

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Efeitos anti-inflamatórios da saliva de *Lutzomyia longipalpis* e de sua proteína LJM 111 em modelo experimental de artrite

Renata Grespan

Ribeirão Preto
2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Efeitos anti-inflamatórios da saliva de *Lutzomyia longipalpis* e de sua proteína LJM 111 em modelo experimental de artrite

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências – Área de concentração: Farmacologia sob a orientação do Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha.

Renata Grespan

**Ribeirão Preto
2009**

FICHA CATALOGRÁFICA

Grespan, Renata **“Efeitos anti-inflamatórios da saliva de *Lutzomyia longipalpis* e de sua proteína LJM 111 em modelo experimental de artrite”.**

Ribeirão Preto, 2009 P134. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Cunha, Fernando de Queiróz.

1. Saliva de *Lutzomyia longipalpis*, 2. Proteína LJM 111,
3. Anti-inflamatório e 4. artrite.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Renata Grespan

“Efeitos anti-inflamatórios da saliva de *Lutzomyia longipalpis* e de sua proteína LJM 111 em modelo experimental de artrite”

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências – Área de Concentração: Farmacologia

Aprovado em: 14 de dezembro de 2009

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha

Instituição: FMRP – USP Assinatura: _____

Prof. Dr. Marcelo Torres Bozza

Instituição: IMPPG – UFRJ Assinatura: _____

Prof. Dr. Luis Carlos Crocco Afonso

Instituição: ICEB – UFOP Assinatura: _____

Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi

Instituição: FMRP – USP Assinatura: _____

Prof. Dr. Glória Emília Petto de Souza

Instituição: FCFRP – USP Assinatura: _____

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 da Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP.

"Conte-me e eu esqueço.

Mostre-me e eu apenas me lembro.

Envolve-me e eu compreendo".

Confúcio

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Rubens Grespan e Ivete Paixão
Grespan, que me ensinaram o valor da família,
ser verdadeira, sincera e ir atrás dos meus
sonhos. Obrigada por vocês serem meu porto
seguro. Sou muito feliz de ter uns pais tão
maravilhosos.*

AGRADECIMENTOS

À **DEUS**, nosso criador amado e a razão maior de nossa existência, pelo seu amor e pelo seu perdão incondicional pelas nossas falhas.

Ao Prof. Dr. **Fernando de Queiróz Cunha**, pela orientação durante esses 6 anos e grande oportunidade de ter trabalhado em seu laboratório, obrigada por tudo e desculpa pelas minhas falhas, eu amadureci muito profissionalmente e pessoalmente durante estes anos.

Aos prof^{ores} Dr. **Luís Carlos Crocco Afonso**, Dr. **Marcelo Torres Bozza**, Dr. **Eduardo Antônio Donadi** e Dra. **Glória Emília Petto de Souza**, por aceitarem a participar da banca examinadora do meu doutorado e por toda a atenção.

Aos meus colaboradores e amigos **Henrique P. Lemos e Vanessa Carregaro** pela excelente qualidade de nossas discussões e de idéias sobre os nossos trabalhos e pelo espírito de equipe na execução destas idéias.

Ao **Carlo e ao Waldiceu** pela ajuda na realização de alguns experimentos e pelas discussões.

Ao **Henrique P. Lemos, Fabricio O. Souto, Vanessa Carregaro e Andressa de Freitas** pela ajuda na correção da minha tese de doutorado.

À grande amiga e irmã fiel **Fernanda Grespan**, que mesmo de longe durante todo o meu doutorado foi e é minha companheira de todas as horas e a pessoa que mais confio.

Ao meu irmão querido **Marco Aurélio Grespan**, que posso contar sempre por toda a minha vida, obrigada por ser um irmão tão sincero e amigo.

Aos meus pais **Rubens** e **Ivete** que nunca mediram esforços para me ajudar em todos os momentos de minha vida.

Ao Prof. Dr. **Gustavo Ballejo** pela excepcional contribuição para a minha formação acadêmica tanto na área de pesquisa quanto de ensino, sua preciosa ajuda na minha qualificação de doutorado e pelas muitas conversas durante este período.

A todos os amigos integrantes do laboratório de Inflamação e Dor, que em conjunto proporcionam um ambiente agradável de trabalho e convivência: **Henrique, Silvio, Andressa, Fabrício Souto, Vanessa, Paulo, Fabiane, Dani Carlos, Adriana, Silvia, Josi, Rafael, Paula, Larissa, Fernando Spiller, Thiago Garlet, Fernanda, Sabrina, Thiago Cunha, Jhimmy, Paulinha, Guilherme, Valéria** e, aos já saudosos amigos **Diego, Cléber, Mani, Karla, Daniela Secco, Marcelo, Flávia, Zeca, Djane, Ana, Dionéia, Sandra, Waldiceu, Celina, Michel, Beth, Luís Fernando, Daniela Sachs, Tânia, Cris Villarreal, Marta, Joice Cunha, Fabrício Rios-Santos, Tarcília e Luciana.**

À **Giuliana, Fabíola, Kátia, Diva, Acácio, Ieda e Sérgio** pelo auxílio técnico, carinho, convívio e amizade durante todos esses anos.

À todos os professores do Departamento de Farmacologia e em especial ao **professor Dr. Francisco Guimarães** pela amizade e atenção dedicada.

Aos colegas dos laboratórios do Departamento de Farmacologia pela amizade e convívio e em especial a **Chris Becari e a Giuliana.**

Aos bioteristas **Eliana, Inês, Júlio, Cris e Rubinho** pelo manejo com os animais do biotério.

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

Aos secretários **Sônia M. Stefanelli, José W. Ramon e Fátima H. Petean** pela paciência e ajuda com os vários assuntos burocráticos que não conseguimos fugir.

A **todos** que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho e para o meu crescimento pessoal e profissional.

À **FAPESP**, pela concessão da bolsa e reserva técnica durante o período do doutorado.

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

ABREVIATURAS

ADA: adenosina deaminase

AIA: artrite induzida por antígeno

ANOVA: análise de variância

APCs: células apresentadoras de antígeno

AR: artrite reumatóide

C5a: quinto fragmento do sistema complemento ativado

CFA: adjuvante completo de Freund

CIA: artrite induzida por colágeno

CXCL: quimiocina CXC ligante

CXCR: receptor CXC

DC: células dendríticas

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

EGS: extrato de glândula salivar

ELISA: ensaio imunoenzimático

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

EPM: erro padrão da média

G: grupo

GAG: glicosaminoglicano

GPCRs: receptor acoplado da proteína G

GRK: quinase de receptor acoplado a proteína G

GRO- α : oncogene regulador do crescimento

i.a.: intra-articular

i.p.: intraperitoneal

ICAM: molécula de adesão intercelular

IFA: adjuvante incompleto de Freund

IFN- γ : interferon- γ

IL: Interleucina

kg: kilograma

LIX: quimiocina CXC induzida por lipopolissacarídeo

LPS: lipopolissacarídeo

LTB4: leucotrieno B4

Max: maxadilan

mBSA: albumina bovina sérica metilada

mg: miligrama(s)

MHC: complexo principal de histocompatibilidade

MIP: proteína inflamatória de macrófagos

mL: mililitro(s)

MMP: metaloproteinase

MPO: mieloperoxidase

μ L: microlitro

n: número

NaOH: hidróxido de sódio

NF- κ B: fator de transcrição nuclear kappa B

ng: nanograma

NIH: instituto nacional de saúde

NO: óxido nítrico

NOS: sintase do óxido nítrico

OVA: ovo albumina

PAF: fator de agregação plaquetária

PBS: tampão salina fosfato

pg: picograma (s)

PGE₂: prostaglandina E₂

PHA: fitohemaglutinina

s.c.: subcutânea

Th: células T auxiliaadoras

TLR: receptor do tipo Toll

TNF: fator de necrose tumoral

v.o.: via oral

RESUMO

No presente estudo, nós investigamos a atividade anti-inflamatória da saliva de *Lutzomyia longipalpis*, flebotomíneo do Novo Mundo, em modelo experimental de artrite. Além disso, avaliamos os mecanismos e identificamos os constituintes salivares envolvidos nessa atividade. O extrato de glândula salivar (EGS) de *L. longipalpis* inibiu a migração de neutrófilos, a hipernocicepção inflamatória e a lesão articular em animais com artrite. Ainda, o EGS reduziu a expressão de MHC-II e da molécula coestimulatória CD-86 em células dendríticas e inibiu a produção de mediadores inflamatórios em cultura de linfócitos. Ademais, nós demonstramos que o EGS também foi capaz de interferir com a locomoção dos neutrófilos, sugerindo ser por aumentar a expressão de GRK-2 e internalizar o receptor CXCR2.

Devido ao fato de a saliva de *L. longipalpis* ter diversos componentes, é essencial conhecer quais os componentes presentes no EGS são os responsáveis pelo seu efeito anti-inflamatório. Deste modo, em colaboração com os laboratórios do prof. Dr Jesus G. Valenzuela e Dr José Marcos Ribeiro (National Institute of Health – NIH) que clonaram os genes responsáveis pela síntese das proteínas presentes na saliva (Valenzuela *et al.*, 2004), nosso próximo passo foi investigar quais os componentes presentes na saliva poderiam ser os responsáveis pela atividade anti-inflamatória observada. Nós identificamos a proteína LJM 111, presente no EGS, como responsável em inibir a migração de neutrófilos, a hipernocicepção inflamatória, a expressão de MHC-II e da molécula coestimulatória CD-86 em células dendríticas e inibir a produção de mediadores inflamatórios em cultura de linfócitos. Entretanto, observamos que a proteína LJM 111 não atua diretamente no neutrófilo, por não interferir com os níveis de CXCR2 e GRK-2. Deste modo, sugerindo que outro componente presente na saliva possa contribuir com estes efeitos. Por fim, os resultados obtidos sugerem que a proteína LJM 111 possa ser um protótipo para o desenvolvimento de uma futura abordagem terapêutica em doenças inflamatórias, como a artrite reumatóide.

Palavras chaves: saliva, *Lutzomyia longipalpis*, Proteína LJM 111, migração de neutrófilos e artrite reumatóide.

ABSTRACT

In this study, we investigated the anti-inflammatory activity of the salivary gland extract (SGE) of *Lutzomyia longipalpis* in an experimental arthritis model. The mechanisms and the identification of the salivary gland constituents involved in these effects were also analyzed. The SGE from *L. longipalpis* inhibited the neutrophil migration, inflammatory hypernociception and articular lesion in arthritic mice. In addition, the SGE reduced the expression of MHC-II and the co-stimulatory molecule CD-86 in dendritic cells and inhibited the production of inflammatory mediators by lymphocytes in culture. Furthermore, SGE was able to reduce the neutrophil locomotion by reducing the CXCR2 receptor expression and enhancing the GRK-2 expression.

Considering that SGE has many constituents, it is essential to know which ones are responsible for these anti-inflammatory effects. In this way, in collaboration with Dr Jesus G. Valenzuela and Dr José Marcos Ribeiro (National Institute of Health – NIH), who cloned the genes responsible for the synthesis of the salivary gland proteins (Valenzuela *et al.*, 2004), we then investigated what components in the salivary gland could be responsible for the anti-inflammatory activity observed. We identified the LJM 111 protein, present in SGE, as responsible for the inhibition of neutrophil migration, inflammatory hypernociception, expression of CD-86 and MHC-II in dendritic cells and the production of inflammatory mediators by lymphocytes in culture. However, we observed that LJM 111 protein does not act directly in neutrophils and does not interfere with the CXCR2 and GRK-2 levels. Hence, suggesting that other component in the salivary gland could contribute with these effects. In conclusion, our results suggest that LJM 111 can be the prototype to the development of a new therapeutic approach in inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis.

Key words: salivary gland, *Lutzomyia longipalpis*, LJM 111 protein, neutrophil migration and rheumatoid arthritis.

ÍNDICE

1. Introdução.....	24
1.1. Artrite reumatóide.....	25
1.2. Migração de neutrófilos.....	29
1.2.1. Mediadores envolvidos no recrutamento de neutrófilos.....	29
1.3. Saliva de insetos hematófagos.....	31
1.4. Constituintes das salivas de insetos hematófagos.....	33
2. Objetivos	36
3. Metodologia.....	39
3.1. Animais.....	40
3.2. Obtenção do Extrato de Glândula Salivar (EGS) de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	40
3.3. Sensibilização e desafio com OVA ou mBSA – Tratamento com o EGS nos animais sensibilizados.....	40
3.4. Construção de plasmídeos codificando para proteínas presentes no extrato de glândula salivar (EGS) e seu tratamento em animais imunizados e desafiados com OVA.....	41
3.5. Modelo de artrite induzida por mBSA - Tratamento com o EGS ou com a proteína LJM 111 nos animais imunizados.....	41
3.5.1. Contagem total dos leucócitos.....	42
3.5.2. Contagem diferencial dos leucócitos.....	42
3.6. Modelo de artrite induzida por colágeno (CIA) - Tratamento com o EGS nos animais imunizados.....	43
3.7. Efeito do EGS sobre o conteúdo de glicosaminoglicanos (GAGs) em patelas obtidas de camundongos imunizados e desafiados com mBSA.....	44
3.8. Efeito do EGS e da proteína LJM 111 sobre a hipernocicepção mecânica em camundongos imunizados e desafiados com mBSA.....	44
3.9. Efeito do EGS e da proteína LJM 111 <i>in vitro</i> sobre a liberação de mediadores inflamatórios em células obtidas de linfonodos de animais imunizados com mBSA.....	45
3.10. Efeito do EGS e da proteína LJM 111 sobre a expressão de moléculas coestimulatórias em células dendríticas diferenciadas da medula óssea (BM-DC) e estimuladas com LPS.....	45
3.10.1. Geração de células dendríticas (DCs).....	45
3.10.2. Efeito do EGS e da proteína LJM 111 sobre a maturação de DCs.....	46

3.11. Amostra populacional – Seleção de indivíduos sadios e pacientes com artrite reumatóide.....	46
3.12. Efeito do EGS sobre a proliferação de células obtidas do fluido sinovial de pacientes com AR estimuladas com colágeno II.....	47
3.12.1. Ensaio de proliferação celular.....	47
3.13. Efeito do EGS sobre a proliferação de células obtidas de sangue periférico de pacientes com AR e de sangue de indivíduos saudáveis estimuladas com fitohemaglutinina (PHA).....	48
3.14. Obtenção de neutrófilos da medula óssea do fêmur e tíbia de camundongos e de sangue periférico e líquido sinovial de pacientes com AR.....	48
3.15. Ensaio de quimiotaxia de neutrófilos frente a estímulos quimiotáxicos.....	49
3.15.1. Efeito do EGS e da proteína LJM 111 sobre a quimiotaxia de neutrófilos obtidos da medula óssea de camundongos Balb/c frente a MIP-2.....	49
3.15.2. Efeito do EGS sobre a quimiotaxia de neutrófilos obtidos da medula óssea de camundongos HeJ, HePAS, C57/Bl6 e TLR2-/- estimulados com MIP-2/CXCL2.....	49
3.15.3. Efeito do EGS sobre a quimiotaxia de neutrófilos obtidos de sangue periférico de indivíduos saudáveis ou de sangue e líquido sinovial de pacientes AR frente a IL-8/CXCL8.....	50
3.15.4. Efeito do EGS sobre a quimiotaxia de neutrófilos obtidos de sangue periférico de indivíduos saudáveis frente ao C5a, fMLP ou LTB ₄	50
3.16. Avaliação da expressão de CXCR2 em neutrófilos por citometria de fluxo.....	50
3.16.1. Efeito do EGS sobre a expressão de CXCR2 em neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos Balb/c.....	51
3.16.2. Efeito do EGS sobre a expressão de CXCR2 em neutrófilos isolados de sangue periférico de pacientes com AR.....	51
3.16.3. Efeito do EGS sobre a expressão de C5aR, FPR1 ou de LTB ₄ R1 em neutrófilos isolados de sangue periférico de indivíduos saudáveis.....	51
3.17. Imunofluorescência para avaliação do conteúdo de F-actina em neutrófilos frente a estímulos quimiotáxicos.....	52

3.17.1. Efeito do EGS e da proteína LJM 111 sobre o conteúdo de F-actina em neutrófilos obtidos da medula óssea de camundongos Balb/c frente a MIP-2/CXCL2.....	52
3.17.2. Efeito do EGS sobre o conteúdo de F-actina em neutrófilos obtidos de sangue periférico de pacientes com AR frente a IL-8.....	53
3.18. Avaliação da dinâmica de cálcio intracelular por microscopia confocal em neutrófilos obtidos do sangue periférico de indivíduos saudáveis e pré-tratados ou não com o EGS frente a IL-8.....	53
3.19. Imunofluorescência para avaliação da expressão de GRK-2 em neutrófilos.....	53
3.19.1. Efeito do EGS sobre a expressão de GRK-2 em neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos Balb/c.....	54
3.19.2. Efeito do EGS sobre a expressão de GRK-2 em neutrófilos isolados de sangue periférico de pacientes com AR.....	54
3.20. Análise estatística.....	54
4. Resultados.....	55
4.1. Efeito do extrato de glândula salivar (EGS) de <i>Lutzomyia longipalpis</i> sobre parâmetros inflamatórios em modelo experimental de artrite e o mecanismo envolvido.....	56
4.2. Efeito do EGS sobre a quimiotaxia <i>in vitro</i> de neutrófilos e avaliação dos mecanismos envolvidos.....	66
4.3. Identificação dos constituintes protéicos presentes no EGS que são responsáveis pela inibição da migração de neutrófilos em modelo experimental de inflamação imune e o mecanismo envolvido.....	81
5. Discussão.....	92
6. Conclusão.....	103
7. Referências Bibliográficas.....	105
8. Anexos.....	119

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Artrite Reumatóide

A artrite reumatóide (AR) é uma doença auto-imune, inflamatória e crônica que afeta aproximadamente 1% da população. O processo inflamatório é caracterizado por infiltrado de neutrófilos, células T, células B, células dendríticas (DCs) e macrófagos no tecido e fluido sinovial levando à destruição da cartilagem e osso (Tak e Bresnihan, 2000). Embora a exata etiologia da AR permaneça desconhecida, sabe-se que linfócitos autoreativos e anticorpos estão envolvidos na patogênese da doença (Harris, 1990). Além disso, as citocinas medeiam a comunicação entre as células, resultando na atração de células do sistema imune e inflamatórias para as articulações e na ativação de células para liberar produtos que levam à destruição tecidual. Sabe-se que as citocinas próinflamatórias TNF- α e IL-1 β são importantes na patogênese da AR, levando a um aumento da produção de outras citocinas, quimiocinas e enzimas degradativas (Arend e Dayer, 1995).

Embora os modelos experimentais não mimetizem a complexidade da AR humana, alguns destes modelos têm sido usados para o entendimento da artrite, uma vez que apresentam muitas características semelhantes à AR humana (Trentham, Townes *et al.*, 1977). Nos últimos anos, entre os modelos mais utilizados, é usado o modelo de artrite induzida por antígeno (AIA), onde a proteína albumina bovina sérica metilada (mBSA) é utilizada na forma de antígeno solúvel associada ao adjuvante de Freund. Deste modo, estudos em modelos experimentais têm resultado em um melhor entendimento sobre a função de diferentes tipos celulares e mediadores inflamatórios no desenvolvimento da artrite, bem como para o desenvolvimento de novas drogas.

Dentre os tipos celulares envolvidos na AR, as DCs destacam-se como sendo as células apresentadoras de antígeno (APCs) mais eficazes e que em contato com antígenos e citocinas se tornam ativadas (Sarkar e Fox, 2005). As DCs ativadas liberam vários mediadores inflamatórios que em conjunto com os sinais dependentes da interação antígeno-MHC e da coestimulação contribuem

para a ativação e proliferação de células T CD4⁺ (Nathan, 2006; Gutcher e Becher, 2007).

As respostas mediadas por linfócitos T podem exibir um padrão T auxiliar 1 (Th1), Th2 ou Th17. Esta polarização é determinada por citocinas típicas de cada padrão e envolve a participação de quimiocinas e tipos celulares característicos que determinam o prognóstico e o curso de diversas doenças infecciosas, inflamatórias ou autoimunes (Mosmann, Cherwinski *et al.*, 1986; Jankovic, Liu *et al.*, 2001). O padrão de resposta Th1 é primariamente dependente da produção da IL-12 liberada pelas APCs. Além de determinar uma resposta imune adaptativa, a citocina IL-12 induz os linfócitos Th1 a secretarem a prototípica citocina Th1, IFN- γ (Szabo, Sullivan *et al.*, 2003). O IFN- γ apresenta diversos efeitos no sistema imune, sendo a principal citocina ativadora de macrófagos, estimulando a fagocitose, captação e apresentação de antígenos, produção de outras citocinas inflamatórias e mediadores antimicrobianos, como o óxido nítrico (O'garra, 1989; Bogdan, Rollinghoff *et al.*, 2000; Bogdan, 2001). O padrão de resposta Th2 possui características anti-inflamatórias e de resposta imune predominantemente humoral, onde a citocina IL-4 produzida por células Th2 pode favorecer a sobrevivência e a multiplicação de parasitas dentro de macrófagos (Barral, Barral-Netto *et al.*, 1993; Belkaid, Kamhawi *et al.*, 1998) e induzir uma imunidade humoral dependente de linfócitos B (Modlin e Nutman, 1993).

As células Th17 foram estabelecidas, mais recentemente, como um subtipo independente das células Th, através da identificação de fatores de diferenciação que são únicos deste tipo celular. Foi demonstrado que o TGF- β associado a IL-6 é essencial para o desenvolvimento de células Th17 a partir de células T virgens. Essa diferenciação se deve ao fato de que a combinação dessas citocinas, além de induzir a produção de IL-23 por APCs, induz a expressão de IL-23R que não é expresso em linfócitos T virgens. Esta expressão, além de tornar a célula responsiva a IL-23, estabiliza e fortalece o fenótipo de Th17 (Boniface, Blom *et al.*, 2008). Outra citocina relacionada à indução de Th17 é a IL-1 β , onde um estudo demonstra que camundongos IL-1R^{-/-} falham para montar uma resposta Th17 após a imunização com MOG (antígeno da bainha de mielina) e linfócitos T provenientes desses animais cultivados com IL-23, não produzem IL-17 (Sutton, Brereton *et al.*, 2006).

Também é demonstrado que a IL-1 e o TNF aumentam o número de células Th17 geradas *in vitro* na presença de IL-6 e TGF- β (Veldhoen, Hocking *et al.*, 2006).

A importância de citocinas e quimiocinas na fisiopatologia da artrite reumatóide tem sido demonstrada tanto em modelos animais como em humanos (Feldmann, Brennan *et al.*, 1996). De fato, vários desses mediadores, como o TNF, IL-1 β e a quimiocina IL-8/CXCL8, são encontrados no líquido sinovial de pacientes com artrite (Fontana, Hengartner *et al.*, 1982; Di Giovine, Nuki *et al.*, 1988; Brennan, Zachariae *et al.*, 1990). Podolin *et al.* (Podolin, Bolognese *et al.*, 2002) demonstram que o tratamento com um antagonista não peptídico do receptor CXCR2, ligante de IL-8/CXCL8, reduz efetivamente a migração de neutrófilos, o que se correlaciona muito bem com a diminuição das lesões observadas utilizando o modelo de AIA. De modo semelhante, o tratamento com anticorpo anti-LIX/CXCL5 antes do estabelecimento da AIA leva à diminuição da intensidade da inflamação do joelho, mostrando a participação desta quimiocina, ligante do receptor CXCR2, na progressão da artrite (Halloran, Woods *et al.*, 1999).

Além disto, estudos utilizando o modelo experimental de artrite induzida por colágeno do tipo II demonstram que os animais artríticos tratados com anticorpos monoclonais contra o TNF ou com antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra) apresentam uma melhora na doença bem como uma menor incidência (Piguet, Grau *et al.*, 1992; Thorbecke, Shah *et al.*, 1992; Wooley, Whalen *et al.*, 1993). Ainda, tem sido demonstrada a presença da citocina IL-15 no soro e na membrana sinovial de pacientes com AR (McInnes, Al-Mughales *et al.*, 1996; Kotake, Schumacher *et al.*, 1997; Liew e McInnes, 2002). Em associação com a IL-18, IL-12 e IFN- γ , a IL-15 também foi detectada na sinóvia de pacientes com artrite reumatóide juvenil (Scola, Thompson *et al.*, 2002). Suas atividades biológicas envolvem a proliferação e quimiotaxia de células TCD4⁺ e CD8⁺, estímulo do crescimento de células NK, produção de IFN- γ e de imunoglobulina presente no tecido sinovial. Esses dados foram suportados pela observação de que a expressão de IL-15 leva ao aumento de linfócitos T presentes na sinóvia de animais susceptíveis à artrite induzida por colágeno (McInnes, Al-Mughales *et al.*, 1996). Gracie *et al.* (Gracie, Forsey *et al.*, 1999) demonstram que a IL-18

induz a produção de TNF- α , óxido nítrico (NO) e IFN- γ em células sinoviais isoladas de pacientes com artrite reumatóide.

A IL-17, produzida por células Th17, desempenha um papel crítico na patogênese e perpetuação da AR (Bettelli, Korn *et al.*, 2008). Estudos demonstram que camundongos deficientes para a IL-17 ou para a IL-6 são resistentes à indução de artrite induzida por colágeno (Sasai, Saeki *et al.*, 1999; Nakae, Nambu *et al.*, 2003) e evidências suportam que os níveis de IL-17 e IL-6, bem como o número de células T expressando IL-17, estão aumentados no fluido sinovial de pacientes com AR (Kotake, Udagawa *et al.*, 1999; Hwang e Kim, 2005). Em particular, a IL-17 pode aumentar e/ou sinergizar com os mediadores inflamatórios presentes no local da inflamação, tais como: IL-6, IL-1 β e TNF (Chabaud, Durand *et al.*, 1999; Katz, Nadiv *et al.*, 2001; Legrand, Fermor *et al.*, 2001); promover a injúria da matriz extracelular por meio da ativação de metaloproteinases (MMP) e induzir a produção de óxido nítrico e inibir os componentes envolvidos no reparo tecidual como proteoglicanos e colágeno (Jovanovic, Di Battista *et al.*, 1998; Jovanovic, Martel-Pelletier *et al.*, 2000). A IL-17 também estimula fibroblastos, células endoteliais, células epiteliais e macrófagos a produzir quimiocinas, IL-1, IL-6, ICAM-1, PGE₂, MMPs, NOS-2, dentre outros mediadores envolvidos com a migração celular. Além disso, a IL-17 induz a expressão de RANKL, o qual é crucial para a diferenciação de osteoclastos funcionais resultando em reabsorção óssea. É importante ressaltar que a combinação de todos estes fatores induzidos e/ou amplificados pela IL-17 é um fator preponderante para os efeitos patológicos observados na reabsorção do osso, degeneração da matriz extracelular, proliferação e inflamação da sinóvia, angiogênese, recrutamento e ativação de células do sistema imune presentes na articulação (Lubberts, 2008). Desta forma, intervenções farmacológicas que reduzam ou bloqueiem a produção e/ou liberação de IL-17 podem apresentar-se como alvos com potencial efeito terapêutico para o tratamento da AR.

1.2. Migração de neutrófilos

1.2.1. Mediadores envolvidos no recrutamento de neutrófilos

Os neutrófilos são os primeiros a serem recrutados para o foco inflamatório e os mais abundantes leucócitos presentes nas articulações de pacientes com AR na forma ativa da doença (Kitsis e Weissmann, 1991; Wipke e Allen, 2001). O processo de migração de neutrófilos durante a resposta inflamatória é mediado por diferentes mediadores inflamatórios, os quais promovem um aumento nas interações entre os leucócitos e as células endoteliais e favorecem a migração destes leucócitos a favor do gradiente de concentração entre a área lesada e as vênulas pós-capilares (Huttenlocher, Sandborg *et al.*, 1995). Mais detalhadamente, após a liberação de mediadores inflamatórios, iniciam-se as etapas que envolvem a interação dos neutrófilos com o endotélio vascular. 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 à 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 (Jones, Abbassi *et al.*, 1993; Lawrence e Springer, 1993; Smith, Berg *et al.*, 1999; Simon e Green, 2005). Estas ligações específicas, embora fracas, resultantes da interação de selectinas e seus ligantes, favorecem à redução 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 ao aumento da expressão das moléculas da superfamília das imunoglobulinas no endotélio, resultando em uma forte adesão entre os neutrófilos e as células endoteliais (Hynes, 1992a; b; Taylor, Neelamegham *et al.*, 1996; Hentzen, Neelamegham *et al.*, 2000; Neelamegham, Taylor *et al.*, 2000). Esta aderência permite aos neutrófilos penetrarem, principalmente, nas junções intercelulares presentes entre as células endoteliais (diapedese), degradando a membrana basal com o auxílio de enzimas proteolíticas, ultrapassando a barreira

endotelial. Uma vez ultrapassada a barreira endotelial, os neutrófilos migram por meio dos tecidos em direção ao gradiente de concentração de uma ou mais molécula (s) quimiotáxica (s) a fim de se dirigirem ao foco inflamatório, um evento conhecido como quimiotaxia (Huttenlocher, Sandborg *et al.*, 1995; Wagner e Roth, 2000; Ley, Laudanna *et al.*, 2007).

