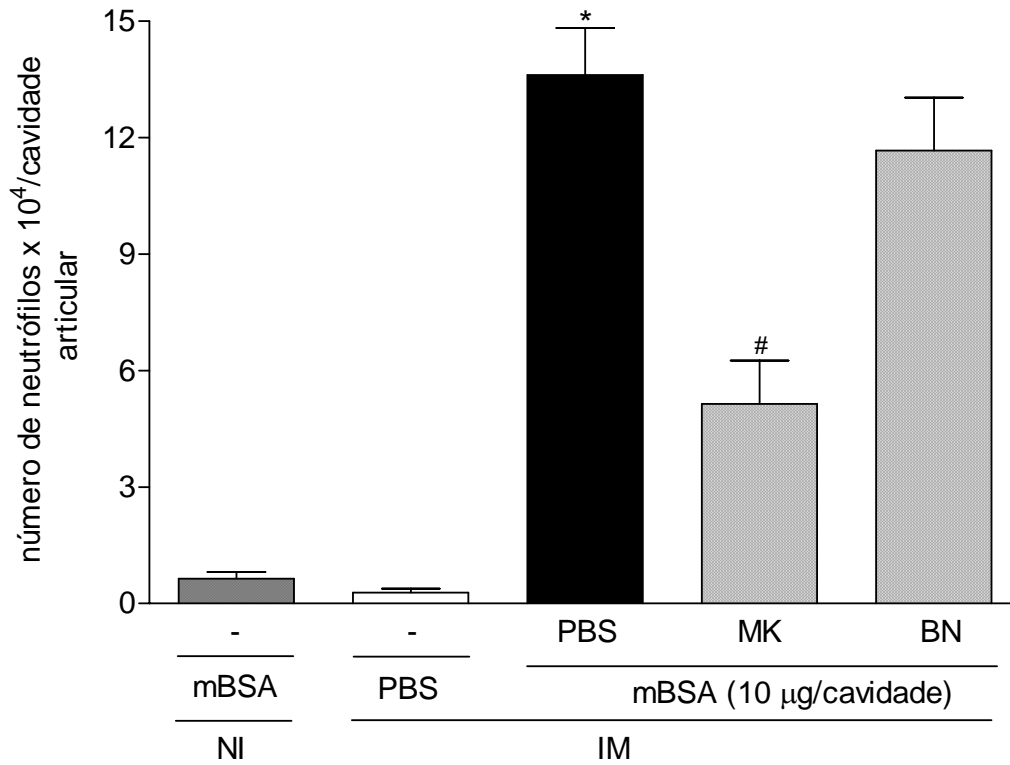


Figura 5. A migração de neutrófilos induzida por mBSA em animais imunizados é reduzida pelo pré-tratamento com MK 886. Camundongos imunizados (IM) foram pré-tratados 1 h antes com PBS, MK 886 (MK; 1 mg/Kg; v.o.) ou 30 min antes e 8 h após o desafio com BN 50730 (BN; 10 mg/Kg; s.c.), desafiados i.a. com mBSA (10 μg/cavidade) e a migração de neutrófilos foi avaliada 24 h após o desafio. A migração de neutrófilos também foi avaliada em camundongos IM e desafiados com PBS e em camundongos não-imunizados (NI) e desafiados com mBSA (i.a.; 10 μg/cavidade). Os resultados estão expressos como média ± EPM (n=5). * $P < 0,05$ quando comparado aos animais controle. # $P < 0,05$ quando comparado aos animais imunizados e desafiados com mBSA (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

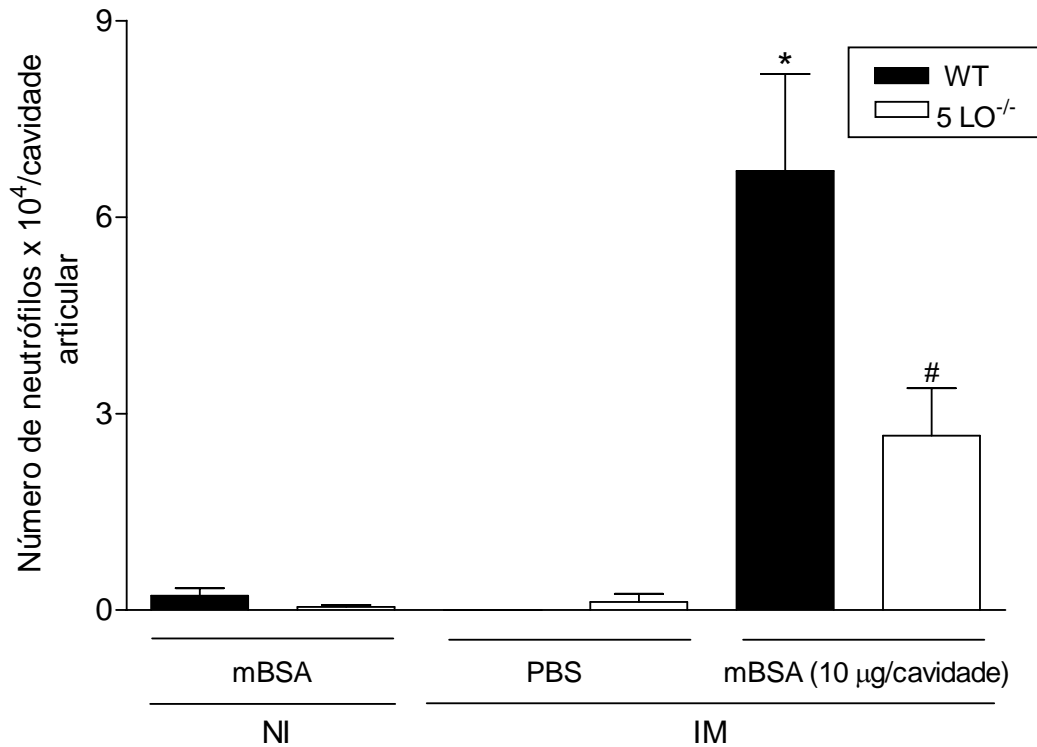


Figura 6. A migração de neutrófilos induzida por mBSA é dependente da síntese de leucotrieno em animais imunizados. As barras representam o número de neutrófilos coletados 24 h após o desafio i.a. com mBSA (10 µg/cavidade) em camundongos selvagens (WT; 129 sv) ou deficientes para a enzima 5-lipoxigenase (5-LO^{-/-}) imunizados (IM) ou não-imunizados (NI). A migração de neutrófilos também foi avaliada em camundongos IM e injetados i.a. com PBS (controle). Os resultados estão expressos como média ± EPM (n=5). * $P < 0,05$ quando comparado aos animais controle. # $P < 0,05$ quando comparado aos animais imunizados e desafiados com mBSA (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

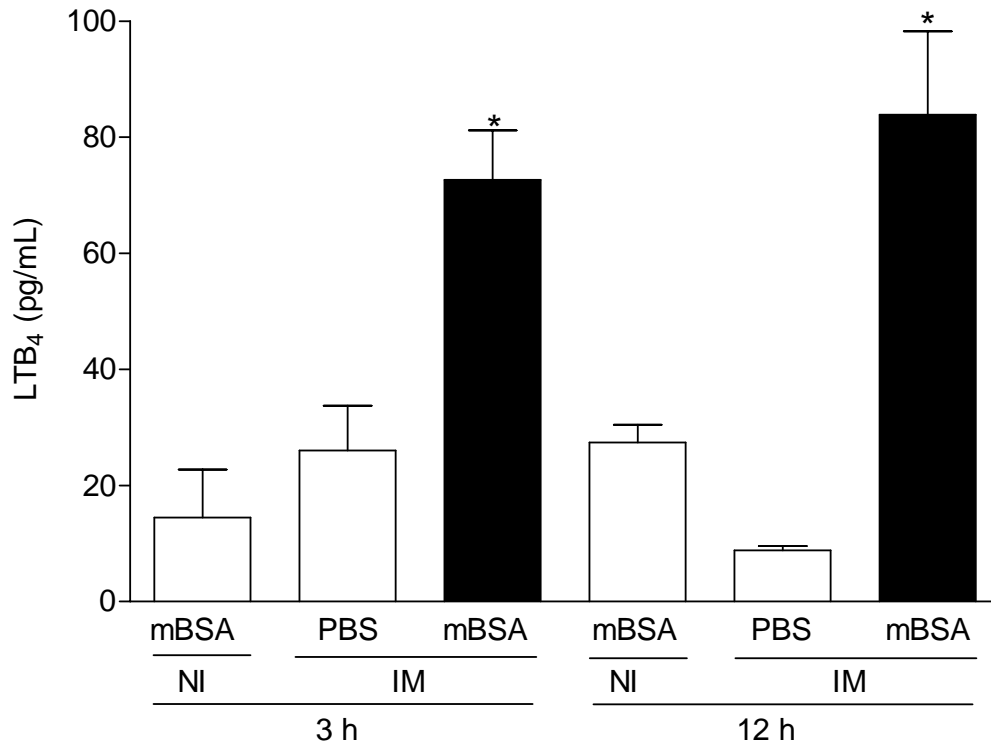


Figura 7. Concentração de LTB₄ no exsudato articular de camundongos imunizados e desafiados com mBSA. A figura representa a concentração de LTB₄ obtida do exsudato articular coletado 3 ou 12 h após o desafio com PBS ou mBSA (10 µg/cavidade) em camundongos imunizados (IM). A concentração de LTB₄ também foi determinada em camundongos não-imunizados (NI) e desafiados com mBSA. Os resultados estão expressos como média ± EPM (n=3). **P*<0,05 quando comparado aos respectivos animais controle (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

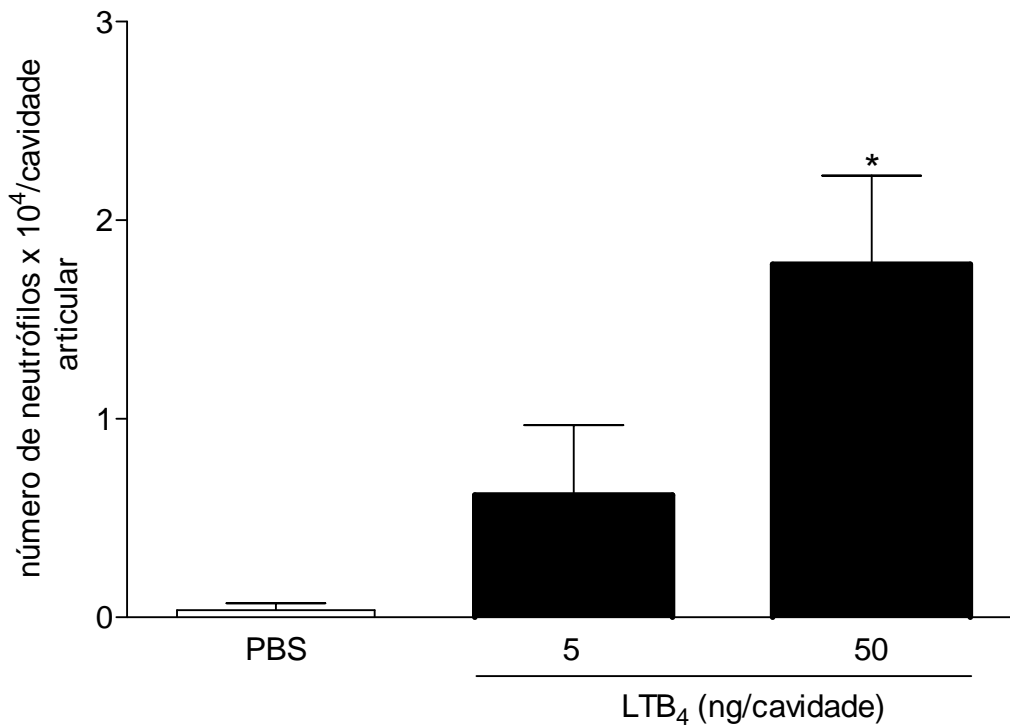


Figura 8. LTB₄ induz migração de neutrófilos para a cavidade articular. As barras representam o número de neutrófilos coletados das cavidades articulares de camundongos Balb/c desafiados 6 h antes com PBS (i.a.) ou LTB₄ (i.a.; 5 ou 50 ng/cavidade). Os resultados estão expressos como média ± EPM (n=5). * $P < 0,05$ quando comparado aos animais controle (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

4.4 – Quimiocinas CXC atuando via LTB₄ medeiam a migração de neutrófilos para a cavidade articular no modelo de artrite induzida por mBSA

Com a finalidade de determinarmos se existe interdependência dos mediadores inflamatórios envolvidos na migração de neutrófilos induzida por mBSA (CXCL1, CXCL5 e LTB₄), testamos primeiramente a hipótese da liberação seqüencial de quimiocinas CXC e LTB₄. Conforme observado na **Figura 9**, os animais imunizados pré-tratados 30 min antes com repertaxina (30 mg/Kg; s.c.), apresentaram uma significativa redução na concentração de LTB₄ presente no exsudato articular coletado 3 horas após o desafio com mBSA quando comparado com os níveis de LTB₄ em animais imunizados e desafiados com PBS. A fim de confirmarmos a dependência de leucotrieno para o recrutamento de neutrófilos induzido por CXCL1 e CXCL5, os animais foram pré-tratados com MK 886 (MK; 1 mg/Kg; v.o.) e os resultados apresentaram uma redução na migração de neutrófilos avaliada 6 horas após a administração i.a. de CXCL1 (**Figura 10A**; 10 ng/cavidade) e de CXCL5 (**Figura 10B**; 10 ng/cavidade).

Conforme mostra a **Figura 11**, animais pré-tratados 30 min antes com Repertaxina (RPTX, 30 mg/Kg; s.c.) não apresentaram uma redução na migração de neutrófilos avaliada 6 h após a administração i.a. de LTB₄ (50 ng/cavidade) quando comparados com os animais pré-tratados com PBS e administrados LTB₄, mostrando que a migração de LTB₄ não depende de quimiocinas CXC.

Esses resultados sugerem que a migração de neutrófilos induzida por mBSA em animais imunizados seja dependente da liberação das quimiocinas CXCL1 e CXCL5 e sequencialmente de LTB₄.

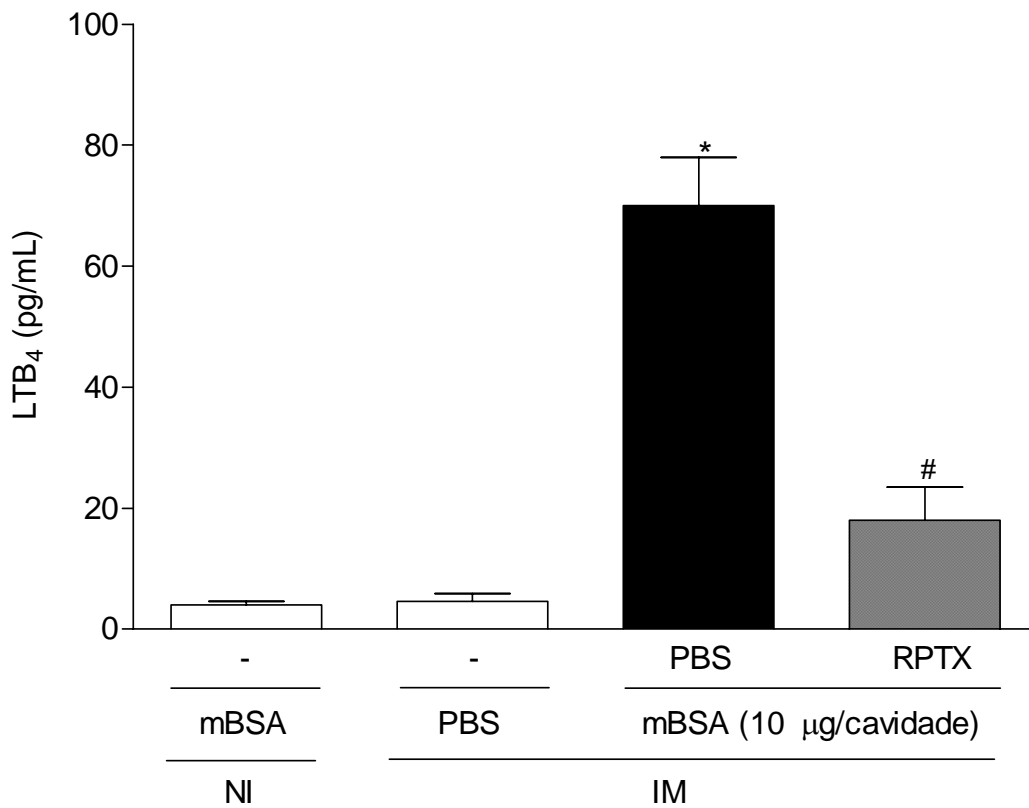


Figura 9. Repertaxina reduz a concentração de LTB₄ no exsudato articular de camundongos imunizados e desafiados com mBSA. Camundongos imunizados (IM) foram pré-tratados 30 min antes com PBS ou com Repertaxina (RPTX; 30 mg/Kg.; s.c.), desafiados i.a. com mBSA (10 µg/cavidade) e a concentração de LTB₄ foi determinada 3 h após o desafio com mBSA (10 µg/cavidade). A concentração de LTB₄ também foi determinada em camundongos IM e desafiados com PBS (controle) e em camundongos não-imunizados (NI) e desafiados com mBSA (i.a.; 10 µg/cavidade). Os resultados estão expressos como média ± EPM (n=3). **P*<0,05 quando comparado aos animais controle. #*P*<0,05 quando comparado aos animais imunizados e desafiados com mBSA (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