Conforme relatado na literatura, diversos mediadores inflamatórios estão envolvidos no recrutamento de neutrófilos, entre estes, destacam-se as citocinas como o TNF, IL-17, IL-15 e IL-18, uma variedade de quimiocinas incluindo IL-8/CXCL8, GRO- α /CXCL1, ENA-78/CXCL5, MIP-2/CXCL2, os derivados lipídicos como o LTB₄ e o PAF e os componentes do sistema complemento como o C5a (Mulder e Colditz, 1993; Mantovani, Sozzani *et al.*, 1997; Binder, Kress *et al.*, 1999; Figarella-Branger, Civatte *et al.*, 2003). Dentre estes mediadores importantes na migração de neutrófilos, a IL-17 induz a síntese de quimiocinas como MIP-2/CXCL2, KC/CXCL1, IL-8/CXCL8, bem como de ICAM-1 e PGE₂, dentre outros mediadores envolvidos na migração neutrofilica (Aggarwal, Ghilardi *et al.*, 2003). O TNF também promove a síntese e liberação de fatores quimiotáxicos (Faccioli, Souza *et al.*, 1990), como também contribui com um aumento da expressão de ICAM-1 em células endoteliais (Vieira, Lemos *et al.*, 2009).

Um estudo utilizando o modelo de artrite induzida por colágeno II evidenciou que a IL-18 ativa a produção de TNF, o qual induz a síntese de LTB₄, que por sua vez leva a migração de neutrófilos para o sítio inflamatório (Canetti, Leung *et al.*, 2003). Ademais, outro estudo demonstrou que a quimiocina GRO- α /CXCL1 pertencente à sub-família CXC é importante na migração de neutrófilos para a articulação de pacientes com artrite reumatóide, sendo que a GRO- α /CXCL1 é responsável por 28% da atividade quimiotáxica para neutrófilos enquanto que a ação combinada de GRO- α /CXCL1, ENA-78/CXCL5 e IL-8/CXCL8 é responsável por 50% da atividade quimiotáxica no fluido sinovial (Koch, Kunkel *et al.*, 1995).

Nos últimos anos, nosso laboratório vem investigando os mecanismos envolvidos no recrutamento de neutrófilos em reações inflamatórias que ocorrem em modelos de inflamação de origem imune. Os resultados sugerem que a migração de neutrófilos induzida pela OVA em animais imunizados é dependente de MIP-1 α /CCL3 seguido da liberação de TNF por linfócitos T

CD4⁺ que, em seguida, induz a síntese de LTB₄ promovendo o influxo de neutrófilos para o local do estímulo (Canetti, Silva *et al.*, 2001; Ramos, Canetti *et al.*, 2005). Outros grupos de pesquisa também demonstram o papel do TNF- α e do LTB₄ na migração de neutrófilos em diversos modelos de reação inflamatória, tais como a artrite 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, Yasui *et al.*, 2000).

Recentemente, demonstramos que a migração de neutrófilos induzida por IL-23 para a cavidade articular de animais com AIA é modulada por PGE₂, a qual aumenta a síntese de IL-17 e inibe a produção de IL-12 e IFN- γ . Deste modo a PGE₂ atua como moduladora positiva no recrutamento de neutrófilos (Lemos, Grespan *et al.*, 2009). O recrutamento de neutrófilos é, ainda, dependente posteriormente das quimiocinas KC/CXCL1 e LIX/CXCL5 seguido do LTB₄ que atuam de modo seqüencial na migração de neutrófilos. Ademais, foram detectadas quantidades elevadas de tais mediadores no tecido sinovial de pacientes com artrite reumatóide (Grespan, Fukada *et al.*, 2008).

1.3. Saliva de insetos hematófagos

A saliva de insetos hematófagos é exposta ao sítio de picada quando estes insetos entram em contato com o hospedeiro durante o processo de alimentação. Os primeiros estudos realizados por Titus e Ribeiro (Titus e Ribeiro, 1988) demonstraram que as interações entre as salivas de insetos e o hospedeiro influenciam na transmissão de parasitas da *Leishmania*. As salivas modificam a fisiologia do hospedeiro no sítio da picada, deixando-o mais permissivo para o patógeno invasor. Ademais, diversos estudos demonstraram que a saliva destes insetos contém vários componentes farmacologicamente ativos que apresentam atividade imunomodulatória (Ribeiro, 1987), sendo que os efeitos da saliva não estão relacionados a um efeito direto no parasita, mas sim, a um efeito na modulação da resposta imune, inflamatória e homeostática no hospedeiro (Titus e Ribeiro, 1990; Nuttall, 1998).

Os constituintes salivares destes insetos possuem atividades únicas, sinérgicas ou antagônicas que favorecem alterações no ambiente do sítio da

picada (Charlab, Valenzuela *et al.*, 1999). Estes compostos são responsáveis pela indução de vasodilatação, inibição de agregação plaquetária e dos mecanismos de coagulação, permitindo, então, um maior aporte sanguíneo no local da picada (Ribeiro, 1987). Tais compostos podem causar o relaxamento da musculatura do hospedeiro onde ocorre a picada do inseto, favorecendo o regurgitamento e, conseqüentemente, a inoculação de maiores volumes de saliva, juntamente com microrganismos quando o vetor estiver infectado (Ribeiro, 1987; Champagne, 1994; Bowman, Coons *et al.*, 1997).

Vários estudos demonstram que as salivas de *Lutzomyia longipalpis* e *Phlebotomus papatasi* possuem um papel fundamental na transmissão e estabelecimento da infecção por *Leishmania* devido à presença de componentes imunossupressores, os quais inibem o desenvolvimento de uma resposta imune do hospedeiro contra o parasita (Ribeiro, Sarkis *et al.*, 1984; Titus e Ribeiro, 1990; Lima e Titus, 1996). Haja vista a coinoculação de sonicado de glândula salivar de *P. papatasi* e *L. major* em camundongos BALB/c acarreta um aumento do tamanho da lesão e do número de parasitas quando comparados aos animais que receberam somente o parasita. Ao determinar o mecanismo pelo qual a saliva leva à exacerbação da infecção, é demonstrado que a saliva de *L. longipalpis* inibe a habilidade de macrófagos de apresentar antígenos de *Leishmania* para linfócitos T específicos contra o parasita (Theodos e Titus, 1993). Outro trabalho demonstra que a saliva inibe a produção de citocinas do padrão Th1 como IFN- γ e IL-12 e de NO e aumenta a produção de IL-4 (Belkaid, Kamhawi *et al.*, 1998). Costa *et al.* (Costa, Favali *et al.*, 2004) demonstram que a saliva de *L. longipalpis* prejudica a produção de citocinas e expressão de moléculas coestimulatórias presentes em DCs e monócitos humanos. Além disso, a saliva de *L. longipalpis* induz um recrutamento de macrófagos (Teixeira, Teixeira *et al.*, 2005), que sem ativar sinais Th1, promove a proliferação de organismos invasores. Em acordo, a saliva de *P. papatasi* não apenas atrai macrófagos, mas também aumenta a infecção de *L. donovani* nestas células, resultando em aumento da carga parasitária (Zer, Yaroslavski *et al.*, 2001). A infecção pela *L. braziliensis*, que mesmo em camundongos susceptíveis termina em cura espontânea, na presença de saliva de *L. longipalpis* resulta na formação de lesões cutâneas

progressivas com a presença de macrófagos densamente parasitados (Lima e Titus, 1996).

Em função destes trabalhos, foi iniciado em nosso laboratório um projeto de pesquisa com o objetivo de investigar uma possível atividade anti-inflamatória do extrato de glândula salivar (EGS) de *L. longipalpis* em modelo de resposta inflamatória com padrão do tipo Th1. Especificamente, foi investigado o efeito do EGS sobre a migração de neutrófilos e a produção de mediadores inflamatórios envolvidos no recrutamento deste tipo celular em modelo de animais imunizados e desafiados com OVA. Deste modo, foi demonstrado que o pré-tratamento dos animais imunizados com o EGS inibe o recrutamento de neutrófilos induzido por OVA em animais imunizados, mas não aquele induzido por LPS, sugerindo que a inibição ocorre somente em inflamações de origem imune. Ademais, observou-se que o EGS inibe a liberação de TNF, IL-1 β e LTB₄ e potencializa a produção de IL-10 e IL-4, direcionando a resposta para um padrão Th2 (Monteiro, Nogueira *et al.*, 2005), assim, sugerindo que componentes da saliva de insetos hematófagos possam ter potencial terapêutico para o tratamento de doenças autoimunes, como a artrite reumatóide.

1.4. Constituintes das salivas de insetos hematófagos

Nos últimos tempos, inúmeros grupos de pesquisadores têm investigado quais são os componentes presentes nas salivas de insetos hematófagos que apresentam atividade imunomodulatória, como descrita acima. Foi demonstrado que a saliva de *L. longipalpis* possui um neuropeptídeo (Nong, Titus *et al.*, 1989; Titus e Ribeiro, 1990) que promove tanto efeito vasodilatador como imunomodulatório. O gene que codifica este neuropeptídeo nas glândulas salivares dos insetos foi identificado e denominado maxadilan (Max) (Lerner, Ribeiro *et al.*, 1991). A injeção do Max recombinante na pele de camundongos induz à formação de eritema com característica semelhante ao eritema observado após a injeção do homogenato da glândula salivar ou da picada do inseto (Ribeiro, 1987). O Max modula a produção de citocinas e inibe a proliferação de linfócitos T (Qureshi, Asahina *et al.*, 1996; Bozza, Soares *et*

al., 1998). O Max inibe a produção de NO, H₂O₂ e TNF por macrófagos, substâncias responsáveis pela morte do parasita (Titus, Theodos *et al.*, 1994). Por outro lado, o Max aumenta a produção de IL-10, PGE₂ e IL-6, os quais são importantes para o prolongamento da sobrevivência de *L. major*. A IL-10 regula negativamente a produção de IFN- γ e inibe a produção de NO por macrófagos (Cunha, Moncada *et al.*, 1992; Moore, O'garra *et al.*, 1993). Tais efeitos do Max em macrófagos mostram a participação de componentes presentes na saliva na exacerbação da infecção com *L. major* nos camundongos (Gillespie, Mbow *et al.*, 2000). Morris *et al.* (Morris, Shoemaker *et al.*, 2001) demonstram que a vacinação de animais com Max leva ao aumento dos níveis de anticorpos contra esta proteína e resulta em animais protegidos contra a infecção por *L. major*. Ao contrário da saliva de *L. longipalpis* que contém o Max, a saliva de *P. papatasi* contém uma mistura de adenosina e 5'-AMP que apresenta atividade vasodilatadora e inibe o gene da sintase do NO em macrófagos ativado (Ribeiro, Katz *et al.*, 1999; Katz, Waitumbi *et al.*, 2000). Ainda, uma atividade tipo 5'-nucleotidase foi demonstrada em *L. longipalpis*, mas não em *P. papatasi* (Charlab, Valenzuela *et al.*, 1999).

O sequenciamento da biblioteca de cDNA obtido da glândula salivar de *L. longipalpis* e *P. papatasi*, identificou, em ambas, um gene que codifica uma proteína com atividade de adenosina deaminase (ADA) (Charlab, Valenzuela *et al.*, 1999). Tal enzima hidrolisa a adenosina, que é um mediador da dor periférica, modulador do crescimento, da diferenciação e indutor de apoptose celular. A remoção da adenosina leva à redução na percepção de dor no local, e assim reduz a possibilidade do inseto morrer durante a picada pelo hospedeiro (Burnstock e Wood, 1996). O acúmulo local de inosina pela hidrólise da adenosina por ADA leva a uma potente inibição de mediadores inflamatórios como TNF, IL-1, IL-12, MIP-1 α /CCL3 e IFN- γ (Hasko, Kuhel *et al.*, 2000). A atividade anticoagulante pode ser atribuída, pelo menos parcialmente, à enzima apirase, que degrada ATP para AMP e ortofosfato, deste modo, destruindo um importante mediador fisiológico de agregação plaquetária (Ribeiro, Schneider *et al.*, 1998). Além da apirase, outros componentes, como a PGE₂ e a prostaciclina, também bloqueiam a agregação plaquetária e promovem a vasodilatação (Valenzuela, Belkaid *et al.*, 2001). A saliva do inseto *Simulium vittatum* contém a substância simulidina, que

apresenta atividade anticoagulante por inibir a trombina e inibidores de trombinas estão presentes nas salivas de *Anopheles albimanus* (Francischetti, Valenzuela *et al.*, 1999) e do carrapato *Amblyomma americanum* (Zu, Qi *et al.*, 1998). Ademais, a saliva de *P. papatasi* contém uma proteína de 15 kDa, chamada de PpSP15, onde camundongos imunizados com esta proteína são capazes de controlar a infecção por *L. major* e apresentar uma carga parasitária diminuída em relação à animais não-tratados (Oliveira, Lawyer *et al.*, 2008).

Valenzuela *et al.* (Valenzuela, Garfield *et al.*, 2004) isolaram e identificaram as proteínas presentes na glândula salivar da *L. longipalpis* utilizando sequenciamento de cDNA, proteômica e bioinformática. Os autores escolheram aleatoriamente 550 clones da biblioteca de cDNA da glândula salivar, sendo que destes foram encontradas 143 famílias de proteínas e destas 35 clones contendo um peptídeo sinal secretório. Dentre as proteínas secretadas, incluem-se 3 membros da família amarela, maxadilan, proteína PpSP-15, peptidase, endonuclease, 9 novos peptídeos, entre outras. Deste modo, a fim de determinarmos quais os constituintes presentes na saliva deste inseto possuem a atividade imunomodulatória descrita para o EGS, iniciamos uma colaboração com os laboratórios dos professores Dr. Jesus G. Valenzuela e Dr. José Marcos Ribeiro (National Institute of Health- NIH). Assim, uma proteína ou um coquetel de proteínas contidas na saliva de *L. longipalpis* pode, no futuro, ser alvo terapêutico para o tratamento de doenças inflamatórias, como a artrite reumatóide.

OBJETIVOS

2. Objetivos

Objetivos Gerais:

- 1- Investigar se o extrato de glândula salivar (EGS) de *Lutzomyia longipalpis* apresenta atividade anti-inflamatória em modelo experimental de artrite;
- 2- Determinar os mecanismos anti-inflamatórios induzido por esta saliva;
- 3- Identificar os constituintes salivares com as propriedades anti-inflamatórias e se for o caso, investigar o mecanismo pelo qual estes atuam.

Objetivos Específicos:

- 1- Avaliar o efeito do EGS de *L. longipalpis* sobre o recrutamento de neutrófilos e sobre a liberação de mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α e IL-17, os quais estão envolvidos no recrutamento de neutrófilos;
- 2- Desenvolver o modelo experimental de artrite induzida por colágeno (CIA) e avaliar a eficácia terapêutica do EGS de *L. longipalpis* neste modelo;
- 3- Avaliar o efeito do EGS sobre a expressão de moléculas envolvidas com a apresentação de antígeno;
- 4- Analisar o efeito do EGS sobre a quimiotaxia *in vitro* de neutrófilos. Em particular, avaliar o efeito do EGS sobre a quimiotaxia de neutrófilos frente a diferentes estímulos quimiotáxicos e posteriormente, o mecanismo envolvido;
- 5- Isolar os constituintes presentes no EGS de *L. longipalpis* com atividade anti-inflamatória, sendo que para isto serão utilizados plasmídeos contendo genes que codificam para proteínas presentes no EGS;

6- Se for o caso, testar o efeito do(s) constituinte(s) presente no EGS sobre a quimiotaxia *in vitro* de neutrófilos, sobre a liberação de mediadores pró-inflamatórios envolvidos no recrutamento de neutrófilos e sobre a expressão de moléculas envolvidas com a apresentação de antígeno.

METODOLOGIA

3. Metodologia

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c, animais não responsivos para LPS (C3H/HeJ) e seu controle (C3H/HePAS) e animais C57BL/6 e deficientes para TLR2, 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 os princípios éticos de experimentação animal e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (certificado nº 004/2009, em anexo).

3.2. Obtenção do Extrato de Glândula Salivar (EGS) de *Lutzomyia longipalpis*

As glândulas salivares de *L. longipalpis* foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Jesus Valenzuela, do NIH (National Institute of Health, Bethesda-USA), com o qual trabalhamos em parceria neste projeto. Brevemente, as glândulas salivares obtidas do inseto foram sonicadas e, em seguida, o material foi transferido para um tubo eppendorf (1,5ml) e utilizado o Speed Vac Concentrator (Savant SPD1010), durante uma hora, para liofilizar a amostra. Os extratos de glândulas salivares foram diluídos em água para a obtenção de uma glândula/0,001ml.

3.3. Sensibilização e desafio com OVA ou mBSA – Tratamento com o EGS nos animais sensibilizados

Os animais BALB/c foram sensibilizados com 200 µL de uma emulsão contendo mBSA (500 µg) ou OVA (100 µg) e volumes iguais de PBS e adjuvante completo de Freund (CFA), através de injeção s.c., no dorso dos

animais. Após 7 e 14 dias, os animais receberam reforços da imunização com o antígeno, porém em uma emulsão contendo PBS e adjuvante incompleto de Freund (IFA). Decorridos 21 dias após a primeira imunização, os animais imunizados foram pré-tratados com salina ou com o EGS por via i.v. (1 glândula/animal; i.v.) 48 horas antes do desafio com OVA ou mBSA. Em seguida, os animais imunizados foram desafiados intraperitonealmente (i.p.) com OVA (10 µg/cavidade) ou mBSA (30 µg/cavidade) ou com salina (controle negativo). Após 6 horas, os animais foram sacrificados, a pele do abdômen foi aberta com uma incisão mediana, sem lesar a musculatura e, a cavidade peritoneal lavada com 3 ml de tampão PBS contendo EDTA (1 mM). A partir do lavado peritoneal foram feitas as contagens total e diferencial das células como descrito abaixo.

3.4. Construção de plasmídeos codificando para proteínas presentes no EGS e seu tratamento em animais imunizados e desafiados com OVA.

Os plasmídeos codificando para proteínas salivares foram clonados no vetor VR2001-TOPO e purificados. Grupos de plasmídeos foram preparados baseados nas proteínas codificantes, como descrito a seguir: Grupo 1: LJM 35, LJM 17, LJM 08, LJM 38, LJM 04, LJM 192, LJM 19, LJM 91, LJM 15; Grupo 2: LJM 11, LJM 34, LJM 13, LJM 23; Grupo 3: LJM 10, LJM 143, LJM 142, LJM 17, LJM 06, LJM 04; Grupo 4: LJM 114, LJM 111, LJM 78, LJM 238, LJM 169, LJM 105 e Grupo 5: LJM 09, LJM 26, LJM 03, LJM 124, LJM 138, LJM 138, LJM 193 e LJM 201. Os animais imunizados foram tratados com 50 µg dos plasmídeos codificando para as proteínas destes grupos (injeção intramuscular) em 50 µl de salina 48 horas antes do desafio com OVA. Como controle, outro grupo de animais foi injetado com plasmídeos sem codificar genes para proteínas. A migração neutrofílica para a cavidade peritoneal foi avaliada, como descrito abaixo.

3.5. Modelo de artrite induzida por mBSA - Tratamento com o EGS ou com a proteína LJM 111 nos animais imunizados

Camundongos BALB/c foram imunizados, através de injeção s.c., com 200 µL de uma emulsão contendo volumes iguais de salina e CFA, na qual

estava dissolvida 500 µg de mBSA. No 7º e 14º dia após a primeira imunização foram administrados reforços da emulsão com IFA. No 21º dia, os animais imunizados foram pré-tratados, através de via intravenosa (i.v.), com salina, com o EGS (1 gl/animal, 24 hs antes do desafio) ou com a proteína LJM 111 (30, 100 ou 300 ng/animal, 15 minutos antes do desafio). Em seguida, os animais imunizados foram desafiados com mBSA (10 µg/cavidade) ou salina (controle negativo) através de injeção intra-articular (articulação fêmur-tibial). Após 24 horas, os animais foram sacrificados em câmara de éter para a avaliação da migração de neutrófilos. Para tal, foi realizado o lavado intra-articular com 5 µl de PBS contendo EDTA (duas vezes) e estes diluídos em 90 µL de PBS contendo EDTA. Deste lavado foi determinada a contagem total e diferencial dos leucócitos conforme descrito abaixo. É importante mencionar que a proteína LJM 111 recombinante foi cedida pelo Prof. Dr. Jesus Valenzuela, do NIH (National Institute of Health, Bethesda-USA).

3.5.1. Contagem total dos leucócitos

A quantificação total do infiltrado celular foi realizada em contador automático de células (COUNTER® A^C T; Coulter Corporation, Miami, Florida, USA).

3.5.2. Contagem diferencial dos leucócitos

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

encontrado em relação ao número total de células. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) do número de neutrófilos por cavidade.

3.6. Modelo de artrite induzida por colágeno (CIA) - Tratamento com o EGS nos animais imunizados

A artrite experimental foi induzida utilizando colágeno bovino do tipo II (CII), gentilmente cedido pelo professor Dr. David Brand (Memphis – EUA). Cada animal recebeu uma injeção intradérmica (0,1ml) de uma emulsão contendo 200 mg de CII, previamente dissolvido em 50 mM de ácido acético, diluída em volumes iguais de PBS e CFA. Os camundongos foram monitorados diariamente e avaliados os escores clínicos, de acordo com a classificação de Brand et al (Brand, Latham *et al.*, 2007), com algumas modificações. Brevemente, a gravidade dos escores clínicos foi classificada 0 a 6, sendo que 0 representa os animais sem nenhuma evidência de eritema ou edema, 1 representa os animais com edema e eritema leve confinados às articulações do tornozelo ou tarsais, 2 representa os animais com edema e eritema moderado confinados às articulações do tornozelo ou tarsais, 3 representa os animais com edema e eritema grave confinados às articulações do tornozelo ou tarsais, 4 representa os animais com edema e eritema leve abrangendo às articulações do tornozelo às tarsais, 5 representa os animais com edema e eritema moderado abrangendo às articulações do tornozelo às metatarsais e 6 representa os animais com edema e eritema grave abrangendo às articulações do tornozelo às metatarsais. No primeiro dia de manifestação dos sinais clínicos (22º dia após o desafio), os camundongos foram tratados diariamente por via intravenosa com o EGS de *L. longipalpis* (1 glândula/ camundongo) durante dez dias e, então, avaliados os escores clínicos.

3.7. Efeito do EGS sobre o conteúdo de glicosaminoglicanos (GAGs) em patelas obtidas de camundongos imunizados e desafiados com mBSA

Os animais BALB/c foram pré-tratados com o EGS (1g/animal) e desafiados com mBSA (40 µg/cavidade articular), como descrito anteriormente e continuaram sendo tratados com a mesma dose de EGS uma vez ao dia, durante seis dias, sendo que no terceiro dia estes animais foram re-desafiados com mBSA (40 µg/cavidade articular). No sexto dia, após o primeiro desafio os animais foram sacrificados e as patelas coletadas para avaliação de GAGs. Brevemente, as patelas foram fixadas em 10% de formalina por 12 horas, descalcificadas em ácido fórmico (5%) durante 4 horas, e subseqüentemente cada patela foi digerida durante a noite a 60°C em 60 microl de 10 mg/ml de papaina (tipo IV; Sigma) em acetato de sódio de 0.1 M, pH 6.5, L-cysteine de 10 mM e EDTA dissódico 50 mM. O sobrenadante foi coletado para medir GAGs através do ensaio colorimétrico com azul de dimetilmetileno (DMMB).

3.8. Efeito do EGS e da proteína LJM 111 sobre a hipernocicepção mecânica em camundongos imunizados e desafiados com mBSA

A hipernocicepção mecânica foi mensurada após o pré-tratamento dos animais com salina, EGS (1 glândula/animal) ou com a proteína LJM 111 (300 ng/animal) e desafio dos animais, como previamente descrito, nos tempos de 3, 5, 7 e de 24 horas após o desafio usando o equipamento Von-Frey. Brevemente, uma força perpendicular crescente foi aplicada à área central da pata traseira para induzir flexão da articulação fêmur-tibial, seguido da retirada da pata. O aparato de pressão eletrônica registrou a intensidade da força aplicada automaticamente quando a pata foi retirada. O teste foi subseqüentemente repetido por 3 mensurações consistentes (a variação entre estas mensurações era menos de 1 g). Os resultados foram expressos pelo limiar de retirada em gramas (g).

3.9. Efeito do EGS e da proteína LJM 111 *in vitro* sobre a liberação de mediadores inflamatórios em células obtidas de linfonodos de animais imunizados com mBSA

As células (5×10^5 células / poço) obtidas dos linfonodos inguinal e poplíteo de animais imunizados com mBSA foram incubadas com meio RPMI 1640 (como controle positivo), com o EGS (0,1; 0,3 ou 1,0 glândula/ml) ou com a proteína LJM 111 (300; 900 ou 2700 ng/ml) por 2 horas e após este período, as células foram estimuladas com mBSA (10 µg/ml). Como controle negativo as células foram incubadas com meio, e 36 horas após as células foram centrifugadas e o sobrenadante coletado para a mensuração de IL-17, IFN-γ e TNF através do ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando-se um “Kit” comercial (Genzyme) seguindo as recomendações do fabricante. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Spectra Max-250, Molecular Devices) ajustado para o comprimento de onda de 490 nm. Os resultados foram expressos em picogramas (pg)/ml, baseando-se na curva-padrão para cada citocina.

3.10. Efeito do EGS e da proteína LJM 111 sobre a expressão de moléculas coestimulatórias em células dendríticas (DCs) e estimuladas com LPS

3.10.1. Geração de DCs

As DCs foram geradas *in vitro* a partir de células precursoras da medula óssea (BM-DC) de camundongos BALB/c, conforme o método descrito por Inaba et al (Inaba, Swiggard *et al.*, 2001). Brevemente, as células foram distribuídas em placas de petri (Falcon; BD Discovery Labware) numa concentração de 1×10^6 células/placa e cultivadas com meio completo (RPMI 1640 suplementado com 10% de SBF, 100U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina) acrescido de 20ng/ml de GM-CSF recombinante murino (Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, MO, USA). No 3° e 6° dia de cultura, outros 20ng/ml de GM-CSF foram adicionados na cultura. Decorrido o período de cultura, as DCs foram obtidas por seleção positiva utilizando beads magnéticas anti-CD11c, seguindo as recomendações do fabricante (Miltenyi Biotec). A avaliação por citometria de fluxo das células CD11c+ purificadas apresentou 85-90% de positividade para CD11c.

3.10.2. Efeito do EGS e da proteína LJM 111 sobre a maturação de DCs

Para a análise da influência do EGS na inibição da maturação de DCs, as DCs plaqueadas (5×10^5 células / tubo) foram pré-tratadas com meio, EGS (3 glândulas/ml) ou com a proteína LJM 111(2700 ng/ml) overnight e estimuladas com LPS (2 µg/ml) por 24h.

Em seguida, as células foram coletadas e colocadas na presença de 30 µL de soro de coelho por tubo (para evitar ligações inespecíficas) e a suspensão foi incubada por 30 minutos a 4°C. Após esse período foram adicionados os anticorpos específicos para anti-MHC II (clone MaP.DM1, BD Biosciences Pharmingen; São José, C.A., USA) marcado com ficoeritrina (PE), e para a molécula de superfície anti-CD86 (clone 2331 (FUN-1); BD Biosciences) marcado com FITC, bem como para os isotipos controles, e os tubos foram incubados por 30 minutos a 4°C. As células foram lavadas 2 vezes com PBS-BSA, por 10 minutos à 500 x g, e suspensas com 100µl de PBS-formol a 1%. A aquisição das células foi realizada em citômetro de fluxo (FACScan; Becton Dickinson, San Jose, USA), utilizando o canal de fluorescência 2 (FL2) para PE. As análises foram feitas usando programas “Cell Quest” (CELLQuest software; BD Biosciences) e “WinMDI” (WinMIDv2.8; The Scripps Research Institute, USA) os quais permitem analisar todas as células adquiridas (20000/amostra) ou apenas determinadas populações, individualizadas por janelas (“Gates”) estabelecidas com base em parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC) ou fluorescência (FL). Em todos os experimentos, o sobrenadante da cultura foi coletado para a mensuração dos níveis de TNF e IL-10 por ELISA.

3.11. Amostra populacional – Seleção de indivíduos sadios e pacientes com artrite reumatóide

Foram utilizadas amostras de sangue de indivíduos sadios (controle) ou pacientes com diagnóstico positivo para AR e fluido sinovial de pacientes com AR. A seleção de indivíduos de ambos os sexos, com a idade variando entre 20 e 50 anos abrangeu pacientes selecionados no ambulatório do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São

Paulo (USP). Estes foram selecionados sob a supervisão do Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi, após análise criteriosa dos dados clínicos contidos no prontuário médico. Como controles foram utilizadas amostras de sangue de indivíduos saudáveis, onde as amostras que apresentaram qualquer tipo de patologia foram desconsideradas para análise. Os pacientes foram esclarecidos a respeito do objetivo da pesquisa, não tendo nenhuma influência sobre o tratamento em andamento e assinaram um termo de esclarecimento e livre consentimento. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, registrado pelo processo nº: 10540/2006 (em anexo).

3.12. Efeito do EGS sobre a proliferação de células obtidas do fluido sinovial de pacientes com AR e estimuladas com colágeno II

Células obtidas do líquido sinovial de pacientes com AR, sendo (1×10^5 células /poço) foram colocadas para aderir por 1 hora e, em seguida, incubadas ou não com o EGS (0,3; 1,0 ou 3,0 glândulas/ml) por 2 horas. Após este período, as células foram estimuladas com colágeno do tipo II (120 μg /poço) por mais 2 horas e, posteriormente, células mononucleares (5×10^5 células/poço) foram adicionadas. Como controle negativo, as células foram colocadas na presença de meio RPMI 1640. Em seguida, foi realizado o ensaio de proliferação celular como descrito abaixo.