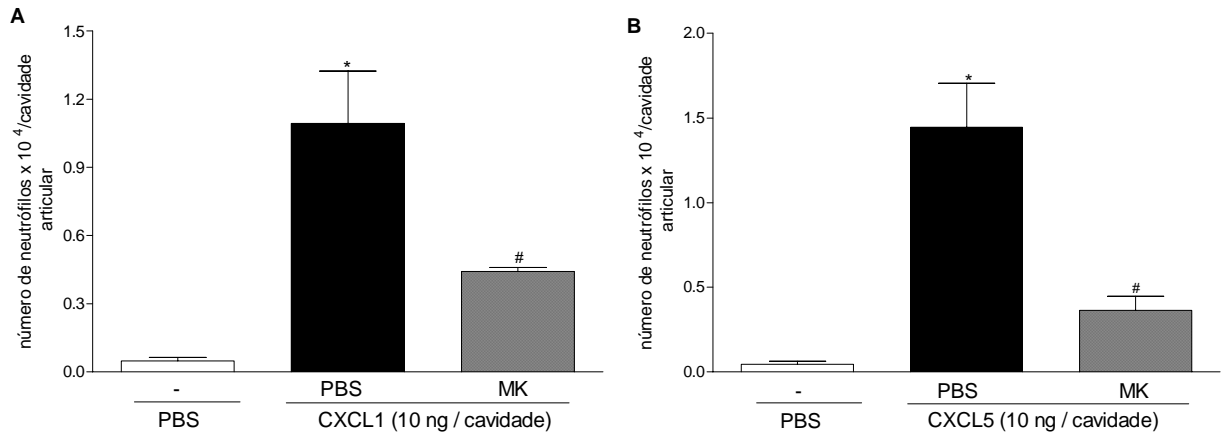


Figura 10. Inibição da migração de neutrófilos induzida por CXCL1 e por CXCL5 em animais pré-tratados com MK 886. As barras representam o número de neutrófilos coletados das cavidades articulares 6 h após a administração (i.a.) de PBS (controle), CXCL1 (**A**; 10 ng/cavidade) ou CXCL5 (**B**; 10 ng/cavidade) em animais pré-tratados 1 h antes com PBS ou com MK 886 (MK; 1 mg/Kg; v.o.). Os resultados estão expressos como média \pm EPM (n=5). * $P < 0,05$ quando comparado aos animais controle # $P < 0,05$ quando comparado aos animais desafiados com CXCL1 ou com CXCL5 (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

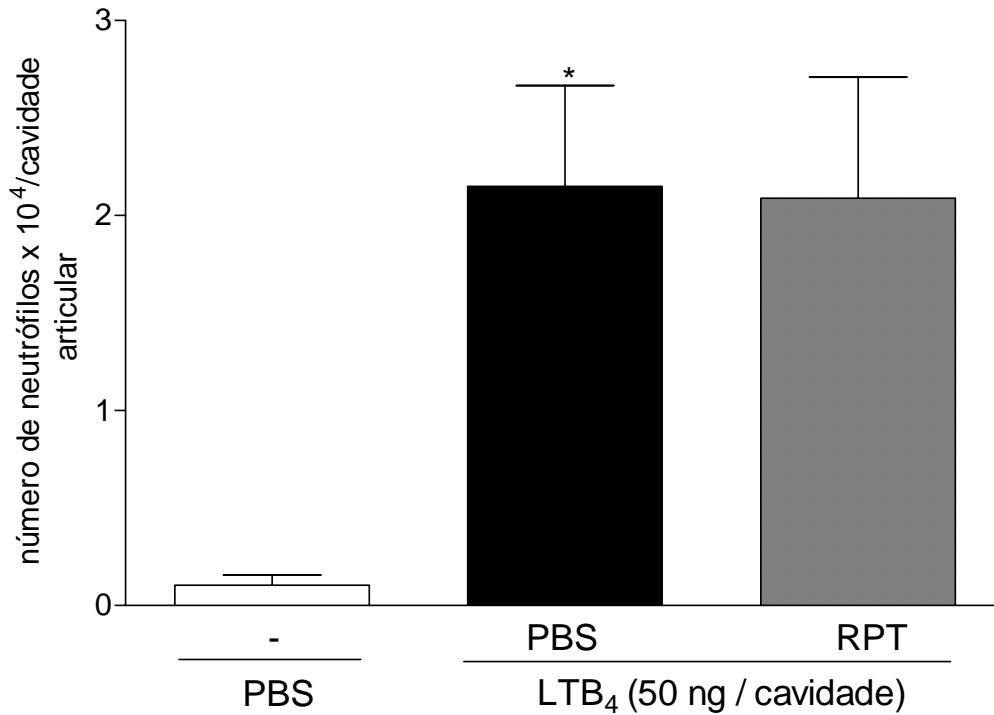


Figura 11. Repertaxina não reduz o recrutamento de neutrófilos induzido por LTB₄. Camundongos Balb/c foram pré-tratados com PBS ou com Repertaxina (RPTX, 30 mg/Kg; s.c.) e após 30 min foi administrado LTB₄ (i.a.; 50 ng/cavidade), sendo a migração de neutrófilos avaliada 6 h após a administração do estímulo. A migração de neutrófilos também foi avaliada em camundongos injetados com PBS (i.a.; controle). Os resultados estão expressos como média \pm EPM (n=5). * $P < 0,05$ quando comparado aos animais controle (“One-way ANOVA” com correção de Bonferroni).

5. DISCUSSÃO

Nos estágios iniciais de diversos processos inflamatórios, a célula predominante e primeiramente recrutada ao foco inflamatório é o neutrófilo (KUBES, 1993; ROSSI & HELLEWELL; 1994). A migração dos neutrófilos das vênulas pós-capilares até a área lesada é um processo multimediado, resultante da liberação por células residentes de fatores quimiotáticos, tais como TNF- α , IL-1- β , PAF, LTB₄ e diversas quimiocinas (MUNDER *et al.*, 1993; BINDER *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2002; STEBUT *et al.*, 2003). A liberação destes fatores leva a um aumento nas interações entre os neutrófilos e as células endoteliais com conseqüente recrutamento destes leucócitos. Este leucócito polimorfonuclear é responsável pela liberação de metabólitos tóxicos do oxigênio, nitrogênio, proteases e óxido nítrico, os quais, além de serem essenciais para a defesa do hospedeiro contra microrganismos invasores, também podem causar danos ao próprio tecido do hospedeiro, adjacente ao local inflamado. Neste sentido, a artrite reumatóide, uma doença inflamatória de origem imune, é caracterizada pela presença excessiva de neutrófilos no fluido sinovial das articulações afetadas (HARRIS, 1990; FIRESTEIN, 2003), sugerindo que parte do dano tecidual observado seja conseqüência da liberação de substâncias tóxicas por neutrófilos emigrados (HAMPTON *et al.*, 1998). Ademais, durante recidivas da artrite reumatóide ocorre um novo influxo de neutrófilos (EDWARDS e HALLET, 1997). O recrutamento de neutrófilos para o fluido sinovial ocorre como resultado da produção de mediadores quimiotáticos por macrófagos ativados, fibroblastos sinoviais e outras células na articulação inflamada. Entretanto, devido ao fato de pouco se conhecer sobre os mecanismos pelos quais os mediadores quimiotáticos induzem o recrutamento de neutrófilos da microcirculação para os tecidos peri-articulares, o estudo destes é de fundamental importância para uma melhor compreensão e possível controle da ativação e/ou recrutamento neutrofílico observados na artrite reumatóide humana.

No presente trabalho, utilizamos um modelo de artrite induzida por antígeno (AIA) com o objetivo de investigar a participação de quimiocinas CXC (CXCL1 e CXCL5), de mediadores lipídicos (LTB₄ e PAF) e da citocina TNF- α no recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular (articulação fêmur-tibial). O modelo de AIA, o qual utiliza mBSA como antígeno protéico e

adjuvante completo de Freud, apresenta características histopatológicas semelhantes às observadas na artrite reumatóide humana (COOKE e JASIN., 1972).

Na fase inicial do trabalho observamos que o desafio i.a. com mBSA induziu recrutamento de neutrófilos de forma dose e tempo dependentes em camundongos imunizados, o que não foi observado em animais não-imunizados. Observamos que a mBSA induziu migração de neutrófilos atingindo o pico na 24^a h, voltando a valores basais na 96^a h em animais sensibilizados. Em outros modelos de inflamação imune, a administração do antígeno protéico, OVA, também induz migração de neutrófilos em animais previamente imunizados (SHARP e SMITH., 1979; KLEIN *et al.*, 1995; CANNETI *et al.*, 2001).