3.12.1. Ensaio de proliferação celular

As células mononucleares com ou sem seu devido pré-tratamento e colocadas frente ao estímulo, foram colocadas em placas de cultura com 96 poços de fundo chato (Corning, New York) por um período de 72h em estufa a 37°C com 5% CO₂. Decorrido o período de incubação, as culturas foram pulsadas com metil-3H-timidina (Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK) por 18 horas e, então, as células foram transferidas para o papel de filtro (Cell Harvest), das quais mediu-se a radioatividade beta. A média de contagem por minuto (CPM \pm EPM) foi determinada em triplicata.

3.13. Efeito do EGS sobre a proliferação de células obtidas de sangue periférico de pacientes com AR e de sangue de indivíduos saudáveis estimuladas com fitohemaglutinina (PHA)

As células mononucleares (5×10^5 células/poço) isoladas do sangue periférico de indivíduos saudáveis e de pacientes com AR foram pré-tratadas ou não com o EGS (0,3; 1,0 ou 3,0 glândulas/ml) por 2 horas. Após este período, as células foram estimuladas com PHA (10 μ g/ml). Como controle negativo, as células foram colocadas na presença de meio RPMI 1640. Em seguida, foi realizado o ensaio de proliferação celular como descrito acima.

3.14. Obtenção de neutrófilos da medula óssea do fêmur e tíbia de camundongos e de sangue periférico de pacientes com AR

As células obtidas da medula óssea do fêmur e tíbia dos animais BALB/c, de animais não responsivos para LPS (C3H/HeJ) e seu controle (C3H/HePAS) e de animais C57BL/6 e deficientes para TLR2 e de sangue periférico de pacientes com AR e de indivíduos saudáveis foram separados em gradiente de Percoll (Sigma). Para as células obtidas de humanos foram utilizadas soluções de Percoll nas concentrações de 72%, 63%, 54% e 45%. Dois mililitros de cada solução foram adicionados em tubo falcon de 15 mL, na seguinte ordem, do fundo do tubo para cima: 1ª sol. de Percoll 72%, 2ª sol 63%, 3ª sol 54% e 4ª sol 45%. Dois mililitros e meio de sangue com EDTA foi adicionado no topo das soluções de Percoll e centrifugado a 650 g, por 30 minutos, à temperatura ambiente. As células obtidas de camundongos, em um volume de 2 mL, foram transferidas para um tubo falcon sobre um gradiente de Percoll (72% e 65%, 3 mL de cada solução) e centrifugado a 1200 g, por 30 minutos, à temperatura ambiente. A interface obtida (neutrófilos) foi coletada e lavada duas vezes em meio RPMI 1640.

3.15. Ensaio de quimiotaxia de neutrófilos frente a estímulos quimiotáxicos

Os neutrófilos isolados da medula óssea do fêmur e tíbia de camundongos e do sangue periférico e líquido sinovial de pacientes com AR foram ressuspensos em 1mL de RPMI/BSA 0,01% (soro albumina bovina; Sigma). As células foram contadas no contador automático de células (COUNTER) e o número de células foi ajustado para 1×10^6 células/mL em RPMI/BSA 0,01%. Em seguida, no compartimento inferior da câmara de quimiotaxia (câmara de Boyden; 48 poços; Neuro Probe, Inc., Cabin John, MD–USA) foi colocado 28,4µL de estímulo quimiotáxico e como controle da migração utilizou o meio RPMI 1640. Sobre o compartimento inferior foi colocado uma membrana de policarbonato (5µm; Poretics Membranes; Osmonics, Laboratory & Specialty Products Group; Livermore, CA-USA). Sobre essa membrana foi colocada uma membrana de polietileno, onde a parte superior da câmara foi encaixada. No compartimento superior foi colocado 50µL da suspensão dos neutrófilos. Em seguida, a câmara foi incubada em uma estufa a 37°C com 5% CO₂ por 1 hora. Após este período, a membrana de policarbonato foi retirada, passada em solução fisiológica, corada com o kit de coloração Diff-Quik (Baxter Scientific Products; Baxter Health Corporation, McGaw Park, IL – USA) e fixada em lâmina. Os neutrófilos foram contados em microscópio óptico, cinco campos (1000X) em cada poço.

3.15.1. Efeito do EGS e da proteína LJM 111 sobre a quimiotaxia de neutrófilos obtidos da medula óssea de camundongos BALB/c frente a MIP-2

Os neutrófilos (1×10^6 células/mL) obtidos da medula óssea do fêmur e tíbia de animais BALB/c foram incubados com o meio, ou com o EGS (0,3; 1 ou 3 glândulas/ml) ou com a proteína LJM 111 (300; 900 ou 2700 ng/ml) por 30 minutos. Em seguida, foi realizado o ensaio de quimiotaxia de neutrófilos, como descrito acima, utilizando-se como estímulo quimiotáxico a quimiocina MIP-2/CXCL2 (30 ng/ml).

3.15.2. Efeito do EGS sobre a quimiotaxia de neutrófilos obtidos da medula óssea de camundongos C3H/HeJ, C3H/HePAS, C57BL/6 e TLR2^{-/-} estimulados com MIP-2/CXCL2

Os neutrófilos (1×10^6 células/mL) obtidos da medula óssea do fêmur e tibia de animais C3H/HeJ e C3H/HePAS foram incubados por 30 minutos com o EGS (3 glândulas/ml) ou não. Em seguida, foi realizado o ensaio de quimiotaxia de neutrófilos, como descrito acima, utilizando-se como estímulo quimiotáxico a quimiocina MIP-2/CXCL2 (30 ng/ml).

3.15.3. Efeito do EGS sobre a quimiotaxia de neutrófilos obtidos de sangue periférico de indivíduos saudáveis ou de sangue e líquido sinovial de pacientes AR frente a IL-8/CXCL8

Os neutrófilos (1×10^6 células/mL) obtidos do sangue periférico de indivíduos saudáveis ou de sangue ou fluido sinovial de pacientes com AR foram incubados por 30 minutos com o EGS (3 glândulas/ml). Em seguida, foi realizado o ensaio de quimiotaxia de neutrófilos, como descrito acima, utilizando-se como estímulo quimiotáxico a quimiocina IL-8/CXCL8 (20 ng/ml).

3.15.4. Efeito do EGS sobre a quimiotaxia de neutrófilos obtidos de sangue periférico de indivíduos saudáveis frente ao C5a, fMLP ou LTB₄

Os neutrófilos (1×10^6 células/mL) isolados do sangue periférico de indivíduos saudáveis foram incubados por 30 minutos com o EGS (3,0 glândulas/ml). Em seguida, foi realizado o ensaio de quimiotaxia de neutrófilos, como descrito acima, utilizando-se como estímulos quimiotáxicos: C5a (10^{-8} M), fMLP (10^{-8} M) ou LTB₄ (10^{-8} M).

3.16. Avaliação da expressão de CXCR2, C5aR, FPR1 e de LTB₄R1 em neutrófilos por citometria de fluxo

Os neutrófilos isolados da medula óssea do fêmur e tibia de camundongos ou do sangue periférico de indivíduos saudáveis foram resuspenso em 1mL de RPMI/BSA 0,01% (soro albumina bovina; Sigma). As células foram contadas no contador automático de células (COUNTER) e o número de células foi ajustado para (5×10^5 células / tubo) em RPMI/BSA 0,01%. Em seguida, foram colocados 30 μ L de soro de coelho por tubo (para evitar ligações inespecíficas) e a suspensão foi incubada por 30 minutos a 4°C. Após esse período foi

adicionado aos neutrófilos murinos, o anticorpo anti-CXCR2 (clone 242216; R & D system, Minneapolis, MN, USA) e aos neutrófilos humanos, anticorpo anti-CXCR2 (clone 48311; R & D system), anti-fPR1 (clone 350418; R & D system), anti-C5aR (clone C85-4124, BD Biosciences Pharmingen; São José, C.A., USA) ou anti-LTB4R1 (clone 203/14F11; R & D system) marcados com ficoeritrina (PE) e, posteriormente, os tubos foram incubados por 30 minutos a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas 2 vezes com PBS-BSA, por 10 minutos à 500 x g, e suspensas com 100µl de PBS-formol a 1%. A aquisição das células foi realizada em citômetro de fluxo (FACScan; Becton Dickinson, San Jose, USA), utilizando o canal de fluorescência 2 (FL2) para PE. As análises foram feitas usando programas “Cell Quest” (CELLQuest software; BD Biosciences) e “WinMDI” (WinMIDv2.8; The Scripps Research Institute, USA) os quais permitem analisar todas as células adquiridas (20000/amostra) ou apenas determinadas populações, individualizadas por janelas (“Gates”) estabelecidas com base em parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC) ou fluorescência (FL).

3.16.1. Efeito do EGS sobre a expressão de CXCR2 em neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos BALB/c

Os neutrófilos (5×10^5 células/tubo) isolados da medula óssea de camundongos BALB/c foram incubados por 30 minutos com o EGS (3,0 glândulas/ml). Em seguida, foi realizada a avaliação da expressão do receptor CXCR2, como descrito acima.

3.16.2. Efeito do EGS sobre a expressão de CXCR2 em neutrófilos isolados de sangue periférico de pacientes com AR

Os neutrófilos (5×10^5 células / tubo) isolados de sangue periférico de pacientes com AR foram incubados por 30 minutos com o EGS (3,0 glândulas/ml). Em seguida, foi realizada a avaliação da expressão do receptor CXCR2 como descrito acima.

3.16.3. Efeito do EGS sobre a expressão de C5aR, FPR1 ou de LTB4R1 em neutrófilos isolados de sangue periférico de indivíduos saudáveis

Os neutrófilos (5×10^5 células / tubo) isolados de sangue periférico de pacientes com AR foram incubados por 30 minutos com o EGS (3,0 glândulas/ml). Em seguida, foi realizada a avaliação da expressão do receptor C5aR, FPR1 ou de LTB4R1 como descrito acima.

3.17. Imunofluorescência para avaliação do conteúdo de F-actina em neutrófilos frente a estímulo quimiotático

O conteúdo de F-actina foi determinado em neutrófilos por microscopia de fluorescência. Brevemente, os neutrófilos foram sedimentados em lâminas com o auxílio de citocentrífuga (Cytospin 3-Shandon) e fixados com paraformaldeído a 4% por 20 minutos. As células fixadas foram lavadas e permeabilizadas com Triton-X a 1% por 5 minutos. O conteúdo de F-actina foi corado com faloidina marcada com rodamina (diluição de 1:3000) por 2 horas. A análise microscópica das imagens fluorescentes foi realizada com o auxílio de microscópio de fluorescência (Olympus BX40-F4; Tokyo, Japan) equipados com apropriados filtros para rodamina. A captura de imagens foi realizada com o auxílio de uma câmera acoplada a um programa de aquisição de imagens CoolSNAP (Photometrics, Tucson, AR). Todas as imagens foram capturadas com o mesmo tempo de exposição, contraste, brilho e analisadas pelo programa Image-Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics). Células de 5 campos aleatórios foram analisadas. Os resultados estão apresentados como média \pm EPM da intensidade de fluorescência de F-actina.

3.17.1. Efeito do EGS e da proteína LJM 111 sobre o conteúdo de F-actina em neutrófilos obtidos da medula óssea de camundongos BALB/c frente a MIP-2/CXCL2 Os neutrófilos (1×10^6 células/ml) obtidos da medula óssea do fêmur e tibia de animais BALB/c foram incubados por 30 minutos com o meio, ou com o EGS (3 glândulas/ml) ou com a proteína LJM 111 (2700 ng/ml) por 30 minutos. Em seguida, foi realizado o experimento de imunofluorescência para avaliação do conteúdo de F-actina em neutrófilos, como descrito acima, utilizando-se como estímulo quimiotático a quimiocina MIP-2/CXCL2 (30 ng/ml).

3.17.2. Efeito do EGS sobre o conteúdo de F-actina em neutrófilos obtidos de sangue periférico de pacientes com AR frente a IL-8

Os neutrófilos (1×10^6 células/mL) obtidos do sangue periférico de pacientes com AR foram incubados por 30 minutos com o EGS (3 glândulas/ml). Em seguida, foi realizado o experimento de imunofluorescência para avaliação do conteúdo de F-actina em neutrófilos, como descrito acima, utilizando-se como estímulo quimiotático a IL-8/CXCL8 (20 ng/ml).

3.18. Avaliação da dinâmica de cálcio intracelular por microscopia confocal em neutrófilos obtidos do sangue periférico de indivíduos saudáveis e pré-tratados ou não com o EGS frente a IL-8/CXCL8

Os neutrófilos (1×10^6 células/mL) isolados do sangue periférico de indivíduos saudáveis foram incubados com 5 μ M do indicador de cálcio intracelular Fluo-3 AM (Molecular Probes) por 1 hora no escuro em temperatura ambiente. Em seguida, os neutrófilos foram lavados 3 vezes e incubados em placas de cultura contendo uma lamínula de vidro aderida ao fundo com o EGS (1 ou 3 gl/ml) por 30 minutos. A fluorescência emitida pelas células foi avaliada através de imagens obtidas por microscopia confocal (Leica, SP5). O estímulo IL-8/CXCL8 (10 ng/ml) foi administrado no tampão durante a aquisição das imagens. Os dados foram mostrados como variação de intensidade de fluorescência dividida pela fluorescência basal ($\Delta F/F_0$).

3.19. Imunofluorescência para avaliação da expressão de GRK-2 em neutrófilos

Para análise da expressão de GRK-2, os neutrófilos foram sedimentados em lâminas com o auxílio de citocentrífuga (Cytospin 3-Shandon) e fixados com paraformaldeído a 4% por 20 minutos. As células fixadas foram lavadas e permeabilizadas com Triton-X a 1% por 5 minutos. Em seguida, os neutrófilos foram incubados com anticorpo anti-GRK-2 feito em coelho ou isotipo controle (Santa Cruz Biotecnologia) durante 12 horas. Após este período, foi adicionado o

anticorpo Alexa-Fluor 594 anti-coelho feito em cabra (Invitrogen). Análise microscópica de imagens fluorescentes foi analisada como descrito acima para a análise do conteúdo de F-actina.

3.19.1. Efeito do EGS sobre a expressão de GRK-2 em neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos BALB/c

Os neutrófilos (1×10^6 células/ml) obtidos da medula óssea do fêmur e tíbia de animais BALB/c foram incubados por 30 minutos com o meio ou com o EGS (3 glândulas/ml) por 30 minutos. Em seguida, foi realizado o experimento de imunofluorescência para avaliação de GRK-2 em neutrófilos, como descrito acima.

3.19.2. Efeito do EGS sobre a expressão de GRK-2 em neutrófilos isolados de sangue periférico de pacientes com AR

Os neutrófilos (1×10^6 células/mL) obtidos do sangue periférico de pacientes com AR foram incubados ou não com o EGS (3 glândulas/ml) por 30 minutos. Em seguida, foi realizado o experimento de imunofluorescência para avaliação de GRK-2 em neutrófilos, como descrito acima.

3.20. Análise estatística

Nos casos de diferentes tratamentos, o teste de análise de variância (ANOVA) foi utilizado para comparar as alterações entre eles. Em todos os casos, as comparações foram testadas com teste de Bonferroni (comparações múltiplas) ou teste t de Student (comparações entre duas amostras) para amostras não pareadas. O número (n) de animais por grupo experimental está descrito nas legendas das figuras. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e as diferenças foram consideradas estatisticamente diferentes para $p < 0,05$.

RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Efeito do extrato de glândula salivar (EGS) de *Lutzomyia longipalpis* sobre parâmetros inflamatórios em modelo experimental de artrite e o mecanismo envolvido

Primeiramente, confirmamos, como descrito por Monteiro et al (Monteiro, Nogueira *et al.*, 2005), o efeito inibitório do EGS (1 glândula/animal; i.v.) sobre o recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal em animais imunizados e desafiados com injeção intraperitoneal com OVA (10 µg/cavidade) quando comparado com os animais imunizados pré-tratados com salina e desafiados com OVA (**Figura 1A**). Nosso próximo passo foi investigar o efeito do EGS em outro modelo de inflamação imune, utilizando como antígeno, a mBSA, a fim de avaliarmos se o EGS é capaz de modular a resposta imune induzida por diferentes agentes inflamatórios. Do mesmo modo, observamos que o EGS também reduziu significativamente a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal em camundongos previamente imunizados e desafiados com mBSA (30 µg/cavidade; i.p.) em comparação com animais imunizados pré-tratados com salina e desafiados com mBSA (**Figura 1B**).

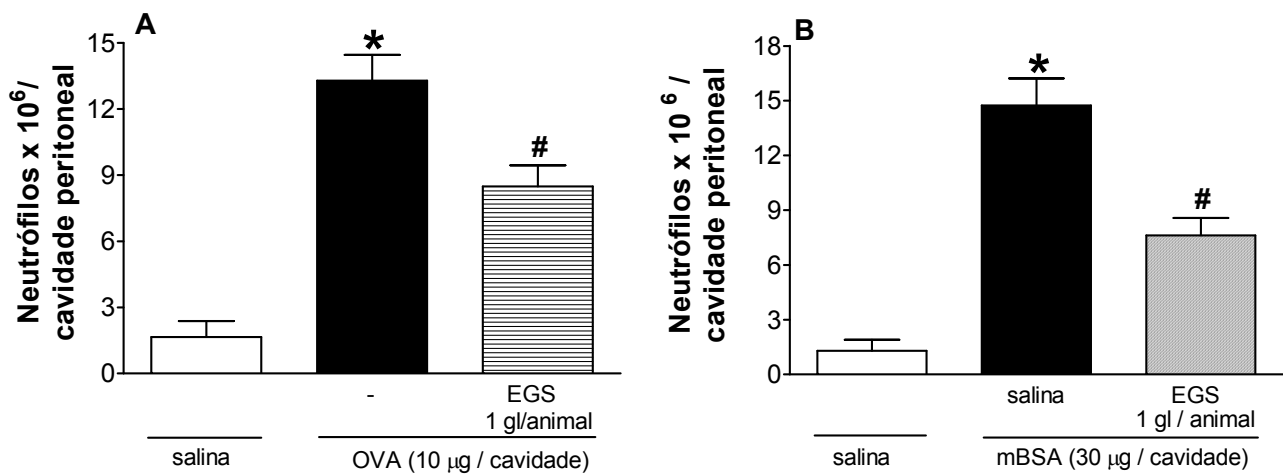


Figura 1. Extrato de glândulas salivares (EGS) de *Lutzomyia longipalpis* reduz a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal em animais imunizados e desafiados com OVA e mBSA, respectivamente. Os animais imunizados foram pré-tratados com o EGS (1 glândula/animal, via intravenosa) e 48 hs após foram desafiados intra-peritonealmente com OVA (A, 10 µg/cavidade) ou mBSA (B, 30 µg/cavidade). A contagem da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal foi realizada 6 h após o desafio com o antígeno. Os resultados estão expressos como média ± EPM do número de neutrófilos por cavidade e são representativos de três diferentes experimentos (n=5 por grupo). * $p < 0.05$ quando comparado ao grupo desafiado com salina; # $p < 0.05$ quando comparado ao grupo pré-tratado com salina e desafiado com o antígeno (ANOVA seguido do teste de Bonferroni).

Além disso, avaliamos o efeito anti-inflamatório do EGS em modelos experimentais de artrite, visto que a investigação do efeito de um composto em modelos experimentais que mimetizam, embora parcialmente, uma patologia é de fundamental importância para o desenvolvimento futuro de novos medicamentos. Como demonstrado na **Figura 2A**, o tratamento com o EGS administrado uma vez ao dia, na dose de 1 glândula/animal, foi capaz de reduzir os escores clínicos, como eritema ou edema em camundongos com artrite induzida por colágeno do tipo II quando comparado com os animais artríticos tratados com salina diariamente (controle positivo). Ainda, estendendo nossa hipótese, testamos o efeito do EGS no modelo de artrite induzida por antígeno (AIA) e observamos que este também inibiu o recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular em animais imunizados e desafiados com mBSA na articulação fêmur-tibial (**Figura 2B**).

Visto que na artrite, a dor é um dos principais sintomas presentes e que pode levar a incapacitação da realização de atividades diárias (Wong, 1993; Schaible, Ebersberger *et al.*, 2002), nosso próximo passo foi investigar se o EGS poderia modular negativamente a hipernocicepção mecânica em animais imunizados e desafiados com mBSA. Nossos resultados demonstraram que o pré-tratamento com o EGS (1 glândula/animal) reduziu a hipernocicepção nos animais imunizados e desafiados com mBSA quando comparados com os animais imunizados pré-tratados com salina e desafiados com mBSA (**Figura 2C**). Uma vez que a artrite reumatóide apresenta uma patogênese complexa, com vários fatores envolvidos, entre eles, o processo de lesão articular (Sohen, 2003; Koenders, Lubberts *et al.*, 2005), nosso próximo objetivo foi investigar o efeito do EGS sobre a lesão articular no modelo de AIA. Resumidamente, para a avaliação da lesão articular, coletamos as patelas dos animais que foram desafiados com mBSA ou com salina e medimos, por método colorimétrico, a quantidade de glicosaminoglicanos (GAGs) presente. Como podemos observar na **Figura 2D**, o pré-tratamento com o EGS (1 glândula/animal) foi capaz de evitar a perda de GAGs nos animais imunizados e desafiados com mBSA quando comparado com os animais imunizados pré-tratados com salina e desafiados com mBSA. Este dado é muito importante, uma vez que o EGS além de inibir o recrutamento de neutrófilos, está tendo um efeito benéfico no processo de lesão articular.

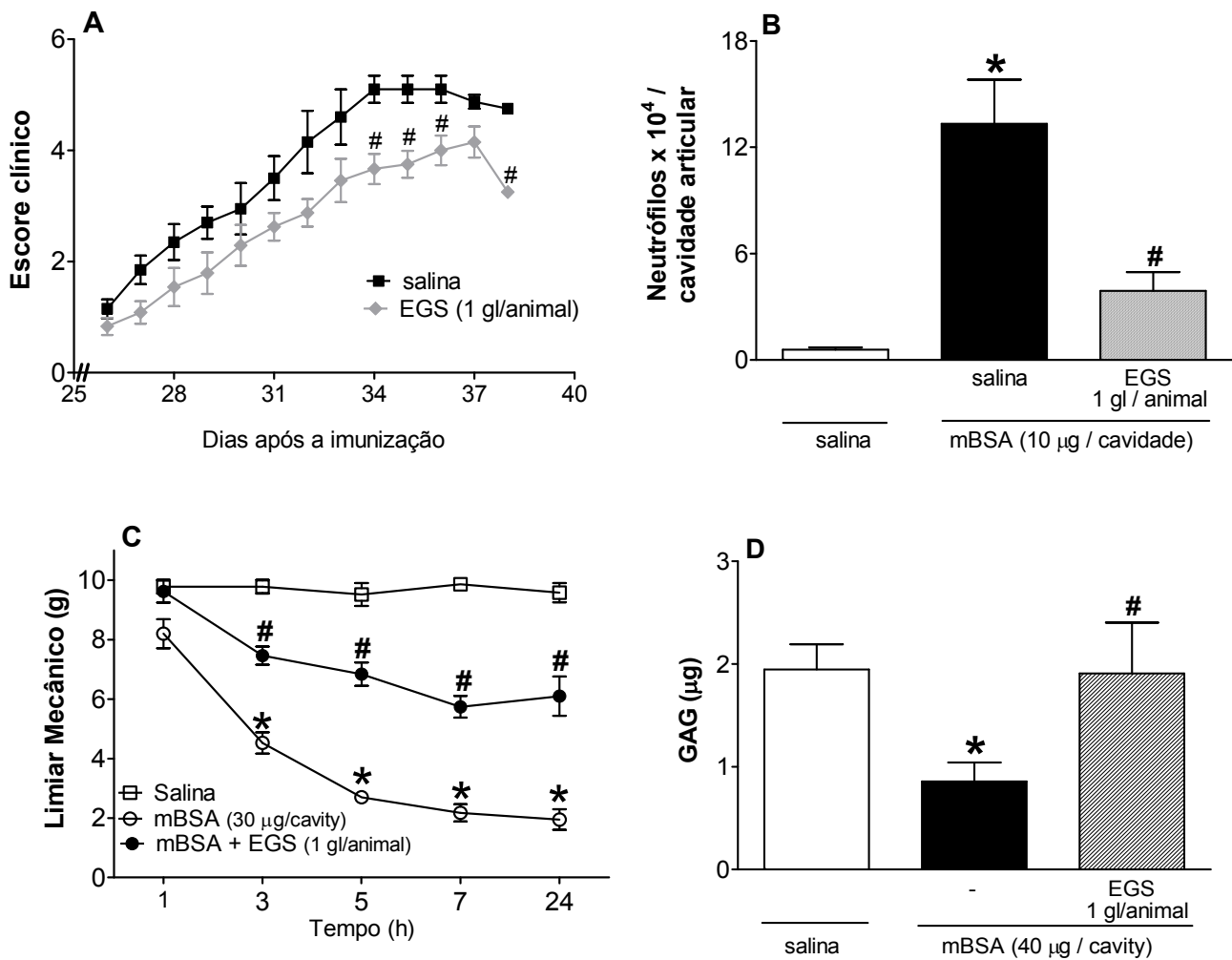


Figura 2: Efeito do extrato de glândulas salivares (EGS) sobre vários parâmetros inflamatórios em modelo de artrite induzida por colágeno e em modelo de AIA. (A) Camundongos DBA/1J imunizados com colágeno do tipo II foram tratados, ou não, com o EGS (1 gl/animal, uma vez ao dia) após o aparecimento dos primeiros sinais de inflamação, apresentados no gráfico como escore clínico. **(B-C)** Animais BALB/c imunizados foram pré-tratados com o EGS (1 gl/animal) e desafiados intra-articularmente com 10 µg/cavidade de mBSA para avaliação da migração de neutrófilos **(B)** ou com 30 µg/cavidade articular de mBSA para mensuração de hipernocicepção mecânica **(C)**. A hipernocicepção mecânica foi mensurada com auxílio do aparelho VonFrey. **(D)** Camundongos BALB/c imunizados foram tratados, ou não, com o EGS (1 gl/animal, uma vez ao dia) durante 6 dias, sendo no primeiro e no terceiro dia desafiados intra-articularmente com mBSA (40 µg/cavidade articular). As patelas foram coletadas e medida a quantidade de glicosaminoglicanos (GAG) como descrito na metodologia. Em todos os experimentos, um grupo de animais foi desafiado com salina, como controle negativo. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo desafiado com salina. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo desafiado com mBSA (ANOVA seguido do teste de Bonferroni).

Uma vez que dados da literatura demonstram que citocinas pró-inflamatórias estão claramente envolvidas no recrutamento de neutrófilos e na hipernocicepção mecânica (Yu, Ruddy *et al.*, 2007; Cunha, Verri *et al.*, 2008), nós investigamos se o pré-tratamento com o EGS *in vitro* poderia modular negativamente a liberação de mediadores inflamatórios em células obtidas de linfonodos de animais imunizados com mBSA. Como apresentado na **Figura 3**, o pré-tratamento com o EGS foi capaz de inibir os níveis de IL-17 (**Figura 3A**), IFN- γ (**Figura 3B**) e TNF- α (**Figura 3C**) quando comparados com a liberação de mediadores inflamatórios em células pré-tratadas com meio e estimuladas com mBSA.

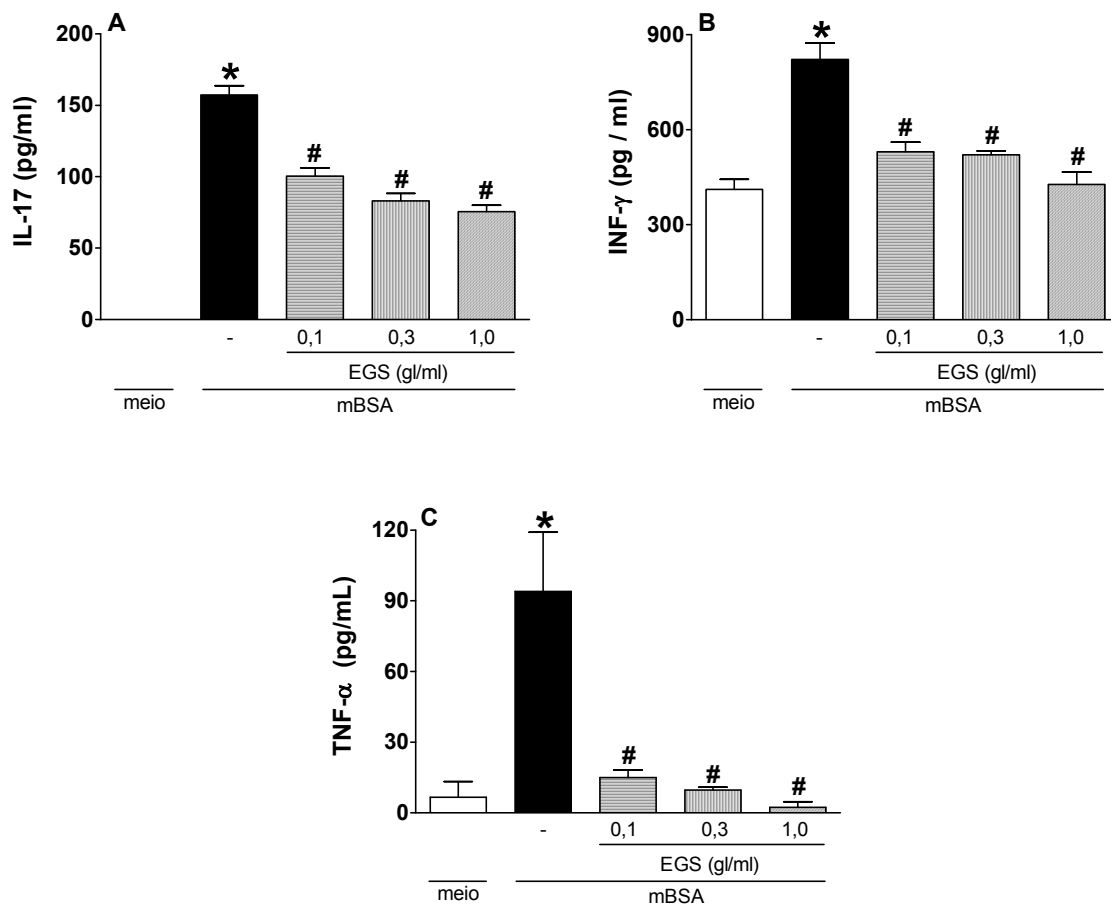


Figura 3: Extrato de glândulas salivares (EGS) reduz os níveis de sobrenadante de IL-17, IFN- γ e TNF- α em células estimuladas com mBSA. Células obtidas de linfonodos de animais imunizados foram incubadas na presença ou não de EGS (0,1; 0,3 ou 1 g/ml) por 2 horas e então estimuladas com mBSA (10 μ g/ml). O sobrenadante foi coletado 36 horas após para mensuração de IL-17 (**A**), IFN- γ (**B**) e TNF- α (**C**). Os resultados estão expressos como média \pm EPM e são representativos de três diferentes experimentos. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo incubado com meio. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo incubado com mBSA (ANOVA seguido do teste de Bonferroni).

O desenvolvimento de um processo inflamatório é resultado da capacidade de células apresentadoras de antígenos (APCs) ativarem linfócitos TCD4⁺ específicos, resultando na liberação de mediadores pró-inflamatórios envolvidos no recrutamento neutrofílico. Visto que o EGS interferiu tanto na liberação dos mediadores inflamatórios (Figura 3) bem como na migração do polimorfonucleares em diferentes modelos experimentais (Figuras 1 e 2), nós questionamos se o EGS poderia interferir no processo de apresentação de antígenos, limitando a ativação de linfócitos TCD4⁺ e, conseqüentemente, a liberação dos mediadores pró-inflamatórios envolvidos na patogênese da artrite. Deste modo, investigamos se o EGS poderia estar modulando a expressão de moléculas presentes em células dendríticas (DCs) quando estimuladas com LPS. Observamos que o EGS inibiu a expressão de MHC-II e de CD86 e quando comparado com células incubadas com meio e estimuladas com LPS (**Figura 4A**). O EGS também reduziu os níveis de TNF- α e aumentou os níveis de IL-10 no sobrenadante de DCs estimuladas com LPS (**Figura 4B**). Em conjunto, nossos resultados sugerem que o mecanismo usado pelo EGS para inibir a resposta inflamatória induzida por mBSA pode ser por modular a função e maturação de DCs. Ainda, dado que as APCs, como as DCs, apresentam os sinais necessários para a ativação e proliferação de células T CD4⁺ (Santiago-Schwarz, Anand *et al.*, 2001), investigamos se o EGS seria capaz de inibir a proliferação de linfócitos T, uma vez que o EGS foi capaz de modular negativamente a função das DCs. Para isto, realizamos o ensaio com APCs coletadas do líquido sinovial de pacientes com AR e estimuladas com colágeno do tipo II, provável antígeno da AR e que induz proliferação celular (Kim, Kim *et al.*, 1999) e incubadas juntamente com linfócitos obtidos do líquido sinovial do mesmo paciente. Observamos que o grupo de células pré-tratadas com o EGS, em todas as concentrações testadas, apresentou uma menor proliferação celular do que o grupo de células não tratadas e estimuladas com colágeno (**Figura 5**). Além do EGS não inibir a proliferação celular frente a um estímulo inespecífico, como a fitohemaglutinina (PHA, **Figura 6**).

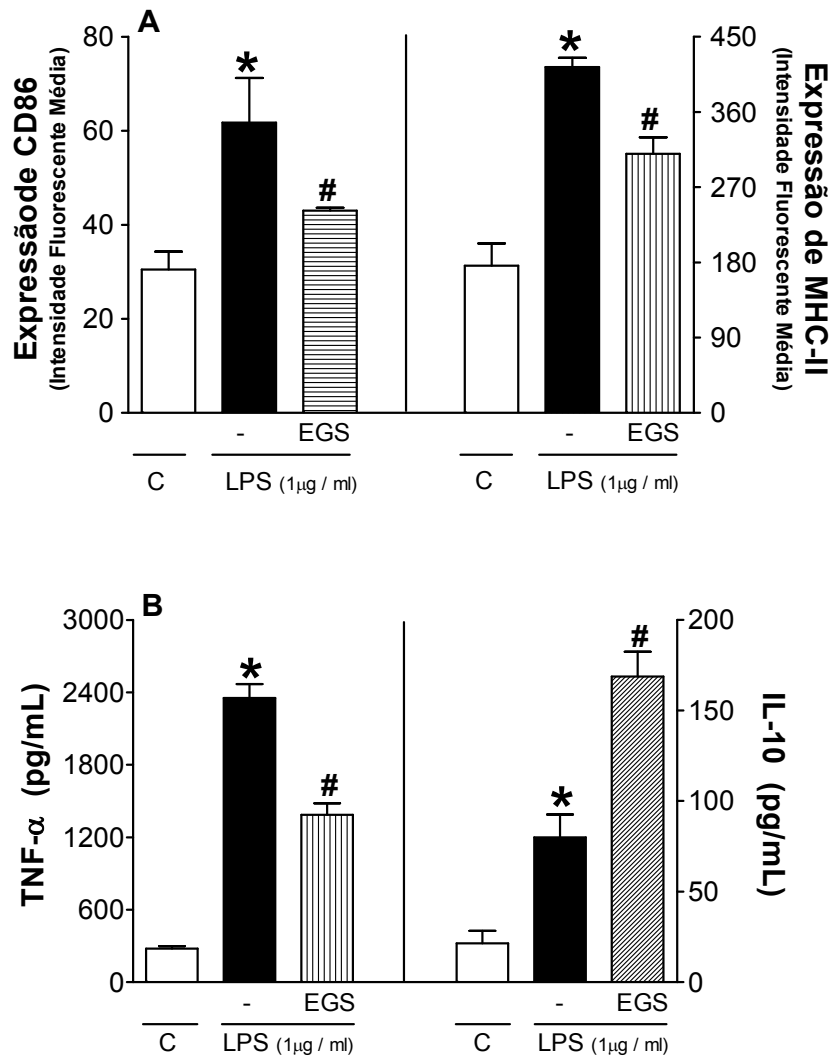


Figura 4: Efeito do extrato de glândulas salivares (EGS) sobre a expressão de CD86, MHC-II e produção de TNF- α e IL-10 em células dendríticas estimuladas com LPS. Células dendríticas foram pré-tratadas, ou não, com EGS (3 μ l/ml) por 12 horas e estimuladas com LPS. As células foram coletadas 24 horas após para mensuração da intensidade de fluorescência das moléculas em aparelho de citometria de fluxo **(A)** e dosagem de TNF- α e IL-10 no sobrenadante da cultura **(B)**. Como controle negativo, as células dendríticas foram incubadas com meio. Todos os experimentos foram repetidos duas vezes. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo incubado com meio. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo incubado com LPS (ANOVA seguido do teste de Bonferroni).

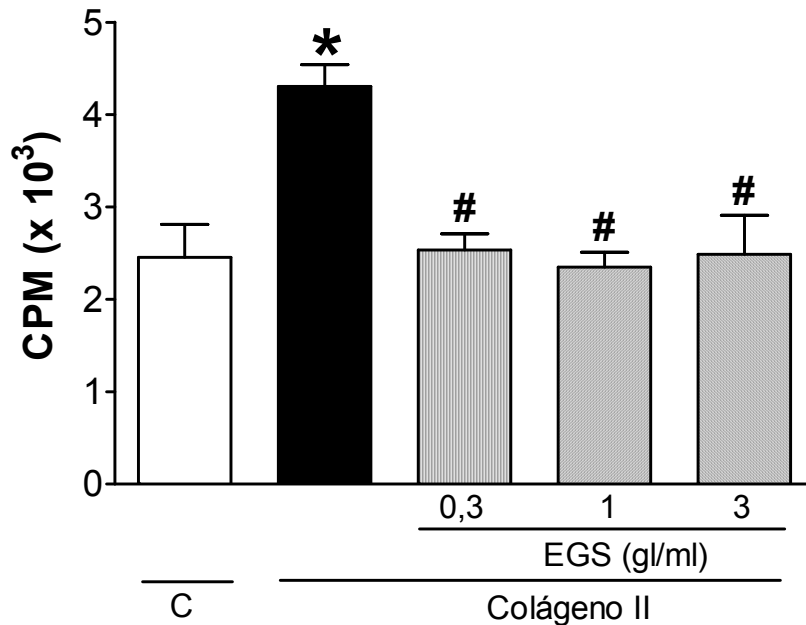


Figura 5: Extrato de glândulas salivares (EGS) de *Lutzomyia longipalpis* inibe a proliferação induzida por colágeno II de células mononucleares obtidas do fluido sinovial de paciente com artrite reumatóide (AR). Células apresentadoras de antígenos (APCs) obtidas do líquido sinovial de pacientes com AR foram colocadas para aderir por 1 hora em placas de 96 poços e incubadas em triplicata na presença do EGS (0,3; 1,0 ou 3,0 glândulas/ml) por 2 horas e então estimuladas com colágeno II (120 μ g/ml) por mais 2 horas. Células mononucleares foram adicionados na proporção de 5:1 em relação às APCs em cultura por 72 horas e em seguida foi adicionada timidina triciada por 18h. A proliferação celular foi avaliada após esse tempo. Como controle negativo, as células foram colocadas na presença de meio. Os resultados estão expressos como contagem por minuto (CPM) (n=2). *p< 0,05 quando comparado ao grupo incubado com meio; *p< 0,05 quando comparado ao grupo incubado com colágeno II (ANOVA seguido do teste de Bonferroni).

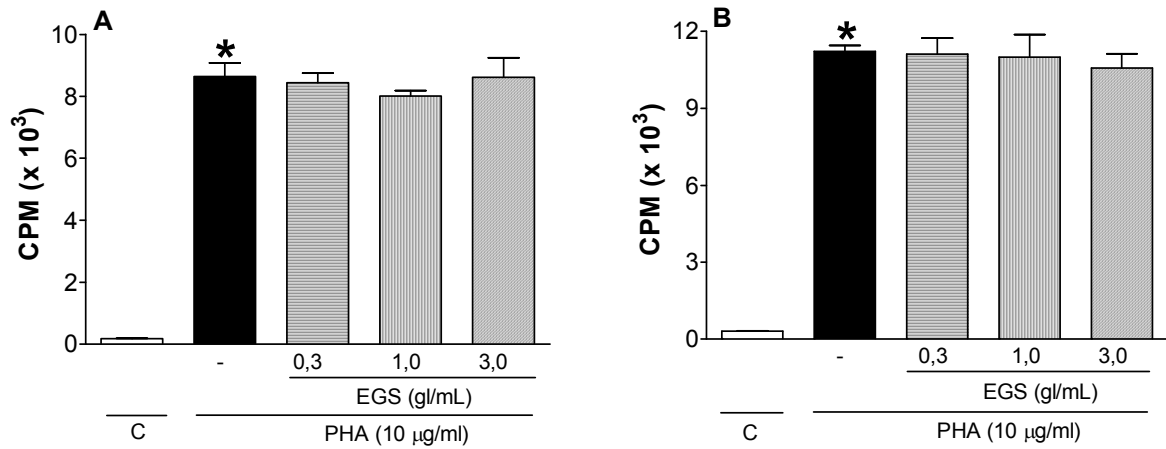


Figura 6: Extrato de glândulas salivares (EGS) de *Lutzomyia longipalpis* não reduz a proliferação de células mononucleares obtidas de sangue periférico de indivíduos saudáveis e de pacientes com artrite reumatóide (AR) induzida por fitohemaglutinina (PHA). Células mononucleares obtidas do sangue periférico de indivíduos saudáveis (A) e de pacientes com AR (B) foram incubadas em triplicata na presença de EGS (0,3; 1,0 ou 3,0 glândulas/ml) por 2 horas e então estimuladas com PHA (10µg/ml) por 72 horas e em seguida foi adicionada timidina triçada por 18h. A proliferação celular foi avaliada após esse tempo. Como controle negativo, as células foram colocadas na presença de meio. Os resultados estão expressos como contagem por minuto (CPM) e são representativos de dois diferentes experimentos (n=2 por grupo). *p< 0,05 quando comparado ao grupo incubado com meio (ANOVA seguido do teste de Bonferroni).

4.2. Efeito do EGS sobre a quimiotaxia *in vitro* de neutrófilos e avaliação dos mecanismos envolvidos

Como mostrado anteriormente, o EGS inibiu a migração de neutrófilos em modelo experimental de artrite. Todavia, não é conhecido o efeito deste diretamente sobre os neutrófilos. Este fato nos levou a pesquisar o efeito do EGS *in vitro* sobre a quimiotaxia de neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos BALB/c. Como podemos observar na **Figura 7A**, o EGS (0,3; 1 ou 3 gl/ml) reduziu a quimiotaxia de neutrófilos frente à quimiocina MIP-2/CXCL2. Desde que se sabe que o complexo sistema de quimiotaxia de neutrófilos frente a um estímulo quimiotáxico envolve mecanismos integrados, avaliamos se o EGS seria capaz de inibir a polimerização de actina em neutrófilos obtidos da medula óssea de camundongos BALB/c e estimulados com MIP-2/CXCL2. De acordo com a **Figura 7B**, o pré-tratamento com o EGS (3 gl/ml) reduziu a intensidade de fluorescência de F-actina nos neutrófilos estimulados com MIP-2/CXCL2, quando comparado com a intensidade de fluorescência de F-actina de neutrófilos pré-tratados com meio e estimulados com a mesma quimiocina.

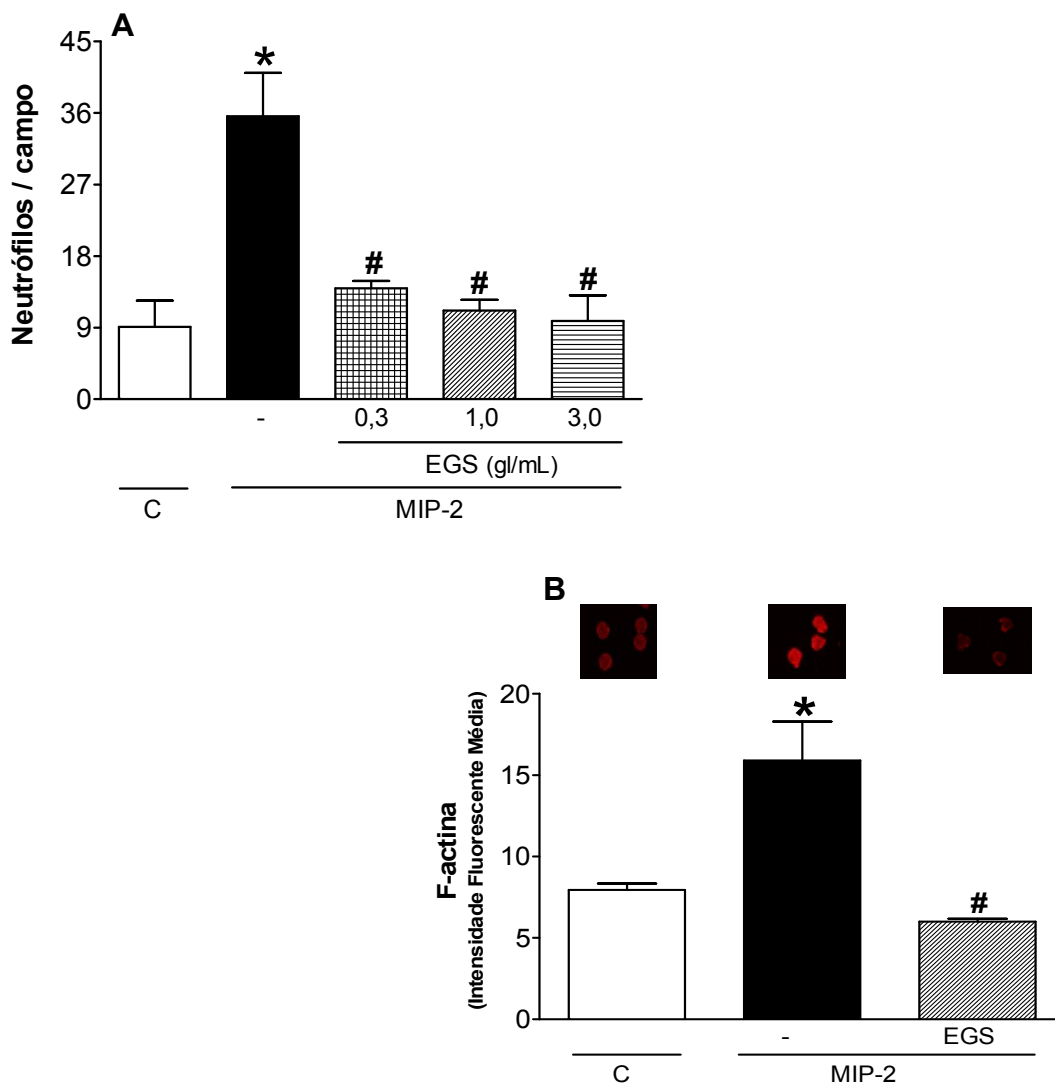


Figura 7: Extrato de glândulas salivares (EGS) de *Lutzomyia longipalpis* inibe a quimiotaxia e polimerização de actina em neutrófilos obtidos da medula óssea de camundongos BALB/c. (A) Os neutrófilos foram pré-tratados com o EGS (0,3; 1,0 ou 3,0 glândulas/ml) por 30 minutos e colocados para migrar por 1 hora em câmara de boyden frente a MIP-2/CXCL2 (20 ng/ml). Os resultados estão expressos como média \pm EPM do número de neutrófilos emigrados frente ao estímulo. **(B)** Filamentos de F-actina foram corados com faloidina-rodamina e observados por microscopia óptica (x400) em neutrófilos pré-tratados ou não com EGS (3 glândulas/ml) por 30 minutos e a intensidade de fluorescência de F-actina quantificada utilizando o programa Image J. Os resultados estão expressos como média \pm EPM da intensidade de fluorescência de F-actina. Todos os experimentos foram repetidos três vezes. Como controle negativo, os neutrófilos foram incubados com meio. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo incubado com meio; # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo estimulado com MIP-2/CXCL2 (ANOVA seguido do teste de Bonferroni).

Nosso próximo passo foi investigar se o EGS poderia estar reduzindo a quimiotaxia, através da internalização do receptor CXCR2 em neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos. Observamos que neutrófilos pré-tratados com o EGS (3 glândulas/ml, por 30 minutos) apresentaram uma menor expressão do receptor CXCR2 do que neutrófilos pré-tratados somente com meio de cultura (**Figura 8A**). Ademais, investigamos o efeito do EGS sobre a expressão de quinase de receptor acoplado a proteína G-2 (GRK-2), a qual fosforila o receptor acoplado a proteína G (GPCR) levando a internalização do receptor (Ferguson, 2001; Gainetdinov *et al.*, 1999). Condizente com os dados da internalização do receptor CXCR2 induzida pelo EGS, nós observamos que o EGS foi capaz de aumentar a expressão de GRK-2 (**Figura 8B**) em neutrófilos obtidos da medula óssea de camundongos BALB/c.

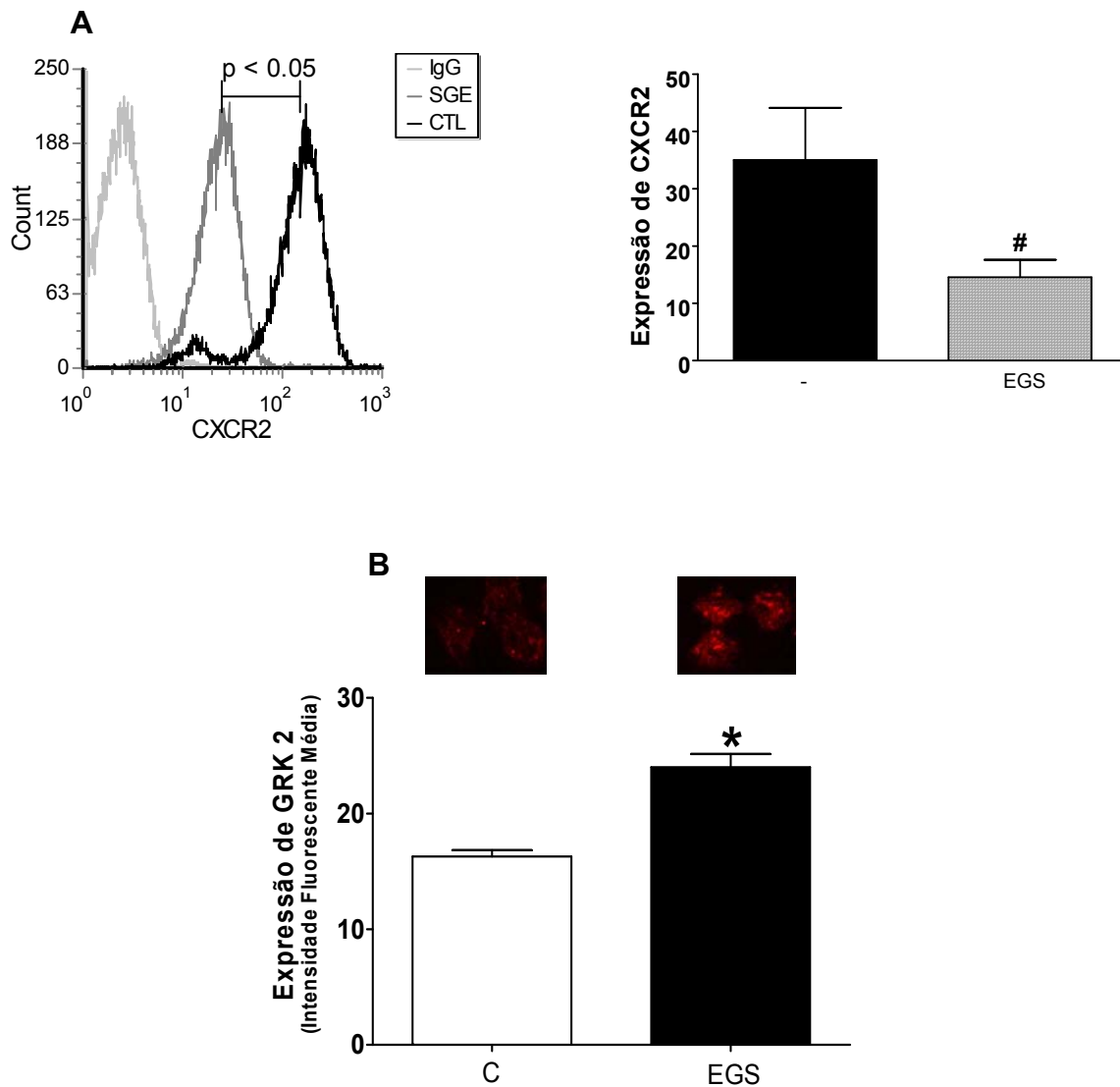


Figura 8: Extrato de glândulas salivares (EGS) de *Lutzomyia longipalpis* induz internalização de CXCR2 e aumento na expressão de quinase 2 do receptor acoplado a proteína G (GRK-2) em neutrófilos obtidos da medula óssea de camundongos BALB/c. **(A)** Neutrófilos foram pré-tratados, ou não, com o EGS (3,0 glândulas/ml) por 30 minutos e, em seguida a expressão de CXCR2 marcado com ficoeritrina (PE) foi analisada no aparelho de citometria de fluxo. Os resultados estão expressos como intensidade de fluorescência média e são representativos de três diferentes experimentos. **(B)** Neutrófilos foram pré-tratados, ou não, com o EGS (3,0 glândulas/ml) por 30 minutos e a expressão de GRK-2 foi avaliada por imunocitoquímica pela marcação com GRK-2 – PE, observados por microscopia óptica (x400) e a intensidade de fluorescência de F-actina quantificada utilizando o programa Image J. # $p < 0.05$ quando comparado ao grupo sem tratamento (teste T de students).

Vários estudos têm investigado o papel de agonistas dos receptores TLR2 e TLR4 na inibição da quimiotaxia de neutrófilos, demonstrando, principalmente, que estes agonistas são capazes de internalizar o receptor CXCR2 (Lloyd, Biragyn *et al.*, 1995; Khandaker, Xu *et al.*, 1998; Khandaker, Mitchell *et al.*, 1999; Alves-Filho, Freitas *et al.*, 2009). Estes dados da literatura nos levaram a avaliar se o EGS poderia estar atuando como agonista dos receptores TLR2 ou TLR4, desse modo induzindo a internalização do receptor CXCR2. Para isso, utilizamos neutrófilos de animais deficientes para o receptor TLR2 e de animais não responsivos para o receptor TLR4. Nosso resultado demonstrou que os neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos selvagens (WT e C3H/HePAS), de animais não responsivos para ligantes do receptor TLR4 (C3H/HeJ, **Figura 9A**) ou de animais deficientes para TLR2^{-/-} (**Figura 9B**) pré-tratados com o EGS (3,0 glândulas/ml) apresentaram uma menor migração frente a MIP-2/CXCL2 em comparação com neutrófilos pré-tratados somente com meio de cultura. Assim, demonstrando que o EGS não atua via TLR2 e 4. Além disso, este experimento com neutrófilos obtidos de animais C3H/HeJ, que não são responsivos para ligantes do receptor TLR4, nos permitiu avaliar se o efeito causado pelo EGS poderia ser uma contaminação com LPS. Contudo, como mostrado na **Figura 9A**, o EGS continuou inibindo a quimiotaxia de neutrófilos isolados da medula óssea de animais C3H/HeJ quando comparado ao efeito do EGS na quimiotaxia de neutrófilos obtidos da medula óssea de animais C3H/HePAS (controle), assim, eliminando a possibilidade de contaminação de LPS como uma causa para os efeitos observados.

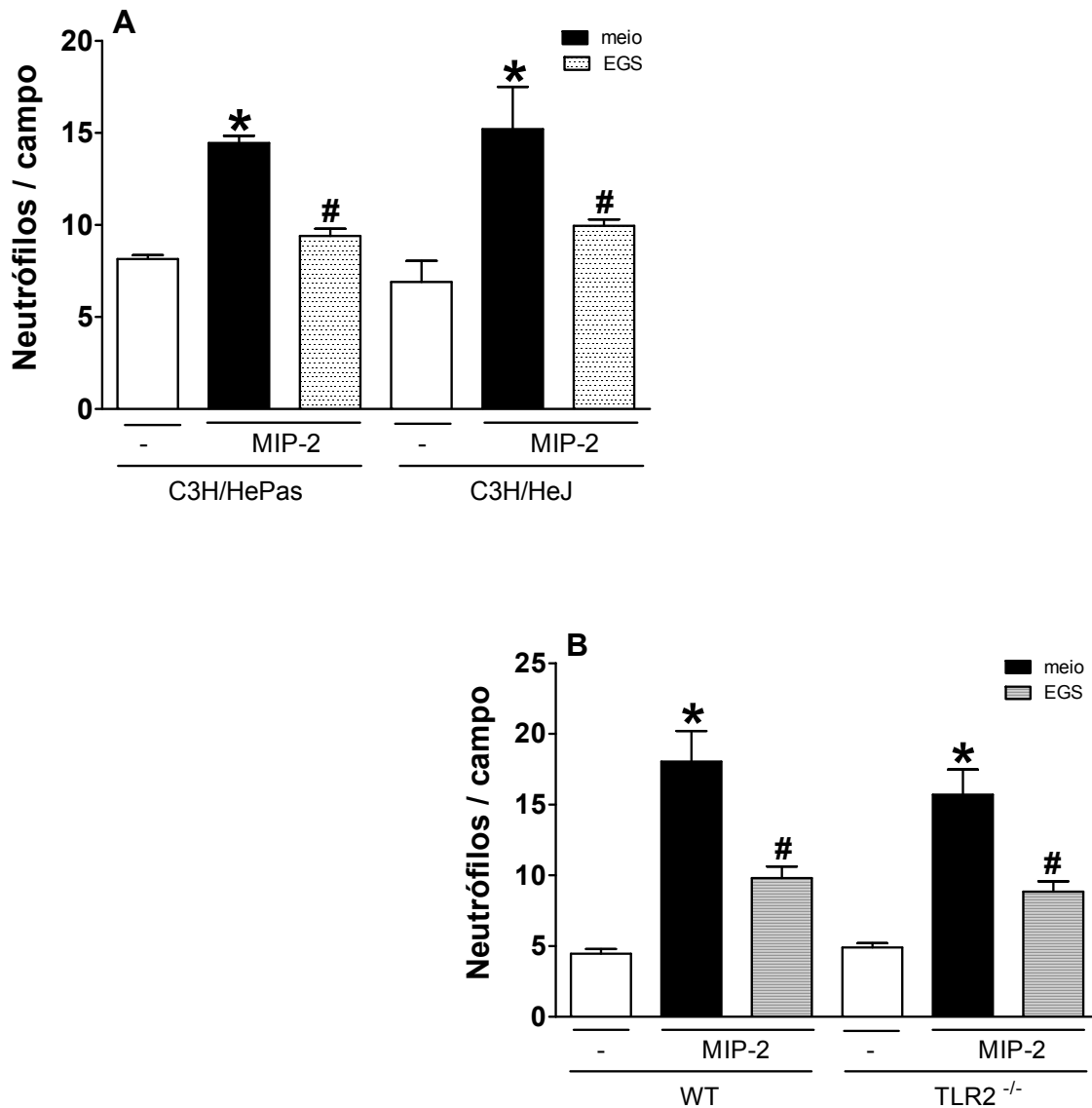


Figura 9: Extrato de glândulas salivares (EGS) de *Lutzomyia longipalpis* inibe a quimiotaxia de neutrófilos obtidos da medula óssea de camundongos selvagens, não responsivos para LPS (C3H/HeJ) e deficientes para o receptor TLR2 (TLR2^{-/-}). Neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos selvagens (WT e C3H/HePAS), não responsivos para LPS (C3H/HeJ, **A**) e deficientes para o receptor TLR2 (TLR2^{-/-}, **B**) foram pré-tratados, ou não, com o EGS (3,0 glândulas/ml) por 30 minutos e colocados para migrar por 1 hora em câmara de boyden frente à MIP-2/CXCL2 (20 ng/ml). Como controle negativo, os neutrófilos foram incubados com meio. Os resultados estão expressos como média ± EPM do número de neutrófilos emigrados frente ao estímulo. *p < 0,05 quando comparado ao grupo incubado com meio (ANOVA seguido do teste de Bonferroni). #p < 0,05 quando comparado ao grupo estimulado com a quimiocina (ANOVA seguido do teste de Bonferroni).