Como descrito anteriormente, 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 *et al.*, 1990; FURIE e RANDOLPH, 1995; MOSER e WILLIMANN, 2004). As quimiocinas pertencentes à classe CXC-ELR⁺ são as quimiocinas descritas como principais envolvidas no recrutamento de neutrófilos para o tecido inflamado (BACON e OPPENHEIM, 1998; KOCH *et al.*, 1995; ROLLINS *et al.*, 1997) e podem se ligar a dois subtipos de receptores, CXCR1 e CXCR2. Embora existam evidências que camundongos expressem somente o receptor CXCR2, recentes resultados demonstram que o receptor CXCR1 também é expresso nestes animais (FU *et al.*, 2005, MOEPPS *et al.*, 2006). Desta forma, nosso próximo passo foi investigar a participação desta classe de quimiocinas na migração de neutrófilos observada no modelo de artrite induzida por mBSA. Observamos que a repertaxina, droga antagonista dos receptores CXCR1 e CXCR2, reduziu significativamente a migração de neutrófilos para a cavidade articular após a administração de mBSA. Neste contexto, a repertaxina tem sido testada para reduzir a ativação e recrutamento de neutrófilos (BERTINI *et al.*, 2004).

Dentre as quimiocinas CXC ligantes dos receptores CXCR1 e CXCR2, encontram-se as quimiocinas CXCL1 e CXCL5, entre outras, descritas como quimioatraentes para neutrófilos (KOCH *et al.*, 1994; KNOTT *et al.*, 2001).

Deste modo, investigamos a participação das quimiocinas CXCL1 e CXCL5 na migração de neutrófilos induzida por mBSA em animais imunizados. Nossos resultados demonstraram que a administração concomitante dos anticorpos anti-CXCL1 ou anti-CXCL5 e mBSA, inibiram significativamente o acúmulo de neutrófilos na cavidade articular em camundongos imunizados, sugerindo a participação destas quimiocinas CXC neste modelo. Ademais, observamos um aumento nas concentrações dessas quimiocinas na cavidade articular em animais imunizados e desafiados com mBSA quando comparado com os níveis destes mediadores em animais não-imunizados e desafiados com o antígeno ou em animais imunizados e desafiados com PBS. Ainda, a administração intra-articular das quimiocinas CXCL1 e CXCL5 induziu uma elevada migração de neutrófilos, como observado com a administração de mBSA em animais imunizados. Corroborando os nossos resultados, estudos anteriores demonstraram que as quimiocinas CXCL1 e CXCL5 participam na modulação do recrutamento de neutrófilos após desafio antigênico (KOCH *et al.*, 1994; KNOTT *et al.*, 2001).

Com relação à quimiocina CXCL5, COLLETTI *et al.*, (1995) demonstraram a participação desta quimiocina no recrutamento de neutrófilos para o pulmão utilizando o modelo de injúria por reperfusão e isquemia hepática. Além disto, outro estudo demonstrou a importância da quimiocina CXCL5 na progressão da artrite, uma vez que o tratamento com o anticorpo anti-CXCL5 antes do estabelecimento da artrite, resulta em um decréscimo na severidade da inflamação observada na articulação do joelho (HALLORAN *et al.*, 1999). Dados previamente publicados, sugerem que o aumento da expressão da quimiocina CXCL1 contribui significativamente para a migração e consequente acúmulo de neutrófilos na articulação inflamada de pacientes com artrite reumatóide (KOCH *et al.*, 1995). Outro estudo, utilizando o modelo de artrite experimental induzida por cristal de urato em coelhos, mostra que esta quimiocina contribui para o influxo de neutrófilos neste modelo (FUJIWARA *et al.*, 2002).

Outro importante mediador inflamatório pesquisado foi o TNF- α , uma vez que diversos estudos demonstram que tanto a artrite experimental, como a

artrite reumatóide humana podem ser tratadas com terapias anti-TNF α (PIGUET *et al.*, 1992; SIDDIQUI e SCOTT, 2005). Para isto, tratamos os animais imunizados com talidomida e verificamos o seu efeito na migração de neutrófilos induzida por mBSA. Estudos clínicos relatam que a talidomida possui efeito modulatório do sistema imune e propriedades anti-angiogênicas (CALDERON *et al.*, 1997; YASUI *et al.*, 2005). A talidomida também tem sido descrita com atividade anti-inflamatória, a qual está associada com a diminuição da expressão de citocinas, o que resulta da supressão da ativação do fator nuclear NF- κ B (KEIFER *et al.*, 2001). Outros estudos também demonstram que a talidomida inibe a produção de TNF- α e de IL-12 induzida por LPS, sugerindo que este efeito seja devido à inibição do fator de transcrição nuclear NF- κ B (TAVARES *et al.*, 1997; CORRAL *et al.*, 1999). No entanto, em nosso estudo, os animais imunizados tratados com talidomida apresentaram um recrutamento neutrofílico para a cavidade articular similar ao observado nos animais imunizados tratados com PBS e desafiados com mBSA. Ademais, quando administrado soro anti-TNF- α concomitante à mBSA, também não houve uma inibição na migração de neutrófilos quando comparado com animais que receberam soro-controle e mBSA. Em contraste com resultados existentes na literatura, nossos dados sugerem que o TNF- α não esteja envolvido neste modelo de artrite induzida por mBSA. Possivelmente, essas divergências em relação aos resultados devem-se ao fato de que importantes diferenças podem existir entre várias espécies e em diferentes modelos de inflamação. Além disso, tem sido observado na clínica que 30 % dos pacientes tratados com terapia anti-TNF- α não respondem ao tratamento (SU *et al.*, 2005), fortemente sugerindo que existe outros mecanismos promovendo a inflamação crônica na artrite reumatóide.

Com o intuito de investigar o envolvimento dos mediadores lipídicos, LTB₄ e PAF, pré-tratamos os animais imunizados com MK 886 ou com BN 50730 e verificamos o seu efeito na migração de neutrófilos induzida por mBSA. O MK 886 inibe a ativação da enzima 5-lipoxigenase e sua ação é bem caracterizada por estudos “in vivo” e “in vitro” (GILLARD *et al.*, 1989), sendo que seu mecanismo de ação envolve uma inibição da ligação da 5-lipoxigenase citosólica à proteína FLAP localizada na membrana plasmática (SAMUELSON

et al., 1991). O BN 50730 é descrito como um antagonista do receptor de PAF (DYSON., 1990). Nossos resultados demonstraram que o tratamento com MK 886, porém não com BN 50730, reduziu significativamente o acúmulo de neutrófilos para a cavidade articular desencadeado pela administração do antígeno, mostrando a participação do LTB₄ e não do PAF no recrutamento de neutrófilos no modelo de artrite induzida por mBSA. Confirmando a participação do LTB₄ no recrutamento de neutrófilos no nosso estudo, a administração intra-articular de mBSA em animais imunizados promoveu um aumento na concentração de LTB₄ na cavidade articular, quando comparado com o nível deste mediador em animais não-imunizados e desafiados com o antígeno ou em animais imunizados e desafiados com PBS. Ademais, a administração intra-articular de LTB₄ induziu uma elevada migração de neutrófilos, semelhantemente ao observado com a administração de mBSA em animais imunizados. Corroborando nossos resultados, encontra-se relatado na literatura que neutrófilos emigrados para a articulação participam do processo inflamatório dependentemente de LTB₄ (KOCH *et al.*, 1994; CHEN *et al.*, 2006). Ademais, resultados anteriores do nosso laboratório mostraram o LTB₄ como mediador final na migração de neutrófilos induzida por OVA em animais imunizados (CANETTI *et al.*, 2001).

Uma vez observado que as quimiocinas CXCL1 e CXCL5 e o LTB₄ estão envolvidos neste modelo, investigamos a existência de uma interdependência entre estes mediadores quimiotáticos na indução do recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular no modelo de AIA. Observamos que, o tratamento dos animais com repertaxina, antagonista dos receptores CXCR1 e CXCR2, promoveu uma significativa redução na concentração de LTB₄ obtida do exsudato articular induzido por mBSA, quando comparado com os níveis de LTB₄ obtidos de animais não tratados e desafiados com mBSA. Para dar sustentação à explicação de que as quimiocinas são importantes para a produção de LTB₄ e conseqüente indução do recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular em animais com AIA, avaliamos a migração dos neutrófilos após a injeção intra-articular de CXCL1 ou CXCL5 em animais tratados com MK 886. Verificamos que, houve uma inibição do recrutamento neutrofílico para a cavidade articular induzida por

estas quimiocinas CXC em animais tratados com MK 886. Corroborando o nosso achado da existência de uma via seqüencial, resultados recentes obtidos no nosso laboratório demonstraram que a quimiocina CXCL2 interagindo com o receptor CXCR2 induz a produção de CCL3, a qual interage com o receptor CCR1, induzindo a liberação seqüencial de TNF e LTB₄ (RAMOS *et al.*, 2005; submetido). Entretanto, como mostrado anteriormente, no modelo de AIA por nós utilizado, não observamos a participação do TNF, podendo ser devido à utilização de diferentes modelos de inflamação imune, diferindo no antígeno e no local de desafio.

Nosso resultado, sugerindo que uma via seqüencial de mediadores pode estar envolvida no modelo experimental de AIA, contribui para uma melhor compreensão sobre os mecanismos envolvidos na artrite reumatóide. Além de ser de fundamental importância, o conceito levantado sobre a existência de uma ordem nos fenômenos biológicos, podendo sugerir terapias mais específicas e também novas abordagens terapêuticas para a artrite reumatóide.