Posteriormente, avaliamos se o EGS também seria capaz de modular negativamente a quimiotaxia de neutrófilos obtidos de células isoladas de pacientes com AR. Como apresentado na **Figura 10**, o EGS inibiu a migração *in vitro* de neutrófilos obtidos de sangue periférico de indivíduos saudáveis (**Figura 10A**), como também inibiu a migração de células provenientes do sangue (**Figura 10B**) e líquido sinovial (**Figura 10C**) de pacientes com AR quando estimulados com IL-8/CXCL8. Além disso, o EGS inibiu a polimerização dos filamentos de F-actina nos neutrófilos isolados do sangue periférico de pacientes com AR e estimulados com IL-8/CXCL8 (**Figura 11A**), quando comparados a neutrófilos pré-tratados com meio de cultura e estimulados com a IL-8/CXCL8. Ademais, neutrófilos incubados com o EGS (3 glândulas/ml) apresentaram redução da expressão do receptor CXCR2 (**Figura 11B**) e aumento da expressão de GRK-2 (**Figura 11C**) quando comparado a neutrófilos pré-tratados somente com meio de cultura. Em conjunto, nossos resultados demonstraram que o EGS foi capaz de inibir a quimiotaxia de neutrófilos circulantes isolados do sangue humano e sugerindo que este fenômeno esteja relacionado com o aumento da expressão de GRK-2 e internalização do receptor CXCR2 na membrana destas células.

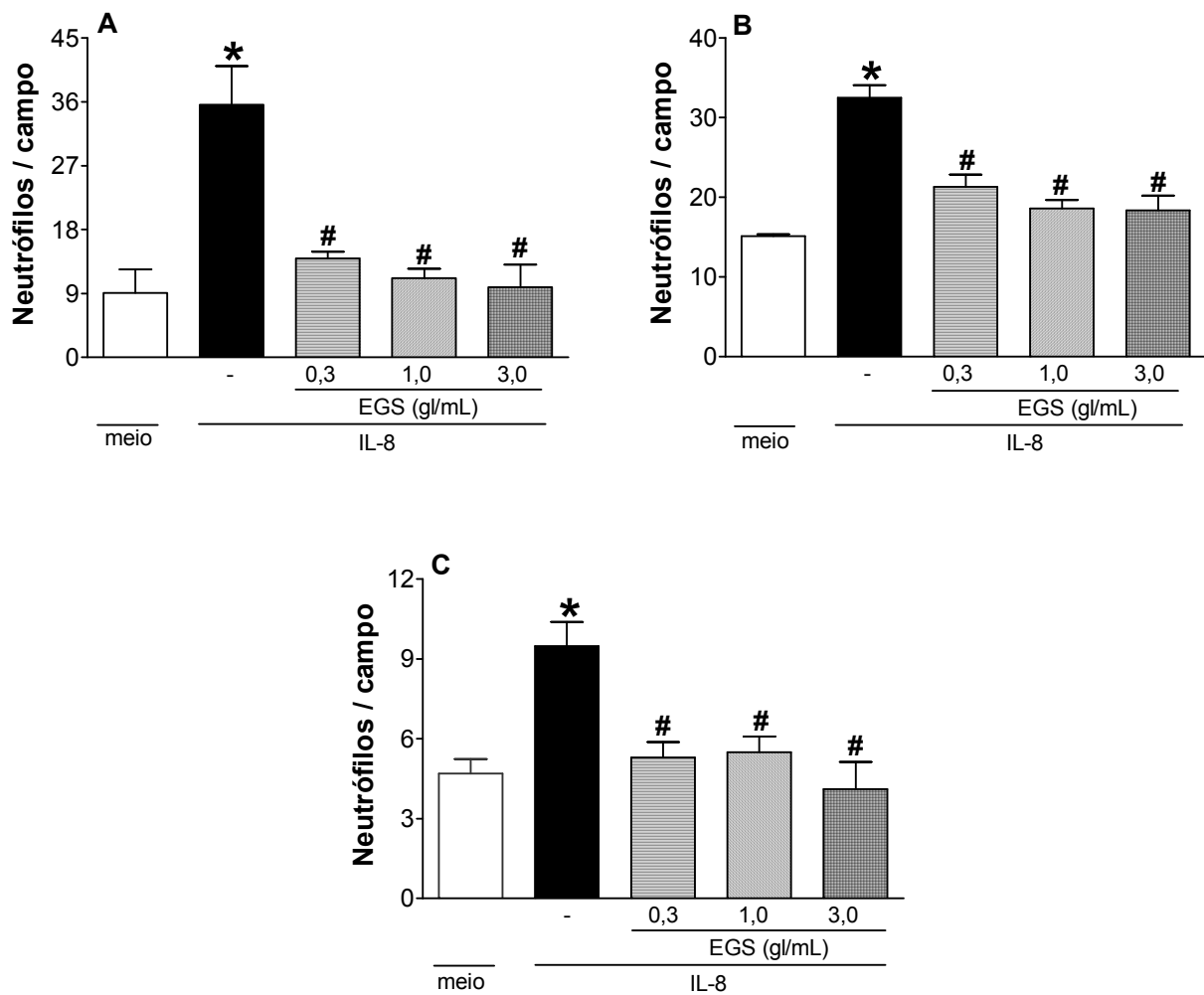


Figura 10: Extrato de glândulas salivares (EGS) de *Lutzomyia longipalpis* inibe a quimiotaxia de neutrófilos obtidos de sangue periférico de indivíduos saudáveis e de sangue e líquido sinovial de pacientes com AR estimulados com IL-8/CXCL8. Neutrófilos isolados do sangue periférico de indivíduos saudáveis (A) e de pacientes com AR (B) e do líquido sinovial de pacientes com AR (C) foram pré-tratados com o EGS (0,3; 1,0 ou 3,0 glândulas/ml) por 30 minutos e colocados para migrar por 1 hora em câmara de boyden frente a IL-8/CXCL8 (20 ng/ml). Como controle negativo, os neutrófilos foram incubados com meio. Os resultados estão expressos como média \pm EPM do número de neutrófilos emigrados frente a IL-8/CXCL8 e são representativos de dois diferentes experimentos. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo estimulado com meio; # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo pré-tratado com meio e estimulado com IL-8/CXCL8 (ANOVA seguido do teste de Bonferroni).

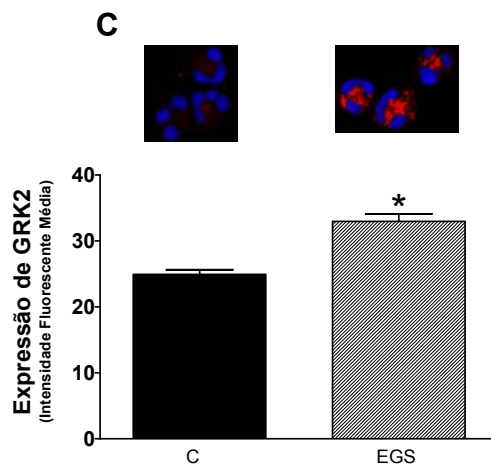
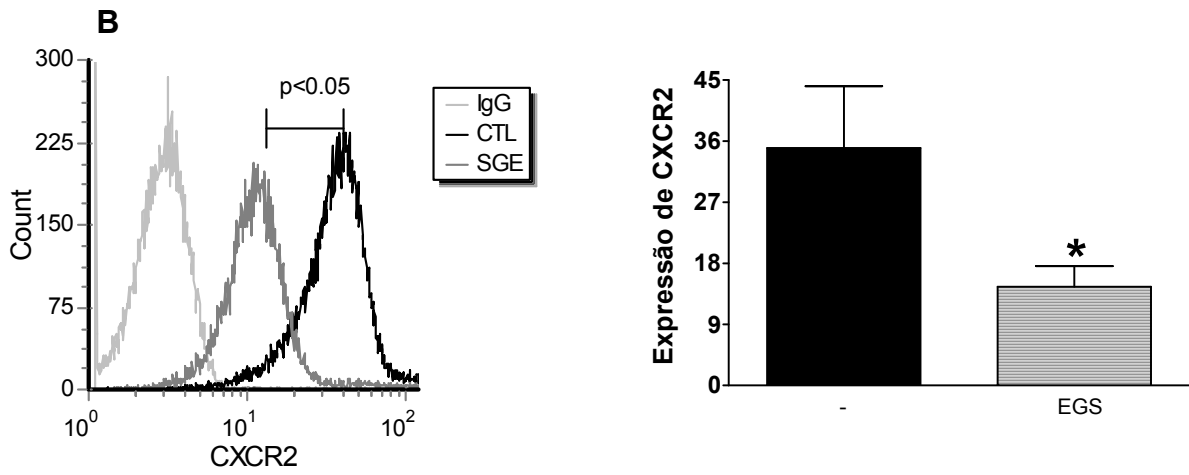
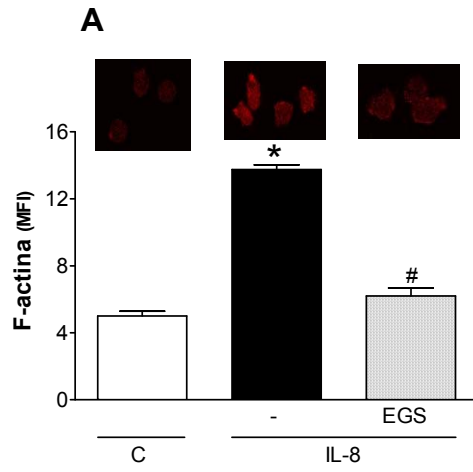


Figura 11: Extrato de glândulas salivares (EGS) de *Lutzomyia longipalpis* reduz a polimerização de actina e expressão de CXCR2 e aumenta a expressão de GRK-2 em neutrófilos obtidos do sangue periférico de pacientes com artrite reumatóide (AR). Os neutrófilos foram pré-tratados, ou não, com o EGS (3 glândulas/ml) e em seguida: **(A)** Os filamentos de F-actina dos neutrófilos foram corados com faloidina-rodamina e observados por microscopia óptica (x400) e a intensidade de fluorescência de F-actina quantificada utilizando o programa Image J. Os resultados estão expressos como média \pm EPM da intensidade de fluorescência de F-actina e são representativos de dois diferentes experimentos. **(B)** Expressão de CXCR2 em neutrófilos avaliado por experimento de citometria de fluxo. **(D)** Expressão de GRK-2 foi avaliada pela marcação com GRK-2 – PE e observados por microscopia óptica (x400. Como controle negativo **(C)** os neutrófilos foram incubados com meio. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo incubado com meio # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo estimulado com IL-8/CXCL8 (teste T de students ou ANOVA seguido do teste de Bonferroni).

Dado que a migração celular é um processo multimediado e que apresenta vários componentes envolvidos como o C5a, fMLP, LTB₄, entre outros, nosso próximo passo foi investigar o efeito do EGS em modular a quimioaxia de neutrófilos frente a outros receptores, uma vez que observamos o efeito do EGS em reduzir a quimiotaxia de neutrófilos estimulados com IL-8/CXCL8. Para isto, avaliamos o efeito do EGS na quimiotaxia de neutrófilos frente a outros estímulos quimiotáticos como o C5a, fMLP e LTB₄. Observamos que neutrófilos isolados do sangue periférico de indivíduos saudáveis pré-tratados com o EGS (3 glândulas/ml) não apresentaram uma redução na quimiotaxia frente ao C5a, fMLP ou LTB₄ quando comparados a neutrófilos pré-tratados com meio e estimulados com os respectivos estímulos quimiotáticos (**Figura 12**), ao contrário do efeito causado pelo EGS em diminuir a quimiotaxia de neutrófilos quando estimulados com IL-8/CXCL8. A fim de confirmarmos o efeito seletivo do EGS para o receptor CXCR2, investigamos se o EGS seria capaz de induzir a internalização do receptor CD88 (ligante do C5a), do receptor BLT1 (ligante do LTB₄) e do FPR1 (ligante do fMLP) em neutrófilos isolados do sangue periférico de indivíduos saudáveis. Interessantemente, como observado na quimiotaxia, notamos que neutrófilos pré-tratados com o EGS (3 glândulas/ml, por 30 minutos) apresentaram uma expressão dos receptores CD88, BLT1 e FPR1 semelhante à expressão destes receptores em neutrófilos pré-tratados somente com meio de cultura (**Figura 13**).

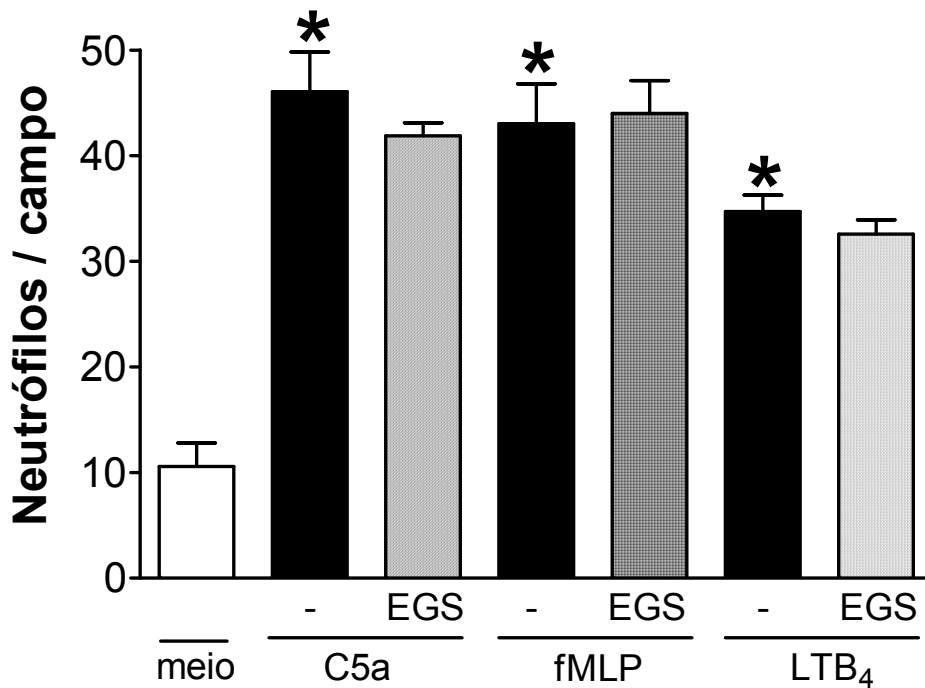


Figura 12: Extrato de glândulas salivares (EGS) de *Lutzomyia longipalpis* não inibe a quimiotaxia de neutrófilos obtidos de sangue periférico de indivíduos saudáveis estimulados com C5a, fMLP ou LTB₄. Neutrófilos isolados do sangue periférico de indivíduos saudáveis foram pré-tratados com o EGS (3,0 glândulas/ml) por 30 minutos e colocados para migrar por 1 hora em câmara de boyden frente ao LTB₄, C5a ou fMLP (10^{-8} M). Como controle negativo, os neutrófilos foram incubados com meio. Os resultados estão expressos como média \pm EPM do número de neutrófilos emigrados frente ao estímulo e são representativos de dois diferentes experimentos (n=2 por grupo). *p< 0,05 quando comparado ao grupo estimulado com meio (ANOVA seguido do teste de Bonferroni).

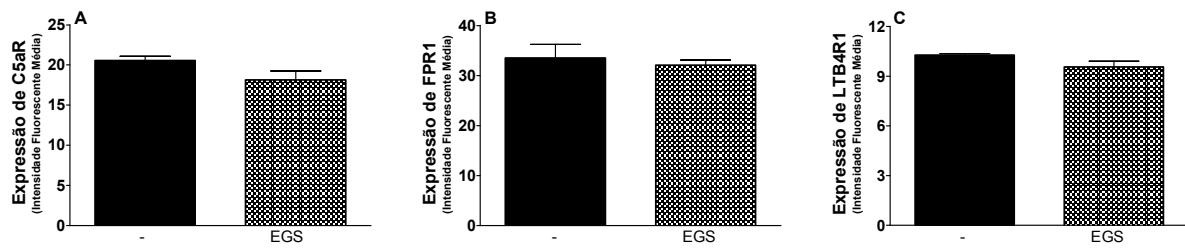


Figura 13: Extrato de glândulas salivares (EGS) de *Lutzomyia longipalpis* não induz internalização de receptor para LTB₄, C5a ou fMLP em neutrófilos obtidos de sangue periférico de indivíduos saudáveis. Neutrófilos foram pré-tratados, ou não, com o EGS (3,0 glândulas/ml) por 30 minutos e, em seguida as expressões dos receptores para C5a (C5aR, **A), para fMLP (FPR1, **B**) ou para LTB₄ (LTB4R1, **C**) marcados com ficoeritrina (PE) foram analisadas no aparelho de citometria de fluxo. Os resultados estão expressos como intensidade de fluorescência média e são representativos de dois diferentes experimentos.**

Além da IL-8/CXCL8 estimular a migração de neutrófilos, esta também induz aumento do cálcio citosólico livre, o qual tem relatos na literatura demonstrando que este aumento de cálcio está envolvido com as funções secretórias, como, geração de intermediários reativos de oxigênio e liberação de enzimas lisossomais pelos neutrófilos (Elsner, Kaeffer *et al.*, 1992; Ley, Laudanna *et al.*, 2007). Da mesma forma, vários trabalhos demonstram que os processos envolvidos na motilidade dos neutrófilos requerem a formação de F-actina (Zigmond, Slonczewski *et al.*, 1988), no entanto, não é necessário ter o aumento do cálcio citosólico (Sha'afi, Shefcyk *et al.*, 1986; Al-Mohanna e Hallett, 1990; Downey, Chan *et al.*, 1990). Entretanto, é importante salientar que existem alguns estudos demonstrando que o cálcio é necessário para a migração celular (Niggli, 2003). Deste modo, nosso próximo passo foi investigar a influência do EGS sobre o influxo de cálcio intracelular em neutrófilos obtidos do sangue periférico de indivíduos saudáveis estimulados com IL-8/CXCL8. Como podemos observar nas **Figuras 14A e 14B**, o EGS nas concentrações de 1 e 3 glândulas/ml, não reduziu o influxo de cálcio intracelular em neutrófilos estimulados com IL-8/CXCL8, quando comparado com o influxo de cálcio intracelular nos neutrófilos pré-tratados com meio e estimulados com IL-8/CXCL8. Ainda, observamos o nível basal de cálcio intracelular em neutrófilos incubados com meio (**Figura 14C**) e os níveis transientes elevados de cálcio intracelular em neutrófilos tanto estimulados com IL-8/CXCL8 (**Figura 14D**), como em neutrófilos pré-tratados com o EGS nas concentrações de 1 glândula/ml; (**Figura 14E**) ou na concentração de 3 glândulas/ml; (**Figura 14F**) e estimulados com IL-8/CXCL8. Em conjunto, nossos resultados demonstraram que o EGS interferiu com a quimiotaxia dos neutrófilos, porém, não interferiu com o influxo de cálcio intracelular nos neutrófilos.

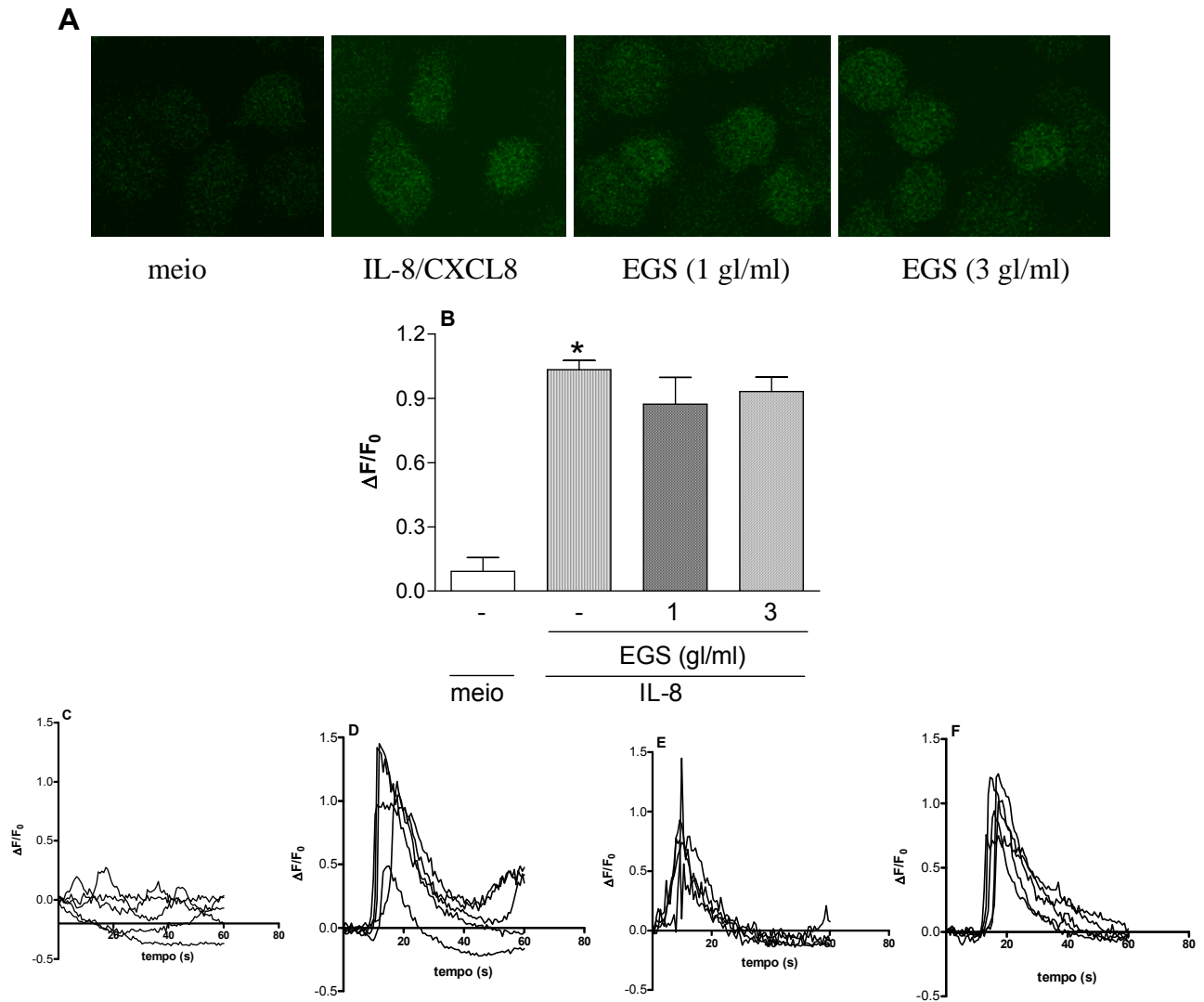


Figura 14: Extrato de glândulas salivares (EGS) de *Lutzomyia longipalpis* não reduz os níveis de cálcio intracelular em neutrófilos de indivíduos saudáveis estimulados com IL-8/CXCL8. Os níveis de cálcio intracelular foram analisados por imunofluorescência em neutrófilos de indivíduos saudáveis pré-tratados 30 minutos antes com o EGS (1,0 ou 3,0 glândulas/ml) e estimulados com a IL-8/CXCL8 (20 ng/ml). Como controle negativo, os neutrófilos foram incubados com meio. O aumento de fluorescência do indicador Fluo-3 AM foi observado por microscopia óptica (x400) (**A**) e a variação de fluorescência dividida pela fluorescência basal ($\Delta F/F_0$) quantificada (**B**) utilizando o programa Image J. As figuras **C**, **D**, **E** e **F** mostram os níveis transientes de cálcio intracelular através da $\Delta F/F_0$ de 5 neutrófilos frente à aplicação de meio (**C**), IL-8/CXCL8 (20 ng/ml, **D**) do EGS (1 glândula/ml; **E**) ou do EGS (3 glândulas/ml; **F**) por 30 minutos e após estimulados com IL-8/CXCL8 pelo tempo em segundos. Os resultados são representativos de dois diferentes experimentos (n=1 por grupo). *p< 0,05 quando comparado ao grupo incubado com meio (ANOVA seguido do teste de Bonferroni).

4.3. Identificação de constituintes protéicos presentes no EGS que são responsáveis pela inibição da migração de neutrófilos em modelo experimental de inflamação imune e o mecanismo envolvido

Com o intuito de investigarmos quais os componentes presentes no EGS que são os responsáveis em inibir a migração de neutrófilos em modelo experimental de inflamação imune, utilizamos plasmídeos contendo genes que codificam para as proteínas presentes no EGS, os quais foram feitos nos laboratórios dos profs. Dr Jesus G. Valenzuela e Dr José Marcos Ribeiro (National Institute of Health - NIH). Para atender a esse propósito, primeiramente testamos o efeito de cinco grupos (G1, G2, G3, G4 e G5) de plasmídeos codificando para várias proteínas contidas no EGS, com o intuito de avaliar quais dos grupos contém atividade inibitória na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal em animais imunizados com OVA, para em uma etapa posterior avaliarmos as proteínas individualmente.

Como podemos observar na **Figura 15**, o grupo 2 de plasmídeos contendo os genes que codificam para as proteínas LJM 11, LJM 34, LJM 13 e LJM 23, o grupo 3 que codifica para as proteínas LJM 10, LJM 143, LJM 142, LJM 17, LJM 06 e LJM 04 e o grupo 4 que codifica para as proteínas LJM, 114, LJM 111, LJM 78, LJM 238, LJM 169 e LJM 105 apresentaram uma redução na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal em comparação aos animais que receberam plasmídeo sem codificar genes para proteínas (controle, C). É importante salientar que os plasmídeos foram injetados por via intramuscular na dose de 50 µg / animal, 48 horas antes do desafio com o antígeno. Ademais, os grupos 1 e 5 de plasmídeo não apresentaram efeito inibitório na migração de neutrófilos quando comparado com a migração de neutrófilos dos animais que foram injetados com o plasmídeo controle (C). Nosso próximo passo foi investigar qual proteína contida em cada grupo de plasmídeo era a responsável pelo efeito observado. Deste modo, notamos que os plasmídeos contendo genes que codificam para a proteína LJM34 presente no grupo 2 (**Figura 16A**), LJM 142 presente no grupo 3 (**Figura 16B**) e LJM 111 presente no grupo 4 (**Figura 16C**) são os responsáveis pela diminuição do recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal em animais imunizados

e desafiados com OVA quando comparado ao grupo de animais imunizados que receberam o plasmídeo controle ou salina e foram desafiados com OVA. Torna-se importante ressaltar que um grupo de animais não-imunizados e desafiados com OVA não apresentou uma migração de neutrófilos significativa para a cavidade peritoneal quando comparado com os animais imunizados e desafiados com o antígeno (dados não mostrados).

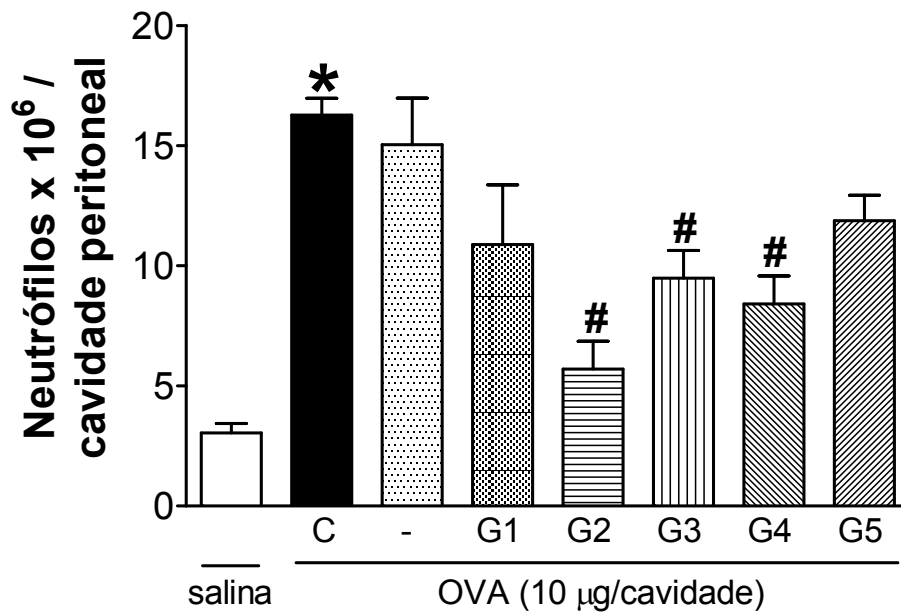


Figura 15: Plasmídeos codificando para os grupos (G) 2, 3 e 4 de proteínas reduzem a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal em animais imunizados e desafiados com OVA. Os animais imunizados foram pré-tratados com 50 µg de plasmídeo codificando para os grupos G1, G2, G3, G4 ou G5 e 48 hs após foram desafiados intra-peritonealmente com OVA (10 µg/cavidade). Um grupo de animais foi injetado com plasmídeo sem codificar gene para proteína (controle, C) e outro grupo foi pré-tratado com salina. A contagem da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal foi realizada 6 h após o desafio com o antígeno. Os resultados estão expressos como média ± EPM do número de neutrófilos por cavidade e são representativos de dois diferentes experimentos (n=5 por grupo). * $p < 0.05$ quando comparado ao grupo desafiado com salina; # $p < 0.05$ quando comparado ao grupo pré-tratado com o plasmídeo controle (C) (ANOVA seguido do teste de Bonferroni).