Estudos anteriores mostram que citocinas pró-inflamatórias induzem a produção de quimiocinas e conseqüentemente o influxo de neutrófilos para articulações inflamadas (SZEKANECZ *et al.*, 1998; TAYLOR *et al.*, 2000). Com base nestes dados da literatura, decidimos avaliar se o LTB₄ poderia atuar via quimiocinas CXC para induzir migração de neutrófilos neste modelo. Entretanto, esta via foi descartada desde que a repertaxina não reduziu o recrutamento de neutrófilos induzido pelo LTB₄.

O conjunto dos resultados apresentados mostra que, o recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular no modelo de artrite induzida por mBSA é mediado por quimiocinas CXC (CXCL1 e CXCL5) e por LTB₄. Além disto, nossos resultados sugerem que o mecanismo pelo qual este recrutamento ocorra seja por uma cascata inflamatória das quimiocinas CXCL1 e CXCL5 e de LTB₄. Nosso estudo é de fundamental importância, pois sugere as quimiocinas CXCL1 e CXCL5 e o LTB₄ como novos alvos terapêuticos num futuro próximo, visando o desenvolvimento de novas terapias para a artrite reumatóide. Ademais, pacientes que não responderem bem ou apresentarem muitos efeitos colaterais em resposta a um desses tratamentos, poderá utilizar a outra terapia como alternativa para o tratamento da artrite reumatóide.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, B. B. & NATARAJAN K. Tumor necrosis factors: developments during the last decade. **Eur Cytokine Netw**, v. 7, p. 93-124, 1996.

AGGARWAL, S.; GHILARDI, N.; XIE, M. H.; de SAUVAGE, F.J. & GURNEY, A. L. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. **J Biol Chem**, v. 278, p. 1910-1914, 2003.

AHUJA, S. K. & MURPHY. P. M. 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, p. 20545-50, 1996.

ALBELDA, S. M.; SMITH, C. W. & WARD, P. A. Adhesion molecules and inflammatory injury. **FASEB J**, v. 8, p. 504-512, 1994.

AOKI, Y.; QIU D.; ZHAO, G. H. & KAO, P. N. Leukotriene B4 mediates histamine induction of NF-kappaB and IL-8 in human bronchial epithelial cells. **Am J Physiol**, v. 274, p. 1030-1039, 1998.

BACON, K. B. & OPPENHEIM, J. J. Chemokines in disease models and pathogenesis. **Cytokine**, v. 9, p. 167-173, 1998.

BAGGIOLINI, M.; DEWALD B. & MOSER, B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines CXC and CC chemokines. **Adv Immunol**, v.55, p.97-179, 1994.

BECK, P.L. & WALLACE, J. L. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Mediat. Inflamm**, v. 6, p. 95-103, 1997.

BELLAVITE, P. The superoxide-forming enzyme system of phagocytes. **Free Radical Biol Med**, v. 4, p. 225-261, 1988.

BENVENISTE, J. Platelet-activating factor (PAF-acether): present status. **Agents Actions**, v. 11, p. 542-544, 1981.

BERTINI, R.; ALLEGRETTI, M.; BIZZARRI, C.; MORICONI, A.; LOCATI, M.; ZAMPELLA, G.; CERVELLERA, M. N.; DI CIOCCIO, V.; CESTA, M. C.; GALLIERA, E.; MARTINEZ, F. O.; DI BITONDO, R.; TROIANI, G.; SABBATINI, V.; D'ANNIBALLE, G.; ANACARDIO, R.; CUTRIN, J. C.; CAVALIERI, B.; MAINIERO, F.; STRIPPOLI, R.; VILLA, P.; DI GIROLAMO, M.; MARTIN, F.; GENTILE, M.; SANTONI, A.; CORDA, D.; POLI, G.; MANTOVANI, A.; GHEZZI, P. & COLOTTA, F. Noncompetitive allosteric inhibitors of the inflammatory chemokine receptors CXCR1 and CXCR2: prevention of reperfusion injury. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, p. 11791-11796, 2004.

BEVILACQUA, M. P. & NELSON, R. M. Selectins. **J Clin Invest**, v. 91, p. 379-387, 1993.

BEVILACQUA, M. P. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. **Annu Rev Immunol**, v. 11, p. 767-804, 1993.

BINDER, R.; KRESS, A. & KIRSCHFINK, M. Modulation of C5a-mediated effector functions of human polymorphonuclear leukocytes by tumor necrosis factor alpha and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. **Exp Clin Immunogenet**, v. 16, p. 212-225, 1999.

BOKOCH, G. M. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. **Blood**, v.86, p.1649-1660, 1995.

BOZIK, C. R.; KOLAKOWSKI, L. F.; GERARD, Jr. N. P.; GARCIA RODRIGUEZ, C., CONKLYN, M. J.; BRESLOW, R.; SHOWELL, H. J. & GERARD, C. Expression and biologic characterization of the murine chemokine KC, **J Immunol**, v. 154, p. 6048-6056, 1995.

BRACKERTZ, D.; MITCHELL, G. F. & MACKAY, I. R. Antigen-induced arthritis in mice. **Arthritis Rheum**, v. 20, p. 841-849, 1977.

BRENNAN, F. M.; FIELD, M.; CHU, C. Q.; FELDMANN, M. & MAINI, R. N. Cytokine expression in rheumatoid arthritis. **Br J Rheumatol**, v. 30, p. 76-80, 1991.

CALDERON, P.; ANZILOTTI, M. & PHELPS, R. Thalidomide in dermatology. New indications for an old drug. **Int J Dermatol**, v. 36, p. 881-887, 1997.

CANETTI, C. A.; LEUNG, B. P.; CULSHAW, S.; McINNES, I. B.; CUNHA, F. Q. & LIEW, F. Y. IL-18 enhances collagen-induced arthritis by recruiting neutrophils via TNF-alpha and leukotriene B4. **J Immunol**, v.171, p.1009-1015, 2003.

CANETTI, C. A.; SILVA, J. S.; FERREIRA, S. H. & CUNHA, F. Q. Tumour necrosis factor-alpha and leukotriene B(4) mediate the neutrophil migration in immune inflammation. **Br J Pharmacol**, v. 134, p. 1619-1628, 2001.

CHEN, M.; LAM, B. K.; KANAOKA, Y.; NIGROVIC, P. A.; AUDOLY, L. P.; AUSTEN, K. F. & LEE D. M. Neutrophil-derived leukotriene B4 is required for inflammatory arthritis. **J Exp Med**, v. 203, p. 837-842, 2006.

CHOONG, M. L.; YONG, Y. P.; TAN, A. C.; LUO, B. & LODISH, H. F. LIX: a chemokine with a role in hematopoietic stem cells maintenance. **Cytokine**, v. 25, p. 239-245, 2004.

CLARK-LEWIS, I.; KIM, S. K.; RAJARATHNAM, K.; GONG, J. H.; DEWALD, B.; MOSER, B.; BAGGIOLINI, M. & SYKES, B. D. Structure-activity relationships of chemokines. **J. Leukocyte Biol**, v.57, p. 703-710, 1995.

COLLETTI, L. M.; KUNKEL, S. L.; WALZ, A.; BURDICK, M. D.; KUNKEL, R. G.; WILKE, C. A. & STRIETER, R. M. Chemokine expression during hepatic ischemia/reperfusion-induced lung injury in the rat. The role of epithelial neutrophil activating protein. **J Clin Invest**, v. 95, p. 134-141, 1995.

COOKE, T. D. & JASIN, H. E. The pathogenesis of chronic inflammation in experimental antigen-induced arthritis. I. The role of antigen in the local immune response. **Arthritis Rheum**, v. 14, p. 327-337, 1972.

CORRAL, L. G. & KAPLAN, G. Immunomodulation by thalidomide and thalidomide analogues. **Ann Rheum Dis**, v. 58, p. 1107-1013, 1999.

CROOKS, S. W. & STOCKLEY R. A. Leukotriene B4. **Int J Biochem Cell Biol**, v.30, p.173-8, 1998.

DALE, M. M. & FOREMAN, J. C. The neutrophil leukocyte. In: Textbook of immunopharmacology. **Blackwell Scientific**, p. 36-52, 1984.

DAVIDSON, E. M.; RAE S. A. & SMITH, M. J. Leukotriene B4 in synovial fluid. **J Pharm Pharmacol**, v. 34, p. 410-417, 1982.

DEVCHAND, P. R.; KELLER, H.; PETERS, J. M.; VAZQUEZ, M.; GONZALEZ, F. J. & WAHLI. W. The PPAR alpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. **Nature**, v.384, p.39-43, 1996.

DI GIOVINE F. S.; NUKI, G. & DUFF, G. W. Tumor necrosis factor in synovial exudates. **Ann Rheum Dis**, v. 47, p. 768-772, 1988.

DRISCOLL, K. E.; HASSENBEIN, D. G.; HOWARD, B. W.; ISFORT, R. J., CODY, D.; TINDAL, M. H.; SUCHANEK, M. & CARTER, J. M. Cloning, expression, and functional characterization of rat MIP-2: a neutrophil chemoattractant and epithelial cell mitogen. **J Leukoc Biol**, v. 58, p. 359-64, 1995a.

DYSON, M. C.; BELLAN, J. A.; MINKES, R. K.; BECKERMAN, R. C., WEGMANN, M. J.; BRAQUET, P.; Mc NAMARA, D. B. & KADOWITZ, P. J. Influence of SK&F 95587 and BN 50730 on bronchoconstrictor responses in the cat. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 255. p. 1320-1327, 1990.

EDWARDS, S. W. & HALLETT, M. B. Seeing the wood for the trees: the forgotten role of neutrophils in rheumatoid arthritis. **Immunol Today**, v. 18, p. 320-324, 1997.

ELSNER, J.; PETERING, H.; KLUTHE, C.; KIMMING, D.; SMOKARKI, R.; PONATH, P. & KAPP, A. 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, p.2152-2158, 1998.

FACCIOLI, L. H.; SOUZA, G. E.; CUNHA, F. Q.; POOLE, S. & FERREIRA, S. H. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration "in vivo" by indirect mechanisms. **Agents Actions**, v. 30, p. 344-349, 1990.

FELDMANN, M.; BRENNAN, F. M. & MAINI, R. N. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. **Annu Rev Immunol**, v. 14, p. 397-440, 1996.

FELDMANN, M.; BRENNAN, F.; BONDESON, J.; PALEOLOG, E.; FOXWELL, B.; MAINI, R. 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, p. 2085-2086, 2001.

FERNANDES, E. S.; PASSOS G. F.; CAMPO, M. M.; de SOUZA, G. E.; FITTIPALDI, J. F.; PESQUERO, J. L.; TEIXEIRA, M. M. & CALIXTO, J. B. Cytokines and neutrophils as important mediators of platelet-activating factor-induced kinin B1 receptor expression. **Br J Pharmacol**, v.146, p.209-216, 2005.

FIGARELLA-BRANGER, D.; CIVATTE, M.; BARTOLI, C. & PELLISSIER, J. F. Cytokines, chemokines, and cell adhesion molecules in inflammatory myopathies. **Muscle Nerve**, v.28, p.659-682, 2003.

FIRESTEIN, G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. **Nature**, v. 423, p. 356-361, 2003.

FLEISCHMANN, R. & SHEALY, D. Developing a new generation of TNFalpha antagonists for the treatment of rheumatoid arthritis. **Mol Interv**, v. 3, p. 310-318, 2003.

FONTANA, A.; HENGARTNER, H.; WEBER, E.; FEHR, K.; GROB, P. J. A & COHEN, G. Interleukin-1 activity in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatol Int**, v. 2, p. 49-53, 1982.

FORD-HUTCHINSON A. W. Leukotriene B4 inflammation. **Crit Rev Immunol**, v. 10, p. 1-11, 1990.

FU, W.; ZHANG, Y.; ZHANG, J. & CHEN, W. F. Cloning and characterization of mouse homolog of the CXC chemokine receptor CXCR1. **Cytokine**, v. 31, p. 9-17, 2005.

FUJIWARA, K.; OHKAWARA, S.; TAKAGI, K.; YOSHINAGA, M. & MATSUKAWA, A. Involvement of CXC chemokine growth-related oncogene-alpha in monosodium urate crystal-induced arthritis in rabbits. **Lab Invest**, v. 82, p. 1297-1304, 2002.

FURIE, M. B. & RANDOLPH, G. J. Chemokines and tissue injury. **Am J Pathol**, v. 146, p. 1287-301, 1995.

GALLIN, J. Fundamental Immunology. In: W. E. Paul (Ed.). Inflammation. New York: Raven Press Ltd, **Fundamental Immunology**, p.1015-1032, 1993.

GARRELLY, L.; BUREAU, J. P. & LABREQUE, G. Temporal study of carrageenan-induced PMN migration in mice. **Agents Actions**, v. 33, p. 225-228, 1991.

GAUDREAU, E.; STANKOVA, J. & ROLA-PLESZCZYNSKI. Involvement of leukotriene B₄ receptor 1 signaling in platelet-activating factor-mediated neutrophil degranulation and chemotaxis, **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v.75, p. 25-34, 2005.

GILLARD, J.; FORD-HUTCHINSON, A. W.; CHAN, C.; CHARLESON, S.; DENIS, D.; FOSTER, A.; FORTIN, R.; LEGER, S.; Mc FARLANE, C. S. & MORTON, H. 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, p. 456-464, 1989.

GOLDMAN, D. W.; GIFFORD L. A.; MAROTTI, T.; KOO, C. H. & GOETZL, E. J. Molecular and cellular properties of human polymorphonuclear leukocyte receptors for leukotriene B₄. **Fed Proc**, v.46, p.200-3, 1987.

HADLEY, T. J. & PEIPER, S. C. From malaria to chemokine receptor: the emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen. **Blood**, v.89, p.3077-3091, 1997.

HALLORAN, M. M.; WOODS, J. M.; STRIETER, R. M.; SZEKANECZ, Z.; VOLIN, M. V.; HOSAKA, S.; HAINES, G. K.; KUNKEL, S. L.; BURDICK, M. D.; WALZ, A. & KOCH, A. The role of an epithelial neutrophil-activating peptide-78-like protein in rat adjuvant-induced arthritis. **J Immunol**, v. 162, p. 7492-7500, 1999.

HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J. & WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood**, v. 92, p.3007-3017, 1998.

HARRIS, E. D. Jr. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. **N Engl J Med**, v. 322, p. 1277-1289, 1990.

HEBERT, M. J.; TAKANO, T.; HOLTFOFER, H. & BRADY, H. R. Sequential morphologic events during apoptosis of human neutrophils. Modulation by lipoxygenase-derived eicosanoids. **J Immunol**, v.157, p.3105-15, 1996.

HUTTENLOCHER, A.; SANDBORG, R. R. & HORWITZ, A. F. Adhesion in cell migration. **Curr Opin Cell Biol**, v. 7, p. 697-706, 1995.

INGRAHAM, L. M.; COATES T. D.; ALLEN J. M.; HIGGINS C. P.; BAEHNER R. L. & BOXER L. A. Metabolic, membrane, and functional responses of human polymorphonuclear leukocytes to platelet-activating factor. **Blood**, v. 59, p.1259-1266, 1982.

INTRONA, M.; BAST, R. C. Jr.; . TANNEMBAUM, C. S.; HAMILTON, T. A. & ADAMS, D. O. The effect of LPS on expression of the early "competence" genes JE and KC in murine peritoneal macrophages. **J Immunol**, v. 138, p. 3891-3896, 1987.

KASAMA, T.; MIWA Y.; ISOZAKI, T.; ODAI, T.; ADACHI, M. & KUNKEL, S. L. Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v. 4, p. 273-279, 2005.

KEIFER, J. A.; GUTTRIDGE, D. C.; ASHBURNER, B. P. & BALDWIN Jr., A. S. Inhibition of NF-kappa B activity by thalidomide through suppression of IkappaB kinase activity. **J Biol Chem**, v. 276, p. 22382–22387, 2001.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: contribution to the microbicidal activity of intact leukocytes. **Science**, v. 169, p. 1095-1097, 1970.

KLEIN, A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. The role of lymphocytes in the neutrophil migration induced by ovalbumin in immunized rats. **Immunology**, v. 84, p. 577-584, 1995.

KNOTT, P. G.; GATER, P. R.; DUNFORD, P. J.; FUENTES, M. E. & BERTRAND, C. P. Rapid up-regulation of CXC chemokines in the airways after Ag-specific CD4+ T cell activation. **J Immunol**, v. 166, p. 1233-1240, 2001.

KOCH, A. E.; KUNKEL, S. L.; HARLOW, L. A.; MAZARAKIS, D. D.; HAINES, G. K.; BURDICK, M. D.; POPE, R. M.; WALZ, A. & STRIETER, R. M. Epithelial neutrophil activating peptide-78: a novel chemotactic cytokine for neutrophils in arthritis. **J Clin Invest**, v. 94, p. 1012-1018, 1994.

KOCH, A. E.; STEVEN, L. K.; SHAH, M. R.; HOSAKA, S.; HALLORAN, M. M.; HAINES, G. K.; BURDICK, M. D.; POPE, R. M. & STRIETER, R. M. Growth-related gene product α - A chemotactic cytokine for neutrophils in rheumatoid arthritis. **J Immunol**, v. 155, p. 3660-3666, 1995.

KOCH, K.; MELVIN Jr. L. S.; REITER, L. A.; BIGGERS, M. S.; SHOWELL, H. J.; PETTIPHER, E. R.; CHENG, J. B.; MILICI, A. J. & BRESLOW, R. (+)-1-(3S,4R)-[3-(4-phenylbenzyl)-4-hydroxychroman-7-yl]cyclopentane carboxylic acid, a highly potent, selective leukotriene B₄ antagonist with oral activity in the murine collagen-induced arthritis model. **J Med Chem**, v. 37, p. 3197- 3199, 1994.