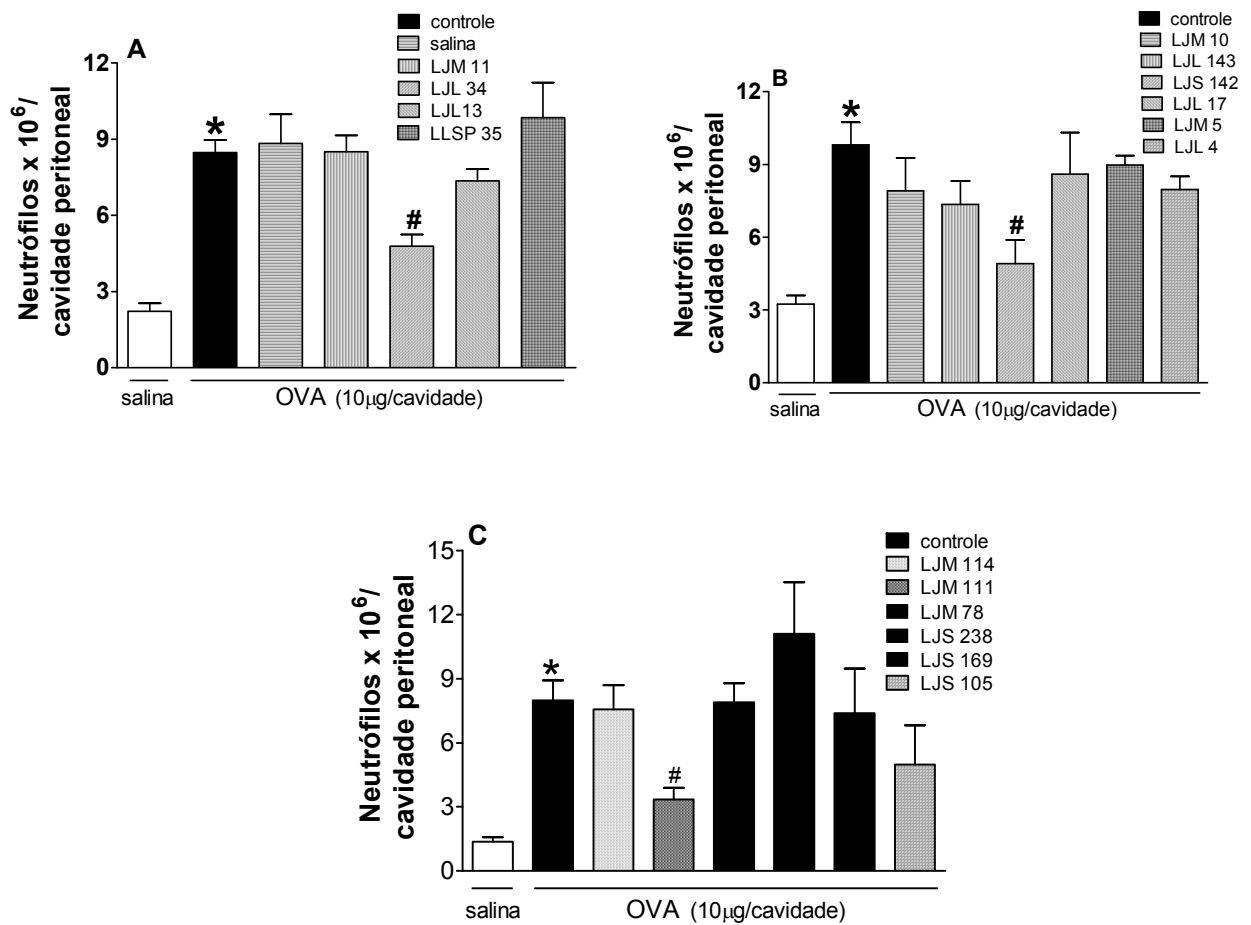


Figura 16: Plasm3deos contendo genes para as prote3nas LJM 11, LJM 13, LJM 17, LJM 5, LJM 4, LJM 114, LJM 111, LJM 78, LJS 238, LJS 169 e LJS 105 inibem o recrutamento de neutr3filos para a cavidade peritoneal em animais imunizados e desafiados com OVA. Os animais imunizados foram pr3-tratados com 50 μ g de plasm3deo codificando para as prote3nas citadas acima, sendo que o painel **A** representa os plasm3deos codificando para prote3nas presentes no G2, o painel **B** para o G3 e o painel **C** para o G4. Os animais imunizados foram desafiados intra-peritonealmente com OVA (10 μ g/cavidade) ap3s 48 hs do pr3-tratamento com os plasm3deos. Um grupo de animais foi injetado com plasm3deo sem codificar gene para prote3na (controle) e outro grupo foi pr3-tratado com salina. A contagem da migra3o de neutr3filos para a cavidade peritoneal foi realizada 6 h ap3s o desafio com o ant3geno. Os resultados est3o expressos como m3dia \pm EPM do n3mero de neutr3filos por cavidade e s3o representativos de dois diferentes experimentos (n=5 por grupo). * p < 0,05 quando comparado ao grupo desafiado com salina; # p < 0,05 quando comparado ao grupo pr3-tratado com o plasm3deo controle (ANOVA seguido do teste de Bonferroni).

Simultaneamente, os laboratórios dos profs. Dr Jesus G. Valenzuela e Dr José Marcos Ribeiro (NIH) tentaram sintetizar as proteínas recombinantes LJL 34, LJS 142 e LJM 111 responsáveis pelo efeito observado por nós de inibir o recrutamento de neutrófilos em modelo de inflamação imune. Dentre essas proteínas, foi realizada a síntese da proteína LJM 111 e desta maneira, fomos investigar, se assim como a saliva, a proteína LJM 111 recombinante seria a responsável em inibir vários parâmetros inflamatórios observados anteriormente. Inicialmente, observamos o efeito da proteína LJM 111 na migração de neutrófilos e hipernocicepção mecânica utilizando o modelo de AIA. Como apresentado na **Figura 17A**, o pré-tratamento com a proteína LJM 111 nas doses de 30, 100 ou 300 ng foi capaz de inibir a migração de neutrófilos para a cavidade articular em animais imunizados e desafiados com mBSA quando comparado a animais imunizados pré-tratados com salina e desafiados com mBSA. Ainda, a proteína LJM 111 (300 ng/animal) reduziu a hipernocicepção mecânica nos animais imunizados e desafiados com mBSA quando comparados a animais imunizados pré-tratados com salina e desafiados com mBSA (**Figura 17B**).

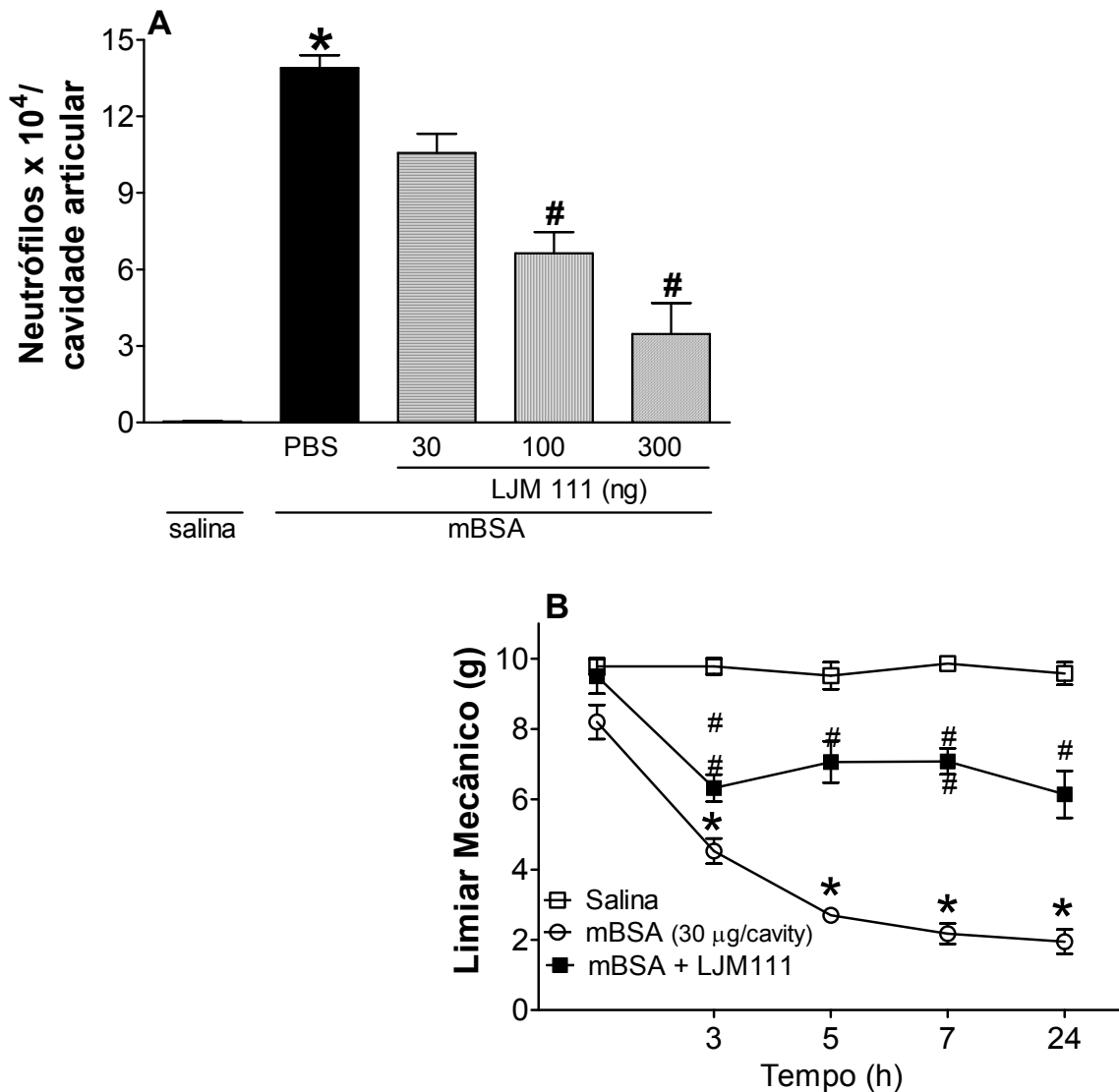


Figura 17: Proteína LJM 111 reduz a migração de neutrófilos e hipernociceção mecânica em modelo de artrite induzida por antígeno (AIA). (A) Os animais imunizados foram pré-tratados com a proteína LJM 111 (30, 100 ou 300 ng por animal, via intravenosa (i.v.) e 15 minutos após foram desafiados com mBSA através de injeção intra-articular (10 µg/cavidade). A migração de neutrófilos para a cavidade articular foi avaliada 24 h após o desafio com a mBSA. Os resultados estão expressos como média ± EPM do número de neutrófilos por cavidade. (B) A proteína LJM 111 (300 ng/animal) foi administrada por via i.v. nos animais previamente imunizados e 15 minutos após os animais foram desafiados com 30 µg/cavidade articular de mBSA para mensuração de hipernociceção mecânica. A hipernociceção mecânica foi mensurada com auxílio do aparelho VonFrey. Em todos os experimentos, um grupo de animais foi desafiado com salina, como controle negativo. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo desafiado com salina. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo desafiado com mBSA (ANOVA seguido do teste de Bonferroni).

Como relatado anteriormente, o EGS inibiu a migração *in vitro* de neutrófilos obtidos, tanto da medula óssea de camundongos, como de sangue e líquido sinovial de pacientes com AR e estimulados com IL-8/CXCL8. Deste modo, nosso próximo passo foi investigar se a proteína LJM 111, contida no EGS, era a responsável pelo efeito inibitório na quimiotaxia de neutrófilos. Como podemos observar na **Figura 18 A**, neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos pré-tratados com a proteína LJM 111 (300, 900 ou 2700 ng/ml) não apresentaram uma redução na quimiotaxia frente a IL-8/CXCL8 quando comparados com neutrófilos pré-tratados com meio e estimulados com IL-8/CXCL8. Deste modo, para confirmarmos que a proteína LJM 111 não modula a migração de neutrófilos *in vitro* frente a IL-8/CXCL8, foi avaliado o efeito desta proteína sobre a polimerização de actina em neutrófilos. Observamos que o pré-tratamento com a proteína LJM 111 na dose de 2700 ng/ml não reduziu a intensidade de fluorescência de F-actina em neutrófilos obtidos da medula óssea de camundongos e estimulados com IL-8/CXCL8 quando comparada à intensidade de fluorescência de F-actina dos neutrófilos pré-tratados com meio e estimulados com IL-8/CXCL8 (**Figura 18 B**). Nossos resultados mostraram que a proteína LJM 111, presente no EGS, não é a responsável pelo efeito inibitório na quimiotaxia dos neutrófilos, isto nos sugere que outro componente, como a proteína LJS 142 ou LJM 34 presente no EGS, possa estar atuando na inibição da quimiotaxia dessas células frente ao estímulo quimiotático IL-8/CXCL8.

Uma vez que a proteína LJM 111, assim como o EGS, reduziu a migração de neutrófilos *in vivo* no modelo de AIA, nós investigamos se a proteína LJM 111 também seria capaz de inibir os níveis de citocinas presentes no sobrenadante de células obtidas de linfonodos de animais imunizados e estimuladas com mBSA. Nossos resultados demonstraram que o pré-tratamento com a proteína LJM 111 em todas as concentrações testadas foi capaz de reduzir os níveis de IL-17 (**Figura 19A**), IFN- γ (**Figura 19B**) e TNF- α (**Figura 19C**) quando comparados com a liberação de mediadores de células pré-tratadas com meio e estimuladas com mBSA. A partir deste resultado, avaliamos se a proteína LJM 111, assim como a saliva total, poderia modular a expressão de moléculas coestimulatórias presentes em DCs. Observamos que a proteína LJM 111 diminuiu a expressão de MHC-II e de CD86 e quando

comparado com a expressão destas moléculas em células incubadas com meio e estimuladas com LPS (**Figura 20A**). A proteína também reduziu os níveis de TNF- α e aumentou os níveis de IL-10 no sobrenadante de DCs estimuladas com LPS (**Figura 20B**). Em conjunto, nossos resultados sugerem que a proteína LJM 111, contida no EGS, é capaz de inibir a resposta inflamatória induzida por mBSA por modular a função e maturação de DC.

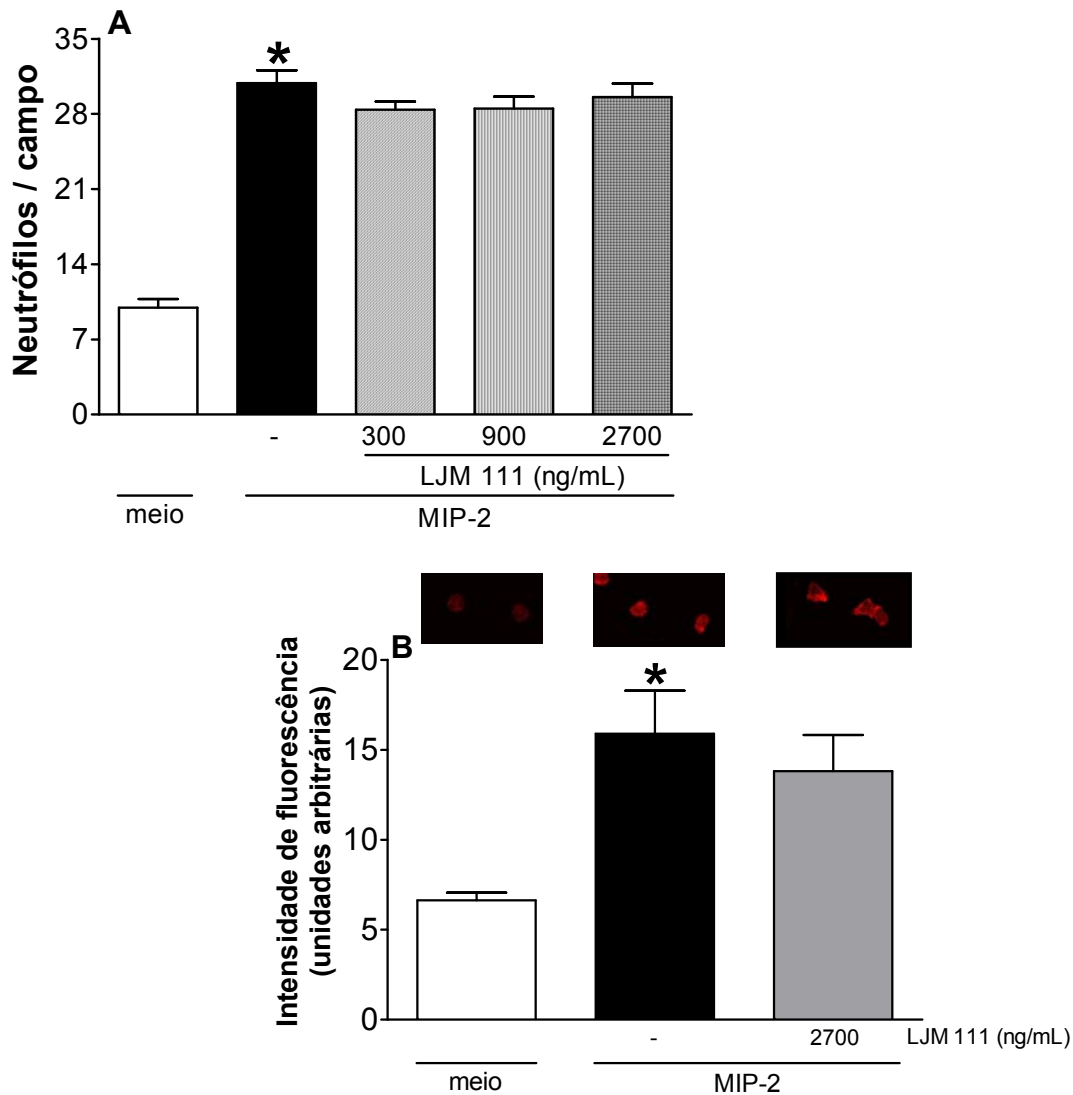


Figura 18: Proteína LJM 111 não reduz a quimiotaxia e polimerização de actina em neutrófilos obtidos da medula óssea de camundongos BALB/c. (A) Os neutrófilos foram pré-tratados com a proteína LJM 111 (300; 900 ou 2700 ng/ml) por 30 minutos e colocados para migrar por 1 hora em câmara de boyden frente à MIP-2 (20 ng/ml). Os resultados estão expressos como média \pm EPM do número de neutrófilos emigrados frente ao estímulo. **(B)** Filamentos de F-actina foram corados com faloidina-rodamina e observados por microscopia óptica (x400) em neutrófilos pré-tratados ou não com LJM 111 (2700 ng/ml) por 30 minutos e a intensidade de fluorescência de F-actina quantificada utilizando o programa Image J. Os resultados estão expressos como média \pm EPM da intensidade de fluorescência de F-actina. Todos os experimentos foram repetidos três vezes. Como controle negativo, os neutrófilos foram incubados com meio. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo incubado com meio; # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo estimulado com MIP-2/CXCL2 (ANOVA seguido do teste de Bonferroni).

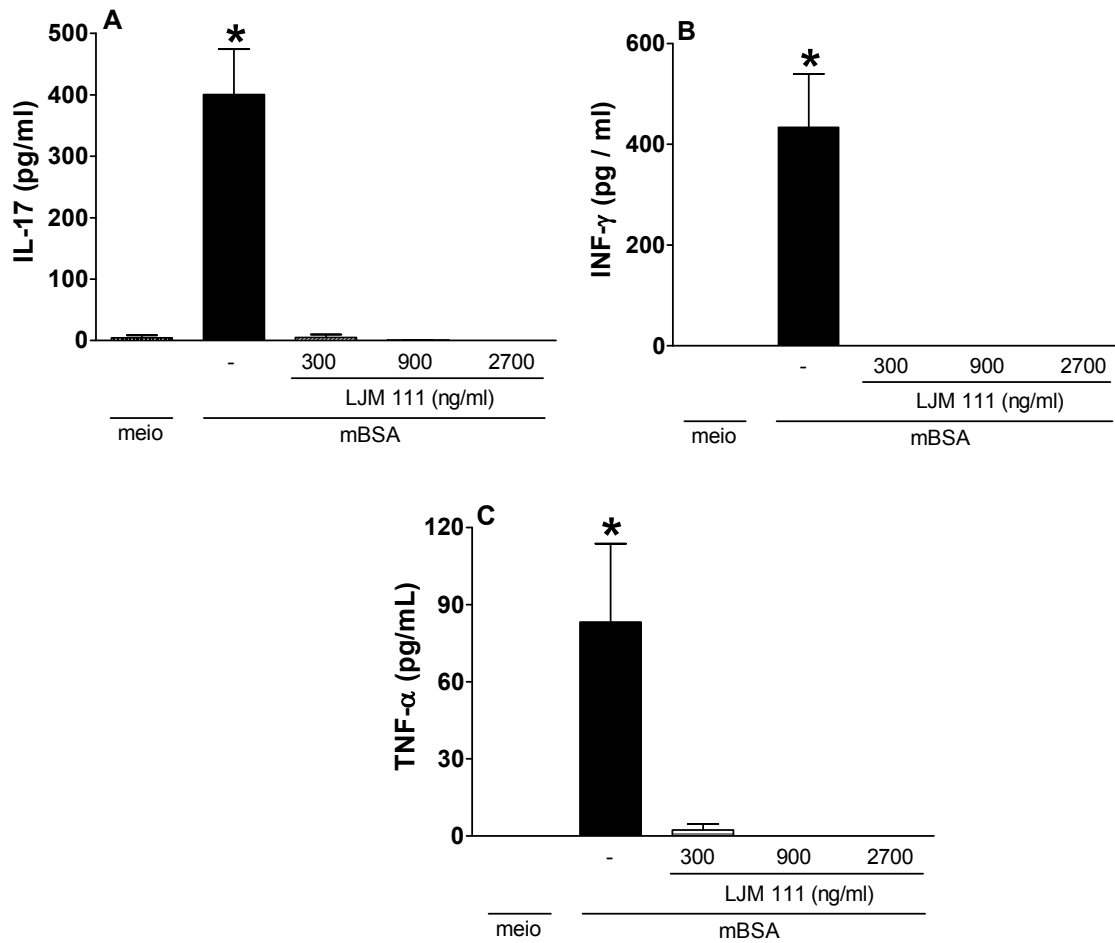


Figura 19: Proteína LJM 111 reduz a liberação de IL-17, IFN- γ e TNF- α em células estimuladas com mBSA. Células obtidas de linfonodos de animais imunizados foram incubadas na presença ou não da proteína LJM 111 (300; 900 ou 2700 ng/ml) por 2 horas e então estimuladas com mBSA (10 μ g/ml). O sobrenadante foi coletado 36 horas após para mensuração de IL-17 (A), IFN- γ (B) e TNF- α (C). Os resultados estão expressos como média \pm EPM e são representativos de três diferentes experimentos. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo incubado com meio. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo incubado com mBSA (ANOVA seguido do teste de Bonferroni).

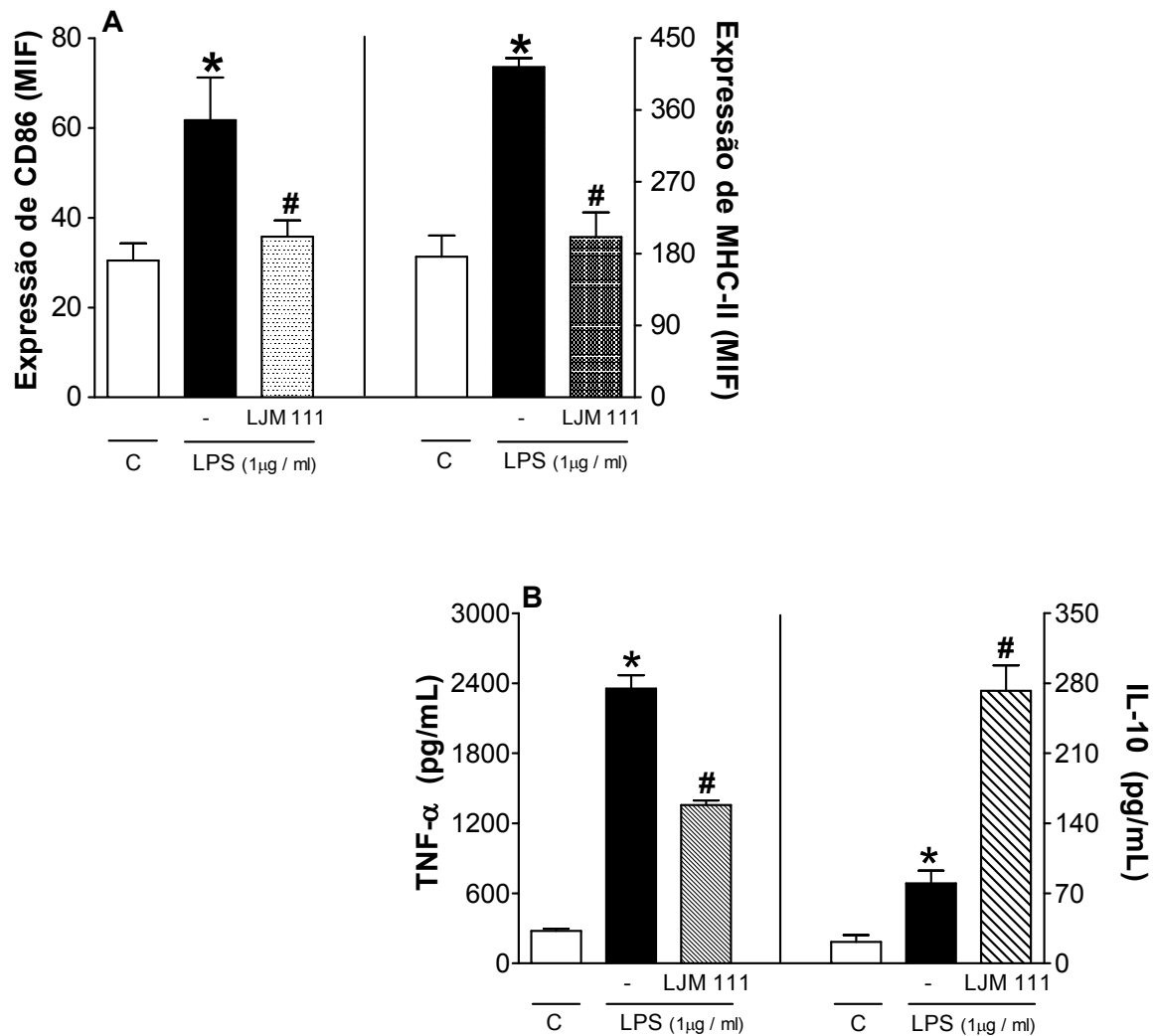


Figura 20: Efeito da proteína LJM 111 sobre a expressão de CD86, MHC-II e produção de TNF- α e IL-10 em células dendríticas (DCs) estimuladas com LPS. DCs foram pré-tratadas, ou não, com a proteína LJM 111 (2700 ng/ml) por 12 horas e estimuladas com LPS. As células foram coletadas 24 horas após para mensuração da intensidade de fluorescência das moléculas em aparelho de citometria de fluxo **(A)** e dosagem de TNF- α e IL-10 no sobrenadante da cultura **(B)**. Como controle negativo, as DCs foram incubadas com meio. Todos os experimentos foram repetidos duas vezes. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo incubado com meio. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo incubado com LPS (ANOVA seguido do teste de Bonferroni).

DISCUSSÃO

Inúmeros trabalhos têm demonstrado que a saliva de insetos hematófagos contém diversas substâncias com propriedades farmacológicas incluindo vasodilatadores, anticoagulantes, inibidores da agregação plaquetária, moléculas anti-inflamatórias e imunomodulatórias (Targett, 2006; Titus, Bishop *et al.*, 2006). Em particular, estudos demonstram que a saliva de *Lutzomyia longipalpis* aumenta significativamente a infectividade da forma promastigota de *L. major* em camundongos BALB/c (Titus e Ribeiro, 1988; Warburg, Saraiva *et al.*, 1994) por modular a resposta imune do hospedeiro através do aumento de citocinas com padrão de resposta Th2 e inibição da produção de citocinas do padrão Th1 (Mbow, Bleyenbergh *et al.*, 1998; Norsworthy, Sun *et al.*, 2004). Estudos conduzidos por nosso grupo demonstram que o EGS de *L. longipalpis* inibe a migração de neutrófilos induzida por OVA em animais imunizados (Monteiro *et al.*, 2005). Carregaro *et al.* (Carregaro, Valenzuela *et al.*, 2008) demonstram que a saliva de *P. papatasi* apresenta efeito anti-inflamatório por inibir a migração neutrofílica em modelo de inflamação imune via um mecanismo seqüencial autócrino de produção de PGE₂ e IL-10 por células dendríticas.