KOUSKOFF, V.; KORGANOW, A. S.; DUCHATELLE, V.; DEGOTT, C.; BENOIST, C. & MATHIS, D. Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. **Cell**, v. 87, p.811-818, 1996.

KRISTJANSSON, G.; VENGE P.; WANDERS, A.; LOOF, L. & HALGREEN, R. 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, p. 1806-1812, 2004.

KUBES, P. Polymorphonuclear leukocyte-endothelium interactions: a role for pro-inflammatory and anti-inflammatory molecules. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 7, p. 88-97, 1993.

LAING, K. J. & SECOMBES, C. J. Chemokines. **Dev Comp Immunol**, v., 28, p. 443-460, 2004.

LEE, J.; HORUK, R.; RICE, J. C.; BENNET, G. L.; CAMERATO, T. & WOOD, W. I. Characterization of two high affinity human interleukin-8 receptors. **J Biol Chem**, v.267, p.16283-16287, 1992.

LEE, S. W.; HONG, Y. S.; CHUN, C. M.; MOON, J. D.; KIM, S. J.; JUNG, I. C.; YOON, Y. H.; LEE, B. A.; MOON, S. W.; CHOI, S. H. & MOON, C. K. Anti-inflammatory effects of IL-4 and IL-10 on human polymorphonuclear leukocytes. **J Korean Med Sci**, v. 17, p. 7-14, 2002.

LEHRER, R. L.; GANZ, T.; SELSTED, M. E.; BABIOR, B. M. & CURNUTTE, J. T. Neutrophils and host defense. **Ann Int Med**, v. 109, p. 127-142, 1988.

LIN, F.; NGUYEN C. M.; WANG, S. J.; SAADI, W.; GROSS, S. P. & JEON, N. L. Neutrophil migration in opposing chemoattractant gradients using microfluidic chemotaxis devices. **Ann Biomed Eng**, v.33, p.475-482, 2005.

LIN, Q.; RUUSKA S. E.; SHAW, N. S.; DONG, D. & NOY, N. Ligand selectivity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. **Biochemistry**, v. 38, p. 185-90, 1999.

MALECH, H. L. & GALLIN, J. I. Neutrophils in human diseases. **N Engl J Med**, v. 317, p. 687-694, 1987.

MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; INTRONA, M. Endothelial activation by cytokines. **Ann N Y Acad Sci. Dec**, v. 15, p. 93-116, 1997.

MARTIN, P. & LEIBOVICH, J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. **Trends in Cell Biology** v. 15, p. 559-607, 2005.

MATHEIS, G.; SHERMAN, M. P.; BUCKBERG, G. D.; HAYBRON, D. M.; YONG, H. H. & IGNARRO, L. J. Role of L-arginine-nitric oxide pathway in myocardial reoxygenation injury. **Am J Physiol**, v. 262, p. H616-H620, 1992.

McINNES, I. B.; LEUNG, B. P.; STURROCK, R. D.; FIELD, M. & LIEW, F. Y. Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor-alpha production in rheumatoid arthritis. **Nat Med**, v. 3, p. 189-195, 1997.

MICHEL, L. & DUBERTRET, L. Leukotriene B4 and platelet-activating factor in human skin. **Arch Dermatol Res**, v. 284, p. S12-17, 1992.

MOSER, B. & WILLIMANN, K. Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. **Ann Rheum Dis**, v. 63, p. ii84-ii89, 2004.

MULLIGAN, M. S.; HEVEL, J. M.; MARLETTA, M. A. & WARD, P. A. Tissue injury caused by deposition of immune complexes is L-arginine dependent. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 88, p. 6338-6342, 1991.

MUNDER, K. & COLDITZ, I. G. Migratory responses of ovine neutrophils to inflammatory mediators *in vitro* and *in vivo*. **J Leukoc Biol**, v. 53, p. 273-278, 1993.

MURPHY, P. M. Chemokine receptors. **Methods**, v. 10, p. 104-118, 1996.

MURPHY, P. M.; BAGGIOLINI, M.; CHARO, I. F.; HEBERT, C. A.; HORUK, R.; MATSUSHIMA, K.; MILLER, L. H.; OPPENHEIM, J. J. & POWER, C. A. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. **Pharmacol Rev**, v. 52, p. 145-176, 2000.

NILSSON, G.; MIKOVITS, J. A.; METCALFE, D. D. & TAUB, D. D. Mast cell migratory response to interleukin-8 is mediated through interaction with chemokine receptor CXCR2/Interleukin-8RB. **Blood**, v. 93, p. 2791-2797, 1999.

NOHGAWA, M.; SASADA, M.; MAEDA, A.; ASAGOE, K.; HARAKAWA, N.; TAKANO, K.; YAMAMOTO, K. & OKUMA, M. Leukotriene B₄-activated human endothelial cells promote transendothelial neutrophil migration. **J Leuk Biol**, v. 62, p. 203-209, 1997.

O'FLAHERTY, J. T.; WYKLE, R. L.; THOMAS, M. J. & McCALL, C. E. Neutrophil degranulation responses to combination of arachidonate metabolites and platelet-activating factor. **Res Commun Chem Pathol Pharmacol**, v. 43, p. 3-23, 1984.

O'DONNELL, R. A.; PEEBLES C.; WARD, J.; DARAKER, A., ANGCO, G.; BROBERG, P.; PIERROW, S.; LUND, J.; HOLGATE, S. T., DAVIES, D. E.; DELANY, D. J.; WILSON, S. C. & DJUKANOVICH, R. Relationship between peripheral airway dysfunction, airway obstruction, and neutrophilic inflammation in COPD. **Thorax**, v. 59, p. 837-842, 2004.

OPPENHEIM, J. J.; ZACHARIAE C. O.; MUKAIDA, N. & MATSUSHIMA, K. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. **Annu Rev Immunol**, v. 9, p. 617-648, 1991.

OQUENDO, P.; ALBERTA, J.; WEN, D. Z.; GRAYCAR, J. L.; DERYNCK, R. & STILES, C. D. The platelet-derived growth factor-inducible KC gene encodes a secretory protein related to platelet alpha-granule proteins. **J Biol Chem**, v. 264, p. 4133-4137, 1989.

PERRETI, M. & GETTING, S. J. Migration of specific leukocyte subsets in response to cytokine or chemokine application in vivo. **Methods Mol Biol**, v. 225, p. 139-146, 2003.

PETERS-GOLDEN, M. & BROCK, T. G. Intracellular compartmentalization of leukotriene synthesis: unexpected nuclear secrets. **FEBS**, v. 487, p. 323-326, 2001.

FIGUET, P. F.; GRAU, G. E.; VESIN, C.; LOESTSCHER, H.; GENTZ, R. & LESSLAUER, W. Evolution of collagen arthritis in mice is arrested by treatment with anti-tumor necrosis factor (TNF) antibody or a recombinant soluble TNF receptor. **Immunology**, v. 77, p. 510-514, 1992.

PODOLIN, P. L.; BOLOGNESE, B. J.; FOLEY, J. J.; SCHMIDT, D. B.; BUCKLEY P. T. & WIDDOWSON, K. L. A potent and selective nonpeptide antagonist of CXCR2 inhibits acute and chronic models of arthritis in the rabbit. **J Immunol**, v. 169, p. 6435-6444, 2002.

QIU, Y.; ZHU, J.; BANDI, V.; ATMAR, R. L.; HATTOTUWA, K.; GUNTUPALLI, K. K. & JEFFERY, P. K. Biopsy neutrophilia, neutrophil chemokine and receptor gene expression in severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 168, p.968–975, 2003.

RAMOS, C. D.; CANNETTI, C. A.; SOUTO, J. T.; SILVA, J. S.; HOGABOAM, C. M.; FERREIRA, S. H. & CUNHA, F. Q. MIP-1 α [CCL3] acting on the CCR1 receptor mediates neutrophil migration in immune inflammation via sequential release of TNF- α and LTB $_4$. **J Leukoc Biol**, v. 78, p. 167-177, 2005.

RANKIN, J. A.; SYLVESTER I.; SMITH, S.; YOSHIMURA, T. & LEONARD, E. J. Macrophages cultured in vitro release leukotriene B $_4$ and neutrophil attractant/activation protein (interleukin 8) sequentially in response to stimulation with lipopolysaccharide and zymosan. **J Clin Invest**, v. 86, p. 1556-64, 1990.

REIMOLD, A. M. TNF α as therapeutic target: new drugs, more applications. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v. 1, p. 377-392, 2002.

ROBERTS, L. & McCOLL, G. J. Tumour necrosis factor inhibitors: risks and benefits in patients with rheumatoid arthritis. **J Internal Med**, v. 34, p. 687-693, 2004.

ROLLINS, B. J. Chemokines. **Blood**, v. 90, p. 909-928, 1997.