Estes estudos, ao evidenciar a capacidade de salivas de insetos hematófagos em regular a resposta imune somados ao entendimento de uma grande variedade de mecanismos patogênicos, envolvidos em doenças autoimune, nos levaram a investigar o efeito do EGS de *L. longipalpis* em modelo experimental de artrite. No presente estudo, nós demonstramos que o EGS possui propriedade anti-inflamatória por inibir a apresentação antigênica e, por conseguinte, a produção de citocinas e a migração de neutrófilos para o foco inflamatório em modelo experimental de artrite.

Nossos dados constataram que, similar ao obtido por Monteiro *et al.* (Monteiro, Nogueira *et al.*, 2005), o pré-tratamento de animais imunizados com OVA inibiu o recrutamento de neutrófilos para o foco inflamatório após o desafio com o antígeno. De modo interessante, verificamos que a saliva também inibiu a migração de neutrófilos em animais imunizados e desafiados com outro antígeno, a mBSA. Estes resultados nos mostram que a saliva modula negativamente a migração celular frente a diferentes agentes inflamatórios e, deste modo, nos sugerem que a saliva pode prevenir danos teciduais causados por diversos agentes inflamatórios presentes durante a

evolução da artrite. O recrutamento de neutrófilos é um processo multimediado, resultante da liberação de diversos mediadores inflamatórios, tais como TNF- α , IL-17, IL-15, IL-18, LTB₄ e diversas quimiocinas (Mulder e Colditz, 1993; Binder, Kress *et al.*, 1999; Lee, Hong *et al.*, 2002). Neste sentido, a artrite reumatóide é caracterizada pela presença excessiva de neutrófilos no fluido sinovial (cerca de 90% do infiltrado leucocitário), além de serem encontrados na cartilagem e no pannus (interface entre a cartilagem e o sítio com erosão ativa) de pacientes com artrite reumatóide, particularmente nos estágios iniciais e fases de recidiva da doença (Hollingsworth, Siegel *et al.*, 1967; Mohr, 1995), sugerindo que parte do dano tecidual observado seja consequência da liberação de substâncias tóxicas por neutrófilos emigrados (Hampton, Kettle *et al.*, 1998). Ademais, durante recidivas da artrite reumatóide ocorre um novo influxo dessas células (Edwards e Hallet, 1997). Um estudo realizado por Wipke e Allen (Wipke e Allen, 2001) utilizando o modelo de artrite com animais K/BxN demonstrou 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, demonstrando, deste modo, a importância dos neutrófilos no início e manutenção do processo inflamatório nas articulações. Nossos resultados comprovaram que a saliva de *L. longipalpis* inibiu a migração de neutrófilos para a cavidade articular em animais com AIA, o que nos leva a sugerir que componentes presentes na saliva possam ser importantes para o desenvolvimento futuro de novos arsenais terapêuticos para o tratamento da artrite.

Além disso, nós avaliamos o efeito anti-inflamatório do EGS em outro modelo de artrite experimental, visto que é importante testar o efeito de uma substância com potencial terapêutico em diferentes modelos experimentais. Interessantemente, nossos dados demonstraram que o EGS também reduziu o escore clínico, avaliado através de parâmetros como formação de edema e eritema em animais com artrite induzida por colágeno. Além disto, investigamos o efeito do EGS sobre a hipernocicepção inflamatória e sobre o processo de lesão articular utilizando o modelo de AIA experimental. Observamos que o EGS foi capaz de inibir a hipernocicepção mecânica em

animais desafiados com mBSA quando comparado com animais tratados com salina e desafiados com o antígeno e de evitar a lesão articular nos animais com AIA. De fato, dados do nosso laboratório demonstram que a inibição da migração de neutrófilos está relacionada à inibição da resposta hipernociceptiva (Cunha, Verri *et al.*, 2008; Guerrero, Verri *et al.*, 2008). Nossos resultados sugerem que o efeito analgésico do EGS possa ser devido a liberação de IL-10 e / ou inibição da liberação de mediadores pró-inflamatórios como PGE₂ e TNF- α , ou ainda, a inibição de outros mediadores que recrutam polimorfonucleares para o sítio inflamado. Em acordo, dados da literatura demonstram que a PGE₂ administrada por via intraplantar em camundongos causa nocicepção através da ativação dos receptores prostanoídes EP3 e EP4, como também é capaz de induzir hipernocicepção persistente. Por outro lado, a IL-10 é capaz de inibir a liberação de mediadores que recrutam neutrófilos e dessa maneira inibir a dor inflamatória (Barsante, Roffe *et al.*, 2005; Kassuya, Ferreira *et al.*, 2007; Zeilhofer, 2007).

A migração de neutrófilos para o foco inflamatório depende do processo de apresentação antigênica pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) para linfócitos TCD4⁺. Este processo é dependente da produção de citocinas e de expressão de moléculas envolvidas com este processo de apresentação de antígenos (Van Duivenvoorde, Han *et al.*, 2007; Vincenti, 2008). Dentre as APCs, as células dendríticas (DCs) são as mais importantes no início da autoimunidade (Bayry, Thirion *et al.*, 2004; Martin, Capini *et al.*, 2007; Thomson e Robbins, 2008). O estado de ativação das DCs pode ser modulado por diversos estímulos, incluindo produtos liberados por patógenos e citocinas (Medzhitov e Janeway, 2000; Lanzavecchia e Sallusto, 2001). Dessa forma, o bloqueio da função de DCs pela saliva pode ser uma etapa determinante para prevenir os danos teciduais observados na AR. Sendo assim, testamos a hipótese de que a saliva poderia estar interferindo com a função de DCs por suprimir a sua capacidade em apresentar o antígeno. De fato, o EGS de *L. longipalpis* inibiu a maturação das DCs, por meio da inibição da expressão de MHC-II e CD86. A saliva também modulou os níveis de mediadores liberados pelas DCs, através de um aumento na produção de IL-10 e redução da síntese de TNF. Além disso, Theodos e Titus (Theodos e Titus, 1993) demonstram que o EGS de *L. longipalpis* inibe a habilidade de macrófagos isolados de

camundongos de apresentar antígenos da *Leishmania* para células T específicas para o parasita. Deste modo, investigamos se o EGS modula a proliferação celular dependente de APC, utilizando um forte candidato à autoantígeno para a AR, o colágeno do tipo II, visto que alguns estudos demonstraram que a resposta de linfócitos T para o colágeno do tipo II é maior em pacientes com AR quando comparado com indivíduos controle ou pacientes com osteoartrite (Kim, Kim *et al.*, 1999; Kim e Kim, 2005). Observamos que o EGS reduziu a proliferação de células obtidas do líquido sinovial de paciente com AR quando estimuladas com colágeno do tipo II.

Nosso próximo passo foi avaliar o efeito do EGS sobre células mononucleares isoladas do sangue periférico de pacientes com AR e estimuladas com fitohemaglutinina (PHA), a fim de determinar se o efeito do EGS possa ser por atuar também em linfócitos ou somente em APCs. Entretanto, o EGS não inibiu a proliferação de linfócitos estimulados com PHA, sugerindo que o EGS inibe a proliferação celular dependente de APCs.

No contexto da AR, as APCs apresentam antígeno às células T nos linfonodos drenantes e estas após passar por um período de proliferação e diferenciação se tornam células efetoras. De fato, as células T secretoras de IL-17 e linfócitos T produtores de IFN- γ têm sido associados com a indução de muitas doenças auto-imunes (Dardalhon, Korn *et al.*, 2008; Oukka, 2008) e as DCs possuem um papel central nestes processos (Bayry, Thirion *et al.*, 2004; Martin, Capini *et al.*, 2007). Os linfócitos T representam uma significativa proporção das células inflamatórias presentes no tecido sinovial e inúmeras evidências suportam que a migração e ativação de linfócitos Th17 para o compartimento articular são supostamente fundamentais na patogênese dos danos teciduais nesta condição inflamatória (Bettelli, Korn *et al.*, 2008; Lubberts, 2008). A citocina IL-17 está diretamente implicada na intensidade da degradação da cartilagem e do osso em modelo experimental de artrite (Sato, Suematsu *et al.*, 2006) e camundongos selvagens desenvolvem artrite induzida por colágeno mais severa do que camundongos deficientes para IL-17 (Nakae, Nambu *et al.*, 2003). Ainda, camundongos deficientes para os fatores de transcrição envolvidos na diferenciação de células T secretoras de IFN- γ , tais como T-bet e STAT-4, são resistentes para o desenvolvimento de encefalomielite auto-imune experimental (Neurath, Weigmann *et al.*, 2002;

Bettelli, Sullivan *et al.*, 2004). Dado que as células T podem liberar várias citocinas, investigamos se o EGS seria capaz de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias em cultura de linfócitos e APCs estimuladas com antígeno. Observamos que células obtidas de linfonodos de animais imunizados e estimuladas com mBSA apresentaram uma produção reduzida de IL-17, TNF- α e IFN- γ quando pré-tratadas com o EGS. Em conjunto, nossos resultados sugerem que um dos possíveis mecanismos usados pelo EGS para inibir a resposta inflamatória seja por inibir a maturação de DCs e, conseqüentemente, a liberação de citocinas pró-inflamatórias.

Nosso próximo passo foi investigar se o EGS apresentaria efeito direto nos neutrófilos, para isto utilizamos como ferramenta o ensaio de quimiotaxia de neutrófilos frente a IL-8/CXCL8. Esta quimiocina é conhecida como um fator quimiotático na migração de neutrófilos para a cavidade articular, o que pode ser confirmado pela presença destas células no fluido sinovial (Brennan, Zachariae *et al.*, 1990). Somado a isto, outro estudo sugere que esta quimiocina pode resultar na inflamação da articulação e degradação da cartilagem mediada por neutrófilos (Kasama, Miwa *et al.*, 2005). Observamos que o EGS inibiu a migração *in vitro* de neutrófilos obtidos, tanto isolados da medula óssea de camundongos BALB/c, como do sangue e líquido sinovial de pacientes com AR e estimulados com IL-8/CXCL8. Esta modulação do EGS sobre o neutrófilo é essencial no sentido de que neutrófilos emigrados podem responder para IL-17 liberando quimiocinas, assim, amplificando o recrutamento de neutrófilos de maneira autócrina (Lemos, Grespan *et al.*, 2009).

O complexo sistema de quimiotaxia de neutrófilos frente a um estímulo quimiotático envolve mecanismos integrados, incluindo a ativação de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) pelos agonistas, mecanismos de sinalização intracelular, como ativação de MAP quinases e PI3 quinase- γ , polimerização de actina, a reorganização do citoesqueleto, o desenvolvimento de polaridade e a adesão reversível (Wallace, Wersto *et al.*, 1984; Howard e Oresajo, 1985; Shields e Haston, 1985). Então, para confirmarmos o efeito inibitório do EGS sobre a migração de neutrófilos *in vitro* frente a IL-8/CXCL8, avaliamos se o EGS também seria capaz de inibir a polimerização de actina nos neutrófilos. Observamos que o EGS inibiu a intensidade de fluorescência

de F-actina em neutrófilos obtidos da medula óssea de camundongos BALB/c, como de sangue e líquido sinovial de pacientes com AR e estimulados com IL-8/CXCL8.

No contexto da AR, o recrutamento celular é um processo multimediado e que apresenta vários componentes envolvidos como o C5a, fMLP, LTB₄, entre outros, sendo assim, nosso próximo passo foi avaliar se o EGS seria capaz de reduzir a quimiotaxia de neutrófilos estimulados com C5a, fMLP ou LTB₄. Observamos que neutrófilos isolados do sangue periférico de indivíduos saudáveis pré-tratados com o EGS não apresentaram uma redução na quimiotaxia frente a estes estímulos quimiotáxicos. Por outro lado, como mencionado acima, notamos que o EGS foi capaz de inibir a responsividade da quimiotaxia dos neutrófilos frente a IL-8/CXCL8. Além disso, esse fenômeno pode ser associado à indução da perda da expressão do receptor CXCR2 induzida pelo EGS nestas células, uma vez que quimiocinas coordenam a migração de leucócitos durante a inflamação via ligação de receptores de quimiocinas (Ley, Laudanna *et al.*, 2007). O receptor CXCR2 apresenta um papel central no recrutamento de neutrófilos da circulação para o sítio de inflamação (Olson e Ley, 2002). De fato, Rios-Santos et al (Rios-Santos, Alves-Filho *et al.*, 2007) demonstram que a migração de neutrófilos está prejudicada durante a sepse, o que pode ser correlacionada com uma regulação negativa na expressão do receptor CXCR2 na membrana de neutrófilos circulantes. Observamos que neutrófilos pré-tratados com o EGS apresentaram uma menor expressão do receptor CXCR2 do que neutrófilos sem tratamento. Os neutrófilos pré-tratados com LPS foram usados como controle positivo do experimento (dados não mostrados), uma vez que estudos demonstram que o LPS, agonista de TLR4, é capaz de internalizar o receptor CXCR2 (Lloyd, Biragyn *et al.*, 1995; Khandaker, Xu *et al.*, 1998).

A exposição de GPCRs a agonistas resulta em uma atenuação rápida da responsividade do receptor por induzir e aumentar a expressão de quinases de receptor acoplado a proteína G (GRKs), as quais fosforilam o GPCR levando a internalização do receptor (Gainetdinov, Bohn *et al.*, 1999; Ferguson, 2001). Existe também uma atenuação da responsividade do receptor que é uma propriedade que geralmente tem sido designada para proteínas quinases dependente de segundos mensageiros, as quais podem agir através de GRKs

(Chuang, Levine *et al.*, 1995; Winstel, Freund *et al.*, 1996), ou fosforilando diretamente o GPCRs (Benovic, Strasser *et al.*, 1986; Lefkowitz, 1993). No presente estudo, nós demonstramos que o EGS foi capaz de aumentar a expressão de GRK-2 em neutrófilos obtidos da medula óssea de camundongos BALB/c, como também de sangue periférico de pacientes com AR e de indivíduos saudáveis. De acordo com nosso resultado, Gros *et al.* (Gros, Benovic *et al.*, 1997), demonstraram que níveis elevados da proteína GRK2 estão correlacionados com uma dessensibilização aumentada do receptor de β 2A, apesar de baixos níveis de catecolaminas circulantes (agonista), em pacientes hipertensos jovens. Ademais, tem sido demonstrado que em pacientes com artrite reumatóide e em ratos depois de desenvolvimento de artrite por adjuvante ou encefalomielite autoimune experimental os níveis de GRK2, 3, e 6 são reduzidos em 50 a 80% em leucócitos do sangue ou do baço (Lombardi, Kavelaars *et al.*, 1999; Lombardi, Kavelaars *et al.*, 2001; Vroon, Lombardi *et al.*, 2003).

Vários estudos têm investigado o papel de agonistas dos receptores TLR2 e TLR4 na quimiotaxia de neutrófilos, demonstrando que estes agonistas são capazes de induzir a internalização do receptor CXCR2 (Lloyd, Biragyn *et al.*, 1995; Khandaker, Mitchell *et al.*, 1999; Alves-Filho, Freitas *et al.*, 2009). De modo semelhante, observamos que o EGS induziu a internalização de CXCR2 e este fato nos levou a avaliar se o EGS poderia estar atuando como agonista dos receptores TLR2 ou TLR4, desse modo induzindo a internalização do receptor CXCR2. Porém, nós observamos que o EGS reduziu a quimiotaxia de neutrófilos isolados de animais deficientes para o receptor TLR2 e não responsivos para o LPS. Ademais, o experimento de quimiotaxia de neutrófilos realizados com os animais não responsivos ao LPS nos permitiu avaliar se o efeito causado pelo EGS poderia ser uma contaminação com o LPS, assim, eliminando a possibilidade de contaminação de LPS como uma causa para os efeitos observados.

Estudos presentes na literatura demonstram que o aumento de cálcio citosólico está envolvido com as funções secretórias, como, geração de intermediários reativos de oxigênio e liberação de enzimas lisossomais pelos neutrófilos, como também o aumento do cálcio pode estar envolvido com o processo de migração celular (Lew, Wollheim *et al.*, 1984; Elsner, Kaeffer *et al.*,

1992; Niggli, 2003). Entretanto, vários trabalhos demonstram que os processos envolvidos na motilidade dos neutrófilos requerem a formação de F-actina (Zigmond, Slonczewski *et al.*, 1988) e que não é necessário ter o aumento do cálcio citosólico (Sha'afi, Shefcyk *et al.*, 1986; Al-Mohanna e Hallett, 1990; Downey, Chan *et al.*, 1990), sugerindo que o processo de sinalização da migração é distinto do processo de sinalização de secreção (Alteraifi e Zhelev, 1997; Haribabu, Zhelev *et al.*, 1999; Li, Jiang *et al.*, 2000). Deste modo, nosso seguinte passo foi investigar a influência do EGS sobre a função secretória dos neutrófilos, avaliada através do influxo de cálcio intracelular em neutrófilos obtidos do sangue periférico de indivíduos saudáveis estimulados com IL-8/CXCL8. Entretanto, observamos que o EGS não reduziu o influxo de cálcio intracelular em neutrófilos estimulados com IL-8/CXCL8. Em conjunto, os resultados demonstraram que o EGS interfere com a quimiotaxia dos neutrófilos, porém, não interfere com a função secretória destes.

Como mencionado anteriormente, o presente estudo e o de Monteiro *et al.* (Monteiro, Nogueira *et al.*, 2005) demonstraram que a saliva de *L. longipalpis* inibe o recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de animais imunizados e desafiados com OVA. Entretanto o sítio específico de ação e a identificação do constituinte salivar responsável pela atividade anti-inflamatória permaneceram para ser elucidados. Deste modo, em colaboração com os laboratórios do prof. Dr Jesus G. Valenzuela e Dr José Marcos Ribeiro (National Institute of Health – NIH), nosso próximo passo foi investigar quais os componentes presentes na saliva poderiam ser os responsáveis pela atividade anti-inflamatória observada. Inicialmente, utilizamos como ferramenta experimental, plasmídeos contendo genes que codificam para proteínas presentes na saliva e avaliamos o efeito destes sobre a migração de neutrófilos em modelo experimental de inflamação imune. Para esta avaliação, utilizamos grupos de plasmídeos codificando para cinco ou seis proteínas contidas no EGS, a fim de determinar qual grupo apresentaria atividade anti-inflamatória neste modelo experimental utilizado. Observamos que os grupos 2, 3 e 4 apresentaram inibição da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal em animais imunizados e desafiados com OVA. Sendo assim, investigamos o efeito das proteínas individualmente, utilizando plasmídeos codificando para cada proteína presente nos grupos 2, 3 e 4 de plasmídeos. Observamos que os

plasmídeos codificando para as proteínas LJM 34 (grupo 2), LJS 142 (grupo 3) ou LJM 111 (grupo 4) apresentaram redução na migração de neutrófilos utilizando o modelo de imunização e desafio com OVA. Devido ao fato de ter sido conseguido somente a realização da síntese da proteína LJM 111 recombinante no NIH, nós demos continuidade ao nosso estudo utilizando a proteína LJM 111 recombinante. É importante mencionar que uma possível causa que somente a proteína LJM 111 conseguiu ser expressa seja por causa da sequência de RNAm desta molécula (de inseto) que possa ser provavelmente muito similar ao códon de células mamíferas e assim a proteína possa ser expressa nestas células ou porque a estrutura desta proteína permite uma fácil expressão. Já as proteínas LJS 142 e LJM 34 provavelmente tenham um códon que não são expressos muito bem em células mamíferas. Ainda, é necessário salientar que estudos conduzidos por nosso grupo demonstram que o Maxadilan, outro componente presente no EGS, não inibe a migração de neutrófilos induzida por OVA em animais imunizados (Monteiro, Nogueira *et al.*, 2005).

A proteína LJM 111 é uma proteína com peso molecular de aproximadamente 43 KDa pertencente a família das proteínas amarelas, sendo encontradas somente em insetos e identificada no estudo realizado por Valenzuela *et al.* (Valenzuela, Garfield *et al.*, 2004). Dentre as proteínas desta família, inclui a apirase salivar de *P. papatasi* (Valenzuela, Belkaid *et al.*, 2001), a enzima conversora de dopacroma presente no intestino de *Ae. aegypti* (Johnson, Li *et al.*, 2001) e a proteína amarela de *D. melanogaster* (Geyer, Spana *et al.*, 1986). O gene amarelo na *Drosophila* foi assim chamado porque quando este era rompido o inseto se tornava amarelo, e posteriormente foi demonstrado ser devido ao fato de que um membro particular da família amarela que era rompido ter uma atividade de isomerase dopacroma que é importante para o escurecimento da cutícula e melanina (Geyer, Spana *et al.*, 1986).

Em nosso estudo, demonstramos que a proteína LJM 111 recombinante reduziu o recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular e a hipernocicepção inflamatória em animais imunizados e desafiados com mBSA. Na sequência, avaliamos se a proteína LJM 111, contida no EGS, poderia ser a responsável por modular a locomoção do neutrófilo por atuar diretamente

nestes. Entretanto, observamos que a proteína LJM 111 não interferiu com a quimiotaxia e polimerização de actina em neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos BALB/c, sugerindo que outro componente presente no EGS possa estar atuando na inibição *in vitro* da quimiotaxia de neutrófilos.

Posteriormente, investigamos se a proteína LJM 111, assim como o EGS, estaria modulando a migração de neutrófilos, já relatada acima, para o foco inflamatório em modelo experimental de artrite por interferir com a maturação de DCs e conseqüentemente com a produção de citocinas pró-inflamatórias. Observamos que a proteína LJM 111 reduziu a expressão de MHC-II e da molécula coestimulatória CD86 em DCs frente ao LPS, bem como inibiu a produção dos níveis de TNF- α em DCs ativadas com LPS, ao passo que potencializou a produção de IL-10 pelo estímulo pró-inflamatório. Estes resultados são de grande interesse desde que DCs incompletamente maduras podem prevenir a autoimunidade (Van Duivenvoorde, Han *et al.*, 2007; Thomson e Robbins, 2008; Jaen, Rulle *et al.*, 2009). Menges *et al.* (Menges, Rossner *et al.*, 2002) relataram que injeções de DCs imaturas são capazes de induzir células T CD4⁺ produtoras de IL-10 e prevenir a encefalomielite autoimune experimental em camundongos. Outro estudo, utilizando o modelo de miocardite autoimune experimental demonstra tolerância induzida por DCs expressando IL-10 (Yang, Li *et al.*, 2006). Além disso, o TNF- α pode aumentar a maturação funcional de DCs, seletivamente estimulando sua capacidade de induzir uma resposta do tipo Th1, enquanto a IL-10 é conhecida por ser uma citocina imunossupressora (D'andrea, Aste-Amezaga *et al.*, 1993; Trinchieri, 1995; Filippi e Von Herrath, 2008).

CONCLUSÃO

Em síntese, o conjunto dos resultados apresentados indica que a proteína LJM 111, presente na saliva de *Lutzomyia longipalpis*, medeia, pelo menos em parte, a atividade anti-inflamatória da saliva. Este constituinte atua na inibição da apresentação do antígeno, levando a uma supressão da resposta inflamatória imune e liberação de mediadores pró-inflamatórios, com conseqüente inibição da migração de neutrófilos. Ainda, outro componente presente na saliva pode ser o responsável em interferir com a locomoção dos neutrófilos por promover a internalização do receptor CXCR2 e de aumentar a expressão de GRK-2. Desta maneira, uma nova proteína ou um coquetel de novos candidatos podem ser vistos como futuro tratamento de doenças inflamatórias, como a artrite reumatóide.

***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

Aggarwal, S., N. Ghilardi, et al. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem*, v.278, n.3, Jan 17, p.1910-4. 2003.

Al-Mohanna, F. A. e M. B. Hallett. Actin polymerization in neutrophils is triggered without a requirement for a rise in cytoplasmic Ca²⁺. *Biochem J*, v.266, n.3, Mar 15, p.669-74. 1990.

Alteraifi, A. M. e D. V. Zhelev. Transient increase of free cytosolic calcium during neutrophil motility responses. *J Cell Sci*, v.110 (Pt 16), Aug, p.1967-77. 1997.

Alves-Filho, J. C., A. Freitas, *et al.* Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.106, n.10, Mar 10, p.4018-23. 2009.

Arend, W. P. e J. M. Dayer. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, v.38, n.2, Feb, p.151-60. 1995.

Barral, A., M. Barral-Netto, et al. Transforming growth factor beta as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.90, n.8, Apr 15, p.3442-6. 1993.

Barsante, M. M., E. Roffe, *et al.* Anti-inflammatory and analgesic effects of atorvastatin in a rat model of adjuvant-induced arthritis. *Eur J Pharmacol*, v.516, n.3, Jun 15, p.282-9. 2005.

Bayry, J., M. Thirion, *et al.* Dendritic cells and autoimmunity. *Autoimmun Rev*, v.3, n.3, Mar, p.183-7. 2004.

Beck, P. L. e J. L. Wallace. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Mediators Inflamm*, v.6, n.2, p.95-103. 1997.

Belkaid, Y., S. Kamhawi, et al. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J Exp Med*, v.188, n.10, Nov 16, p.1941-53. 1998.

Benovic, J. L., R. H. Strasser, *et al.* Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.83, n.9, May, p.2797-801. 1986.

Bettelli, E., B. Sullivan, *et al.* Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*, v.200, n.1, Jul 5, p.79-87. 2004.

Bettelli, E., T. Korn, *et al.* Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature*, v.453, n.7198, Jun 19, p.1051-7. 2008.

Binder, R., A. Kress, *et al.* 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, n.4, p.212-25. 1999.

Bogdan, C. Nitric oxide and the regulation of gene expression. Trends Cell Biol, v.11, n.2, Feb, p.66-75. 2001.

Bogdan, C., M. Rollinghoff, et al. The role of nitric oxide in innate immunity. Immunol Rev, v.173, Feb, p.17-26. 2000.

Boniface, K., B. Blom, et al. From interleukin-23 to T-helper 17 cells: human T-helper cell differentiation revisited. Immunol Rev, v.226, Dec, p.132-46. 2008.

Bowman, A. S., L. B. Coons, et al. Tick saliva: recent advances and implications for vector competence. Med Vet Entomol, v.11, n.3, Jul, p.277-85. 1997.

Bozza, M., M. B. Soares, et al. The PACAP-type I receptor agonist maxadilan from sand fly saliva protects mice against lethal endotoxemia by a mechanism partially dependent on IL-10. Eur J Immunol, v.28, n.10, Oct, p.3120-7. 1998.

Brand, D. D., K. A. Latham, *et al.* Collagen-induced arthritis. Nat Protoc, v.2, n.5, p.1269-75. 2007.

Brennan, F. M., C. O. Zachariae, *et al.* Detection of interleukin 8 biological activity in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and production of interleukin 8 mRNA by isolated synovial cells. Eur J Immunol, v.20, n.9, Sep, p.2141-4. 1990.

Burnstock, G. e J. N. Wood. Purinergic receptors: their role in nociception and primary afferent neurotransmission. Curr Opin Neurobiol, v.6, n.4, Aug, p.526-32. 1996.

Canetti, C. A., B. P. Leung, et al. IL-18 enhances collagen-induced arthritis by recruiting neutrophils via TNF-alpha and leukotriene B4. J Immunol, v.171, n.2, Jul 15, p.1009-15. 2003.

Canetti, C., J. S. Silva, et al. Tumour necrosis factor-alpha and leukotriene B(4) mediate the neutrophil migration in immune inflammation. Br J Pharmacol, v.134, n.8, Dec, p.1619-28. 2001.

Carregaro, V., J. G. Valenzuela, *et al.* Phlebotomine salivas inhibit immune inflammation-induced neutrophil migration via an autocrine DC-derived PGE2/IL-10 sequential pathway. J Leukoc Biol, v.84, n.1, Jul, p.104-14. 2008.

Chabaud, M., J. M. Durand, et al. Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. Arthritis Rheum, v.42, n.5, May, p.963-70. 1999.

Champagne, D. E. The role of salivary vasodilators in bloodfeeding and parasite transmission. Parasitol Today, v.10, n.11, Nov, p.430-3. 1994.

Charlab, R., J. G. Valenzuela, et al. Toward an understanding of the biochemical and

pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.96, n.26, Dec 21, p.15155-60. 1999.

Chuang, T. T., H. Levine, 3rd, *et al.* Phosphorylation and activation of beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *J Biol Chem*, v.270, n.31, Aug 4, p.18660-5. 1995.

Costa, D. J., C. Favali, *et al.* *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenate impairs cytokine production and costimulatory molecule expression on human monocytes and dendritic cells. *Infect Immun*, v.72, n.3, Mar, p.1298-305. 2004.

Cunha, F. Q., S. Moncada, *et al.* Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, v.182, n.3, Feb 14, p.1155-9. 1992.

Cunha, T. M., W. A. Verri, Jr., *et al.* Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. *J Leukoc Biol*, v.83, n.4, Apr, p.824-32. 2008.

D'andrea, A., M. Aste-Amezaga, *et al.* Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med*, v.178, n.3, Sep 1, p.1041-8. 1993.

Dardalhon, V., T. Korn, *et al.* Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. *J Autoimmun*, v.31, n.3, Nov, p.252-6. 2008.

Di Giovine, F. S., G. Nuki, *et al.* Tumour necrosis factor in synovial exudates. *Ann Rheum Dis*, v.47, n.9, Sep, p.768-72. 1988.

Downey, G. P., C. K. Chan, *et al.* Actin assembly in electropermeabilized neutrophils: role of intracellular calcium. *J Cell Biol*, v.110, n.6, Jun, p.1975-82. 1990.

Downey, G. P., C. K. Chan, *et al.* Actin assembly in electropermeabilized neutrophils: role of intracellular calcium. *J Cell Biol*, v.110, n.6, Jun, p.1975.

Elsner, J., V. Kaefer, *et al.* Heterogeneity in the mobilization of cytoplasmic calcium by human polymorphonuclear leukocytes in response to fMLP, C5a and IL-8/NAP-1. *J Leukoc Biol*, v.51, n.1, Jan, p.77-83. 1992.