ROSSI, A. G. & HELLEWELL, P. G. Mechanisms of neutrophil accumulation in tissues. In: HELLEWELL, P. G.; WILLIAMS, T. J. (Eds.). **Immunopharmacology of neutrophils: the handbook of immunopharmacology**. Academic Press, cap. 10, p. 223, 1994.

RUTGERS, A.; HEERINGA, P. & TERVAERT, J. W. The role of myeloperoxidase in the pathogenesis of systemic vasculitis. **Clin Exp Rheumatol**, v.21, p.S55-63, 2003.

SAEED, S. A.; WAQAR M. A.; ZUBAIRI, A. J.; BHURGRI, H.; KHAN, A.; GOWANI, S. A.; WAGAR, S. N.; CHOUDHARY, M. I.; JALIL, S.; ZAIDI, A. H. & ARA, I. Myocardial ischaemia and reperfusion injury: reactive oxygen species and the role of neutrophil. **J Coll Physicians Surg Pak**, v. 15, p. 507-514, 2005.

SAMUELSSON, B.; DAHLEN, S. E.; LINDGREN, J. A.; ROUZER, C. A. & SERHAN, C. N. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. **Science**, v.237, p.1171-1176, 1987.

SAMUELSSON, B.; HAEGGSTROM, J. Z. & WETTERHOLM, A. Leukotriene biosynthesis. **Ann N Y Acad Sci**, v. 629, p. 89-99, 1991.

SAUNDERS, B. M.; TRAN S.; RUULS, S.; SEDGWICK, J. D.; BRISCOE, H. & BRITTON, W. J. 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, p. 4852-4859, 2005.

SERHAN, C. N.; RADIN A.; SMOLEN, J. E.; KORCHACK, H.; SAMUELSSON, B. & WEISSMANN, G. Leukotriene B4 is a complete secretagogue in human neutrophils: a kinetic analysis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 107, p. 1006-1012, 1982.

SHARPE, T. J. & SMITH, H. Effects of drugs on the acute inflammation following intraperitoneal injection of antigen into actively sensitised rats. **Int Arch Allergy Appl Immunol**, v. 60, p. 216-221, 1979.

SHEN, X. Y.; HAMILTON, T. A. & DiCORLETO, P. E. Lipopolysaccharide-induced expression of the competence gene KC in vascular endothelial cells is mediated through protein kinase C. **J Cell Physiol**, v. 140, p. 44-51, 1989.

SIDDIQUI, M. A. & SCOTT, L. J. Infliximab: a review of its use in Crohn's disease and rheumatoid arthritis. **Drugs**, v. 65, p. 2179-2208, 2005.

SMITH, J. B.; ROVAI, L. E. & HERSCHMAN, H. R. Sequence similarities of a subgroup of CXC chemokines related to murine LIX: implications for the interpretation of evolutionary relationships among chemokines. **J Leukoc Biol**, v. 62, p. 598-603, 1997.

SU, C. & LICHTENSTEIN, G.R. Are there predictors of Remicade treatment success or failure? **Adv Drug Deliv Rev**, v. 57, p. 237-245, 2005.

SZEKANECZ, Z.; STRIETER, R. M.; KUNKEL, S. L. & KOCH, A. E. Chemokines in rheumatoid arthritis. **Springer Semin. Immunopathol**, v. 20, p. 115-120, 1998.

TAVARES, J. L.; WANGOO, A.; DILWORTH, P. MARSHALL, B.; KOTECHA, S. & SHAW, R. J. Thalidomide reduces tumour necrosis factor-alpha production by human alveolar macrophages. **Respir Med**, v. 91, p. 31-39, 1997.

TAYLOR, P. C.; PETERS, A. M.; PALEOLOG, E.; CHAPMAN, P. T.; ELLIOTT, M. J.; MCCLOSKEY, R.; FELDMANN, M. & MAINI, R. N. Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 43, p. 38-47, 2000.

TAYLOR, P. C.; WILLIAMS R. O. & FELDMANN, M. Tumour necrosis factor alpha as a therapeutic target for immune-mediated inflammatory diseases. **Curr Opin Biotechnol**, v. 15, p. 557-563, 2004.

TEKAMP-OLSON, P.; GALLEGOS, C.; BAUER, D.; MCCLAIN, J.; SHERRY, B.; FABRE, M.; van DEVENTER, S. & CERAMI, A. Cloning and characterization of cDNAs for murine macrophage inflammatory protein 2 and its human homologues. **J Exp Med**, v. 172, p. 911-919, 1990.

THORBECKE, G. J.; SHAH, R.; LEU, C. H.; KURUVILLA, A. P.; HARDISON, A. M. & PALLADINO, M. A. Involvement of endogenous tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta during induction of collagen type II arthritis in mice. **Proc Natl Acad Sci**, v. 89, p.7375-7379, 1992.

TRENTHAM, D. E.; TOWNES, A. S. & KANG, A. H. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. **J Exp Med**, v. 146, p. 857-868, 1977.

VERGUNST, C. E. & TAK, P. P. Chemokines: their role in rheumatoid arthritis. **Curr Rheumatol Rep**, v. 7, p. 382-388, 2005.

VICENTE, A. M.; GUILLEN, M. I. & ALCARAZ, M. J. Modulation of haem oxygenase-1 expression by nitric oxide and leukotrienes in zymosan-activated macrophages. **Br J Pharmacol**, v. 133, p. 920-926, 2001.

WAGNER, J. G. & ROTH, R. A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacol Rev**, v. 52, p. 349-374, 2000.

WALDMANN, T. A. & TAGAYA, Y. The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. **Annu Rev Immunol**, v. 17, p. 19-49, 1999.

WATSON, M. L.; KINGSMORE, S. F.; JOHNSTON, G. I.; SIEGELMAN, M. H.; LE BEAU, M. M.; LEMONS, R. S.; BORA, N. S.; HOWARD, T. A.; WEISSMAN, I. L. & MCEVER, R. P. Genomic organization of the selectin family of leukocyte adhesion molecules on human and mouse chromosome 1. **J Exp Med**, v. 172, p. 263-272, 1990.

WEISS, S. J. Tissue destruction by neutrophils. **N Engl J Med**, v. 320, p. 365-376, 1989.

WEISSMANN, G. & KORCHAK, H. Rheumatoid arthritis: the role of neutrophil activation. **Inflammation**, v. 8, p. S3-S14, 1984.

WIPKE, B. T. & ALLEN, P. M. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. **J Immunol**, v. 167, p. 379-388, 2001.

WONG, S. H. & LORD, J. M. Factors underlying chronic inflammation in rheumatoid arthritis. **Arch Immunol Ther Exp**, v. 52, p. 379-388, 2004.

WOOLEY, P. H.; DUTCHER J.; WIDMER, M. B. & GILLIS, S. 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, p. 6602-6607, 1993.

WUYTS, A.; OSSELAER N. VAN.; HAELENS, A.; SAMSON, I.; HERDEWIJN, P.; BEN-BARUCH, A.; OPPENHEIM, J. J.; PROOST, P. & VAN DAMME, J. Characterization of synthetic human granulocyte chemotactic protein 2: usage of chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 and in vivo inflammatory properties. **Biochemistry**, v. 36, p. 2716-2723, 1997.

YANG, J.; HIRATA, T.; CROCE, K.; MERRIL-SKOLOFF, G.; TCHERNYCHEV, B.; WILLIAMS, E.; FLAUMEN-HAFT, R.; FUJIE, B. C. & FURIE, B. Targeted gene disruption demonstrates that P-selectin glycoprotein ligand (PSGL-1) is required for P-selectin-mediated but not E-selectin-mediated neutrophil rolling and migration. **J Exp Med**, v. 190, p. 1769-1782, 1999.

YASUI, K.; KOBAYASHI, N.; YAMASAKI, T. & AGEMATSU, K. Thalidomide as an immunotherapeutic agent: the effects on neutrophil-mediated inflammation. **Curr Pharm Des**, v. 11, p. 395-401, 2005.

YOKOMIZO, T.; IZUMI, T.; CHANG, K.; TAKUWA, Y. & SHIMIZU, T. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B₄ that mediates chemotaxis. **Nature**, v. 387, p. 620-624, 1997.

YOKOMIZO, T.; KATO K.; TERAWAKI, K.; IZUMI, T. & SHIMIZU, T. A second leukotriene B₄ receptor, BLT₂. A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. **J Exp Med**, v. 192, p. 421-432, 2000.

YOSHIMURA, T.; MATSUSHIMA, K.; TANAKA, S.; ROBINSON, E. A.; APPELLA, E.; OPPENHEIM, J. J. & LEONARD, E. J. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. **Proc Natl Acad Sci**, v. 84, p. 9233-9237, 1987.

ZLOTNIK, A. & YOSHIE, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity**, v. 12, p. 121-127, 2000.

ZLOTNIK, A.; MORALES, J. & HEDRICK, J. A. Recent advances in chemokines and chemokine receptors. **Crit Rev Immunol**, v. 19, p. 1-47, 1999.

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](#)