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

Feldmann, M., F. M. Brennan, *et al.* Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol*, v.14, p.397-440. 1996.

Ferguson, S. S. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev*, v.53, n.1, Mar, p.1-24. 2001.

Figarella-Branger, D., M. Civatte, *et al.* Cytokines, chemokines, and cell adhesion molecules in inflammatory myopathies. *Muscle Nerve*, v.28, n.6, Dec, p.659-82. 2003.

Filippi, C. M. e M. G. Von Herrath. IL-10 and the resolution of infections. J Pathol, v.214, n.2, Jan, p.224-30. 2008.

Fontana, A., H. Hengartner, et al. Interleukin 1 activity in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. Rheumatol Int, v.2, n.2, p.49-53. 1982.

Francischetti, I. M., J. G. Valenzuela, et al. Anophelin: kinetics and mechanism of thrombin inhibition. Biochemistry, v.38, n.50, Dec 14, p.16678-85. 1999.

Gainetdinov, R. R., L. M. Bohn, *et al.* Muscarinic supersensitivity and impaired receptor desensitization in G protein-coupled receptor kinase 5-deficient mice. Neuron, v.24, n.4, Dec, p.1029-36. 1999.

Geyer, P. K., C. Spana, *et al.* On the molecular mechanism of gypsy-induced mutations at the yellow locus of *Drosophila melanogaster*. Embo J, v.5, n.10, Oct, p.2657-62. 1986.

Gillespie, R. D., M. L. Mbow, et al. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. Parasite Immunol, v.22, n.7, Jul, p.319-31. 2000.

Gracie, J. A., R. J. Forsey, et al. A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. J Clin Invest, v.104, n.10, Nov, p.1393-401. 1999.

Grespan, R., S. Y. Fukada, et al. CXCR2-specific chemokines mediate leukotriene B4-dependent recruitment of neutrophils to inflamed joints in mice with antigen-induced arthritis. Arthritis Rheum, v.58, n.7, Jul, p.2030-40. 2008.

Gros, R., J. L. Benovic, *et al.* G-protein-coupled receptor kinase activity is increased in hypertension. J Clin Invest, v.99, n.9, May 1, p.2087-93. 1997.

Guerrero, A. T., W. A. Verri, Jr., *et al.* Involvement of LTB4 in zymosan-induced joint nociception in mice: participation of neutrophils and PGE2. J Leukoc Biol, v.83, n.1, Jan, p.122-30. 2008.

Gutcher, I. e B. Becher. APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. J Clin Invest, v.117, n.5, May, p.1119-27. 2007.

Halloran, M. M., J. M. Woods, et al. The role of an epithelial neutrophil-activating peptide-78-like protein in rat adjuvant-induced arthritis. J Immunol, v.162, n.12, Jun 15, p.7492-500. 1999.

Hampton, M. B., A. J. Kettle, *et al.* Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. Blood, v.92, n.9, Nov 1, p.3007-17. 1998.

Haribabu, B., D. V. Zhelev, *et al.* Chemoattractant receptors activate distinct pathways for chemotaxis and secretion. Role of G-protein usage. J Biol Chem, v.274, n.52, Dec 24, p.37087-92. 1999.

Harris, E. D., Jr. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. N

Engl J Med, v.322, n.18, May 3, p.1277-89. 1990.

Hasko, G., D. G. Kuhel, et al. Inosine inhibits inflammatory cytokine production by a postranscriptional mechanism and protects against endotoxin-induced shock. *J Immunol*, v.164, n.2, Jan 15, p.1013-9. 2000.

Hentzen, E. R., S. Neelamegham, et al. Sequential binding of CD11a/CD18 and CD11b/CD18 defines neutrophil capture and stable adhesion to intercellular adhesion molecule-1. *Blood*, v.95, n.3, Feb 1, p.911-20. 2000.

Hollingsworth, J. W., E. R. Siegel, *et al.* Granulocyte survival in synovial exudate of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory joint diseases. *Yale J Biol Med*, v.39, n.5, Apr, p.289-96. 1967.

Howard, T. H. e C. O. Oresajo. The kinetics of chemotactic peptide-induced change in F-actin content, F-actin distribution, and the shape of neutrophils. *J Cell Biol*, v.101, n.3, Sep, p.1078-85. 1985.

Huttenlocher, A., R. R. Sandborg, et al. Adhesion in cell migration. *Curr Opin Cell Biol*, v.7, n.5, Oct, p.697-706. 1995.

Hwang, S. Y. e H. Y. Kim. Expression of IL-17 homologs and their receptors in the synovial cells of rheumatoid arthritis patients. *Mol Cells*, v.19, n.2, Apr 30, p.180-4. 2005.

Hynes, R. O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, v.69, n.1, Apr 3, p.11-25. 1992a.

Inaba, K., W. J. Swiggard, *et al.* Isolation of dendritic cells. *Curr Protoc Immunol*, v.Chapter 3, May, p.Unit 3 7. 2001.

Jaen, O., S. Rulle, *et al.* Dendritic cells modulated by innate immunity improve collagen-induced arthritis and induce regulatory T cells in vivo. *Immunology*, v.126, n.1, Jan, p.35-44. 2009.

Jankovic, D., Z. Liu, et al. Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends Immunol*, v.22, n.8, Aug, p.450-7. 2001.

Johnson, J. K., J. Li, *et al.* Cloning and characterization of a dopachrome conversion enzyme from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*, v.31, n.11, Oct, p.1125-35. 2001.

Jones, D. A., O. Abbassi, et al. P-selectin mediates neutrophil rolling on histamine-stimulated endothelial cells. *Biophys J*, v.65, n.4, Oct, p.1560-9. 1993.

Jovanovic, D. V., J. A. Di Battista, et al. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol*, v.160, n.7, Apr 1, p.3513-21. 1998.

Jovanovic, D. V., J. Martel-Pelletier, et al. Stimulation of 92-kd gelatinase (matrix

metalloproteinase 9) production by interleukin-17 in human monocyte/macrophages: a possible role in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, v.43, n.5, May, p.1134-44. 2000.

Kasama, T., Y. Miwa, *et al.* Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, v.4, n.3, Jun, p.273-9. 2005.

Kassuya, C. A., J. Ferreira, *et al.* Intraplantar PGE2 causes nociceptive behaviour and mechanical allodynia: the role of prostanoid E receptors and protein kinases. *Br J Pharmacol*, v.150, n.6, Mar, p.727-37. 2007.

Katz, O., J. N. Waitumbi, *et al.* Adenosine, AMP, and protein phosphatase activity in sandfly saliva. *Am J Trop Med Hyg*, v.62, n.1, Jan, p.145-50. 2000.

Katz, Y., O. Nadiv, *et al.* Interleukin-17 enhances tumor necrosis factor alpha-induced synthesis of interleukins 1,6, and 8 in skin and synovial fibroblasts: a possible role as a "fine-tuning cytokine" in inflammation processes. *Arthritis Rheum*, v.44, n.9, Sep, p.2176-84. 2001.

Khandaker, M. H., G. Mitchell, *et al.* Metalloproteinases are involved in lipopolysaccharide- and tumor necrosis factor-alpha-mediated regulation of CXCR1 and CXCR2 chemokine receptor expression. *Blood*, v.93, n.7, Apr 1, p.2173-85. 1999.

Khandaker, M. H., L. Xu, *et al.* CXCR1 and CXCR2 are rapidly down-modulated by bacterial endotoxin through a unique agonist-independent, tyrosine kinase-dependent mechanism. *J Immunol*, v.161, n.4, Aug 15, p.1930-8. 1998.

Kim, H. Y., W. U. Kim, *et al.* Enhanced T cell proliferative response to type II collagen and synthetic peptide CII (255-274) in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, v.42, n.10, Oct, p.2085-93. 1999.

Kim, W. U. e K. J. Kim. T cell proliferative response to type II collagen in the inflammatory process and joint damage in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, v.32, n.2, Feb, p.225-30. 2005.

Kitsis, E. e G. Weissmann. The role of the neutrophil in rheumatoid arthritis. *Clin Orthop Relat Res*, n.265, Apr, p.63-72. 1991.

Koch, A. E., S. L. Kunkel, *et al.* Growth-related gene product alpha. A chemotactic cytokine for neutrophils in rheumatoid arthritis. *J Immunol*, v.155, n.7, Oct 1, p.3660-6. 1995.

Koenders, M. I., E. Lubberts, *et al.* Induction of cartilage damage by overexpression of T cell interleukin-17A in experimental arthritis in mice deficient in interleukin-1. *Arthritis Rheum*, v.52, n.3, Mar, p.975-83. 2005.

Kotake, S., H. R. Schumacher, Jr., *et al.* In vivo gene expression of type 1 and type 2 cytokines in synovial tissues from patients in early stages of rheumatoid, reactive, and undifferentiated arthritis. *Proc Assoc Am Physicians*, v.109, n.3, May, p.286-301. 1997.

Kotake, S., N. Udagawa, *et al.* IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid

arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest*, v.103, n.9, May, p.1345-52. 1999.

Kuwabara, K., K. Yasui, et al. Effects of the second-generation leukotriene B(4) receptor antagonist, LY293111Na, on leukocyte infiltration and collagen-induced arthritis in mice. *Eur J Pharmacol*, v.402, n.3, Aug 25, p.275-85. 2000.

Lanzavecchia, A. e F. Sallusto. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell*, v.106, n.3, Aug 10, p.263-6. 2001.

Lawrence, M. B. e T. A. Springer. Neutrophils roll on E-selectin. *J Immunol*, v.151, n.11, Dec 1, p.6338-46. 1993.

Lee, S. W., Y. S. Hong, et al. Anti-inflammatory effects of IL-4 and IL-10 on human polymorphonuclear leukocytes. *J Korean Med Sci*, v.17, n.1, Feb, p.7-14. 2002.

Lefkowitz, R. J. G protein-coupled receptor kinases. *Cell*, v.74, n.3, Aug 13, p.409-12. 1993.

Légrand, A., B. Fermor, et al. Interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-17 synergistically up-regulate nitric oxide and prostaglandin E2 production in explants of human osteoarthritic knee menisci. *Arthritis Rheum*, v.44, n.9, Sep, p.2078-83. 2001.

Lemos, H. P., R. Grespan, et al. Prostaglandin mediates IL-23/IL-17-induced neutrophil migration in inflammation by inhibiting IL-12 and IFN γ production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.106, n.14, Apr 7, p.5954-9. 2009.

Lerner, E. A., J. M. Ribeiro, et al. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *J Biol Chem*, v.266, n.17, Jun 15, p.11234-6. 1991.

Lew, P. D., C. B. Wollheim, et al. Modulation of cytosolic-free calcium transients by changes in intracellular calcium-buffering capacity: correlation with exocytosis and O₂-production in human neutrophils. *J Cell Biol*, v.99, n.4 Pt 1, Oct, p.1212-20. 1984.

Ley, K., C. Laudanna, et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, v.7, n.9, Sep, p.678-89. 2007.

Li, Z., H. Jiang, et al. Roles of PLC- β 2 and - β 3 and PI3K γ in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science*, v.287, n.5455, Feb 11, p.1046-9. 2000.

Liew, F. Y. e I. B. McInnes. Role of interleukin 15 and interleukin 18 in inflammatory response. *Ann Rheum Dis*, v.61 Suppl 2, Nov, p.ii100-2. 2002.

Lima, H. C. e R. G. Titus. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. *Infect Immun*, v.64, n.12, Dec, p.5442-5. 1996.

Lloyd, A. R., A. Biragyn, *et al.* Granulocyte-colony stimulating factor and lipopolysaccharide regulate the expression of interleukin 8 receptors on polymorphonuclear leukocytes. J Biol Chem, v.270, n.47, Nov 24, p.28188-92. 1995.

Lombardi, M. S., A. Kavelaars, *et al.* Adjuvant arthritis induces down-regulation of G protein-coupled receptor kinases in the immune system. J Immunol, v.166, n.3, Feb 1, p.1635-40. 2001.

Lubberts, E. IL-17/Th17 targeting: on the road to prevent chronic destructive arthritis? Cytokine, v.41, n.2, Feb, p.84-91. 2008.

Mantovani, A., S. Sozzani, *et al.* Endothelial activation by cytokines. Ann N Y Acad Sci, v.832, Dec 15, p.93-116. 1997.

Martin, E., C. Capini, *et al.* Antigen-specific suppression of established arthritis in mice by dendritic cells deficient in NF-kappaB. Arthritis Rheum, v.56, n.7, Jul, p.2255-66. 2007.

Mbow, M. L., J. A. Bleyenbergh, *et al.* Phlebotomus papatasi sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with Leishmania major. J Immunol, v.161, n.10, Nov 15, p.5571-7. 1998.

McInnes, I. B., J. Al-Mughales, *et al.* The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. Nat Med, v.2, n.2, Feb, p.175-82. 1996.

Medzhitov, R. e C. Janeway, Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. Immunol Rev, v.173, Feb, p.89-97. 2000.

Menges, M., S. Rossner, *et al.* Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. J Exp Med, v.195, n.1, Jan 7, p.15-21. 2002.

Modlin, R. L. e T. B. Nutman. Type 2 cytokines and negative immune regulation in human infections. Curr Opin Immunol, v.5, n.4, Aug, p.511-7. 1993.

Mohr, W. Cartilage destruction via the synovial fluid in rheumatoid arthritis. J Rheumatol, v.22, n.7, Jul, p.1436-8. 1995.

Monteiro, M. C., L. G. Nogueira, *et al.* Effect of salivary gland extract of Leishmania vector, Lutzomyia longipalpis, on leukocyte migration in OVA-induced immune peritonitis. Eur J Immunol, v.35, n.8, Aug, p.2424-33. 2005.

Moore, K. W., A. O'garra, *et al.* Interleukin-10. Annu Rev Immunol, v.11, p.165-90. 1993.

Morris, R. V., C. B. Shoemaker, *et al.* Sandfly maxadilan exacerbates infection with Leishmania major and vaccinating against it protects against L. major infection. J Immunol, v.167, n.9, Nov 1, p.5226-30. 2001.

Mosmann, T. R., H. Cherwinski, *et al.* Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J

Immunol, v.136, n.7, Apr 1, p.2348-57. 1986.

Mulder, K. e I. G. Colditz. Migratory responses of ovine neutrophils to inflammatory mediators in vitro and in vivo. J Leukoc Biol, v.53, n.3, Mar, p.273-8. 1993.

Nakae, S., A. Nambu, *et al.* Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. J Immunol, v.171, n.11, Dec 1, p.6173-7. 2003.

Nathan, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*, v.6, n.3, Mar, p.173-82. 2006.

Neelamegham, S., A. D. Taylor, *et al.* Shear and time-dependent changes in Mac-1, LFA-1, and ICAM-3 binding regulate neutrophil homotypic adhesion. *J Immunol*, v.164, n.7, Apr 1, p.3798-805. 2000.

Neurath, M. F., B. Weigmann, *et al.* The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. J Exp Med, v.195, n.9, May 6, p.1129-43. 2002.

Niggli, V. Signaling to migration in neutrophils: importance of localized pathways. Int J Biochem Cell Biol, v.35, n.12, Dec, p.1619-38. 2003.

Nong, Y. H., R. G. Titus, *et al.* Peptides encoded by the calcitonin gene inhibit macrophage function. *J Immunol*, v.143, n.1, Jul 1, p.45-9. 1989.

Norsworthy, N. B., J. Sun, *et al.* Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulating interleukin-10 production. Infect Immun, v.72, n.3, Mar, p.1240-7. 2004.

Nuttall, P. A. Displaced tick-parasite interactions at the host interface. *Parasitology*, v.116 Suppl, p.S65-72. 1998.

O'garra, A. Interleukins and the immune system 1. *Lancet*, v.1, n.8644, Apr 29, p.943-7. 1989.

Oliveira, F., P. G. Lawyer, *et al.* Immunity to Distinct Sand Fly Salivary Proteins Primes the Anti-*Leishmania* Immune Response towards Protection or Exacerbation of Disease. *PLoS Negl Trop Dis*, v.2, n.4, p.e226. 2008.

Olson, T. S. e K. Ley. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.283, n.1, Jul, p.R7-28. 2002.

Oukka, M. Th17 cells in immunity and autoimmunity. Ann Rheum Dis, v.67 Suppl 3, Dec, p.iii26-9. 2008.

Piguet, P. F., G. E. Grau, *et al.* Evolution of collagen arthritis in mice is arrested by treatment with anti-tumour necrosis factor (TNF) antibody or a recombinant soluble TNF receptor. *Immunology*, v.77, n.4, Dec, p.510-4. 1992.

Podolin, P. L., B. J. Bolognese, *et al.* A potent and selective nonpeptide antagonist of CXCR2 inhibits acute and chronic models of arthritis in the rabbit. *J Immunol*, v.169,

n.11, Dec 1, p.6435-44. 2002.

Qureshi, A. A., A. Asahina, et al. Immunomodulatory properties of maxadilan, the vasodilator peptide from sand fly salivary gland extracts. *Am J Trop Med Hyg*, v.54, n.6, Jun, p.665-71. 1996.

Ramos, C. D., C. Canetti, et al. MIP-1alpha[CCL3] acting on the CCR1 receptor mediates neutrophil migration in immune inflammation via sequential release of TNF-alpha and LTB4. *J Leukoc Biol*, v.78, n.1, Jul, p.167-77. 2005.

Ribeiro, J. M. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annu Rev Entomol*, v.32, p.463-78. 1987.

Ribeiro, J. M., J. J. Sarkis, et al. Salivary apyrase of *Aedes aegypti*: characterization and secretory fate. *Comp Biochem Physiol B*, v.79, n.1, p.81-6. 1984.

Ribeiro, J. M., M. Schneider, et al. Role of salivary antihemostatic components in blood feeding by triatomine bugs (Heteroptera). *J Med Entomol*, v.35, n.4, Jul, p.599-610. 1998.

Ribeiro, J. M., O. Katz, et al. Salivary glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* contain pharmacologically active amounts of adenosine and 5'-AMP. *J Exp Biol*, v.202, n.Pt 11, Jun, p.1551-9. 1999.

Rios-Santos, F., J. C. Alves-Filho, *et al.* Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med*, v.175, n.5, Mar 1, p.490-7. 2007.

Santiago-Schwarz, F., P. Anand, et al. Dendritic cells (DCs) in rheumatoid arthritis (RA): progenitor cells and soluble factors contained in RA synovial fluid yield a subset of myeloid DCs that preferentially activate Th1 inflammatory-type responses. *J Immunol*, v.167, n.3, Aug 1, p.1758-68. 2001.

Sarkar, S. e D. A. Fox. Dendritic cells in rheumatoid arthritis. *Front Biosci*, v.10, Jan 1, p.656-65. 2005.

Sasai, M., Y. Saeki, et al. Delayed onset and reduced severity of collagen-induced arthritis in interleukin-6-deficient mice. *Arthritis Rheum*, v.42, n.8, Aug, p.1635-43. 1999.

Sato, K., A. Suematsu, *et al.* Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med*, v.203, n.12, Nov 27, p.2673-82. 2006.

Schaible, H. G., A. Ebersberger, *et al.* Mechanisms of pain in arthritis. *Ann N Y Acad Sci*, v.966, Jun, p.343-54. 2002.

Scola, M. P., S. D. Thompson, et al. Interferon-gamma:interleukin 4 ratios and associated type 1 cytokine expression in juvenile rheumatoid arthritis synovial tissue. *J Rheumatol*, v.29, n.2, Feb, p.369-78. 2002.

Sha'afi, R. I., J. Shefcyk, *et al.* Is a rise in intracellular concentration of free calcium necessary or sufficient for stimulated cytoskeletal-associated actin? J Cell Biol, v.102, n.4, Apr, p.1459-63. 1986.

Shields, J. M. e W. S. Haston. Behaviour of neutrophil leucocytes in uniform concentrations of chemotactic factors: contraction waves, cell polarity and persistence. J Cell Sci, v.74, Mar, p.75-93. 1985.

Simon, S. I. e C. E. Green. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. Annu Rev Biomed Eng, v.7, p.151-85. 2005.

Smith, M. J., E. L. Berg, *et al.* A direct comparison of selectin-mediated transient, adhesive events using high temporal resolution. Biophys J, v.77, n.6, Dec, p.3371-83. 1999.

Sohen, S. [Mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis]. Clin Calcium, v.13, n.2, Feb, p.154-7. 2003.

Sutton, C., C. Brereton, *et al.* A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. J Exp Med, v.203, n.7, Jul 10, p.1685-91. 2006.

Szabo, S. J., B. M. Sullivan, *et al.* Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. Annu Rev Immunol, v.21, p.713-58. 2003.

Tak, P. P. e B. Bresnihan. The pathogenesis and prevention of joint damage in rheumatoid arthritis: advances from synovial biopsy and tissue analysis. Arthritis Rheum, v.43, n.12, Dec, p.2619-33. 2000.

Targett, G. A. Parasites, arthropod vectors, and immune responses. Parasite Immunol, v.28, n.4, Apr, p.117-9. 2006.

Taylor, A. D., S. Neelamegham, *et al.* Molecular dynamics of the transition from L-selectin- to beta 2-integrin-dependent neutrophil adhesion under defined hydrodynamic shear. Biophys J, v.71, n.6, Dec, p.3488-500. 1996.

Teixeira, C. R., M. J. Teixeira, *et al.* Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. J Immunol, v.175, n.12, Dec 15, p.8346-53. 2005.

Theodos, C. M. e R. G. Titus. Salivary gland material from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* has an inhibitory effect on macrophage function *in vitro*. Parasite Immunol, v.15, n.8, Aug, p.481-7. 1993.

Thomson, A. W. e P. D. Robbins. Tolerogenic dendritic cells for autoimmune disease and transplantation. Ann Rheum Dis, v.67 Suppl 3, Dec, p.iii90-6. 2008.

Thorbecke, G. J., R. Shah, *et al.* 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 U S A, v.89, n.16, Aug 15, p.7375-9. 1992.

Titus, R. G. e J. M. Ribeiro. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. Science, v.239, n.4845, Mar 11, p.1306-8. 1988.

Titus, R. G., C. M. Theodos, et al. Interactions between *Leishmania major* and macrophages. Immunol Ser, v.60, p.437-59. 1994.

Titus, R. G., J. V. Bishop, *et al.* The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. Parasite Immunol, v.28, n.4, Apr, p.131-41. 2006.

Trentham, D. E., A. S. Townes, et al. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. J Exp Med, v.146, n.3, Sep 1, p.857-68. 1977.

Trinchieri, G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. Annu Rev Immunol, v.13, p.251-76. 1995.

Valenzuela, J. G., M. Garfield, *et al.* Identification of the most abundant secreted proteins from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, vector of *Leishmania chagasi*. J Exp Biol, v.207, n.Pt 21, Oct, p.3717-29. 2004.

Valenzuela, J. G., Y. Belkaid, *et al.* The salivary apyrase of the blood-sucking sand fly *Phlebotomus papatasi* belongs to the novel Cimex family of apyrases. J Exp Biol, v.204, n.Pt 2, Jan, p.229-37. 2001.

Van Duivenvoorde, L. M., W. G. Han, *et al.* Immunomodulatory dendritic cells inhibit Th1 responses and arthritis via different mechanisms. J Immunol, v.179, n.3, Aug 1, p.1506-15. 2007.

Veldhoen, M., R. J. Hocking, et al. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. Immunity, v.24, n.2, Feb, p.179-89. 2006.

Vieira, S. M., H. P. Lemos, *et al.* A crucial role for TNF-alpha in mediating neutrophil influx induced by endogenously generated or exogenous chemokines, KC/CXCL1 and LIX/CXCL5. Br J Pharmacol, v.158, n.3, Oct, p.779-89. 2009.

Vincenti, F. Costimulation blockade in autoimmunity and transplantation. J Allergy Clin Immunol, v.121, n.2, Feb, p.299-306; quiz 307-8. 2008.

Vroon, A., M. S. Lombardi, *et al.* Changes in the G-protein-coupled receptor desensitization machinery during relapsing-progressive experimental allergic encephalomyelitis. J Neuroimmunol, v.137, n.1-2, Apr, p.79-86. 2003.

Wagner, J. G. e R. A. Roth. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. Pharmacol Rev, v.52, n.3, Sep, p.349-74. 2000.

Wallace, P. J., R. P. Wersto, *et al.* Chemotactic peptide-induced changes in neutrophil

actin conformation. J Cell Biol, v.99, n.3, Sep, p.1060-5. 1984.

Warburg, A., E. Saraiva, *et al.* Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, v.345, n.1312, Jul 29, p.223-30. 1994.

Winstel, R., S. Freund, *et al.* Protein kinase cross-talk: membrane targeting of the beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C. Proc Natl Acad Sci U S A, v.93, n.5, Mar 5, p.2105-9. 1996.

Wipke, B. T. e P. M. Allen. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. J Immunol, v.167, n.3, Aug 1, p.1601-8. 2001.

Wong, H. Y. Neural mechanisms of joint pain. Ann Acad Med Singapore, v.22, n.4, Jul, p.646-50. 1993.

Wooley, P. H., J. D. Whalen, *et al.* The effect of an interleukin-1 receptor antagonist protein on type II collagen-induced arthritis and antigen-induced arthritis in mice. Arthritis Rheum, v.36, n.9, Sep, p.1305-14. 1993.

Yang, S., W. Li, *et al.* IL-10 gene modified dendritic cells induced antigen-specific tolerance in experimental autoimmune myocarditis. Clin Immunol, v.121, n.1, Oct, p.63-73. 2006.

Yu, J. J., M. J. Ruddy, *et al.* An essential role for IL-17 in preventing pathogen-initiated bone destruction: recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals. Blood, v.109, n.9, May 1, p.3794-802. 2007.

Zeilhofer, H. U. Prostanoids in nociception and pain. Biochem Pharmacol, v.73, n.2, Jan 15, p.165-74. 2007.

Zer, R., I. Yaroslavski, *et al.* Effect of sand fly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. Int J Parasitol, v.31, n.8, Jun, p.810-4. 2001.

Zigmond, S. H., J. L. Slonczewski, *et al.* Polymorphonuclear leukocyte locomotion is insensitive to lowered cytoplasmic calcium levels. Cell Motil Cytoskeleton, v.9, n.2, p.184-9. 1988.

_____. Decreased expression and activity of G-protein-coupled receptor kinases in peripheral blood mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis. Faseb J, v.13, n.6, Apr, p.715-25. 1999.

_____. Specificity of cell adhesion in development: the cadherin superfamily. Curr Opin Genet Dev, v.2, n.4, Aug, p.621-4. 1992b.

_____. The role of vector saliva in transmission of arthropod-borne disease. Parasitol Today, v.6, n.5, May, p.157-60. 1990.

ANEXOS

**The yellow LJM 111 protein accounts to anti-inflammatory effect of
Lutzomyia longipalpis Salivary Gland Extract (SGE)
in experimental arthritis.**

¹Renata Grespan, ¹Henrique P. Lemos, ²Carlo J. F. de Oliveira, ²Vanessa Carregaro,
¹Waldiceu A. Verri Jr, ³Clarissa Teixeira, ³José Marcos Ribeiro, ³Jesus G. Valenzuela,
¹Fernando Q. Cunha.

¹Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of Sao Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil. ²Department of Immunology and Biochemistry, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of Sao Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil. ³Laboratory of Malaria and Vector Research, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Rockville, Maryland, USA.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Several studies have pointed out the immunomodulatory properties of the Salivary Gland Extract (SGE) from *Lutzomyia longipalpis*, including the inhibitory actions of SGE in OVA-induced neutrophil migration in immunized mice. We aimed to identify the SGE component (s) responsible for its effect on OVA-induced neutrophil migration and to evaluate the role of component (s) in the antigen-induced arthritis (AIA) model. **METHODS:** We evaluated neutrophil migration (NM) to peritoneal cavity of OVA-challenged immunized mice pretreated with plasmids coding for proteins from SGE. We tested the antiarthritis activities of SGE and the recombinant LJM111 salivary protein (rLJM111) by measuring the mechanical hypernociception using an electronic pressure meter, the NM into synovial cavity and the levels of IL-17, TNF-alpha and IFN-gamma released by lymph nodes cells stimulated with mBSA using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Additionally, it was evaluated the effect of SGE and LJM111 protein on co-stimulatory molecules expression (MHC-II and CD-86), by flow cytometry and TNF-alfa and IL-10 production, by ELISA, in bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) stimulated with LPS. **RESULTS:** We identified one plasmid expressing the protein LJM 111 that prevented NM in OVA-challenged immunized mice. Furthermore, both SGE and rLJM111 inhibited NM and pain sensitivity in AIA and reduced mBSA-induced IL-17, TNF-alpha and IFN-gamma production by lymph nodes cells. SGE and LJM111 also reduced MHC-II and CD-86 expression and TNF- α production whereas increased IL-10 release by LPS-stimulated BMDCs. **CONCLUSION:** These results showed that SGE and rLJM111 reduced inflammatory parameters in AIA model and thus, peptides obtained from sequences of this protein can be envisaged as potential therapeutic immunointervention in the rheumatoid arthritis.

INTRODUCTION

It has been shown that Salivary Gland Extract (SGE) from *Lutzomyia longipalpis* enhances *Leishmania* infection in mice (1) not by direct effect on the parasite virulence but rather by affecting host immune defenses (2-4). SGE contains a variety of potent pharmacologically active substances that interfere with host homeostatic, inflammatory, and immune responses (5, 6). Several studies demonstrated that *Phlebotomus papatasi* and *L. longipalpis* saliva inhibit IFN-gamma and enhance IL-4 and IL-10 secretion by Th1 and Th2 lymphocytes, respectively (7-9). We previously demonstrated that SGE inhibited OVA-induced neutrophil migration in immunized mice, apparently as a consequence of the inhibition of TNF- α and LTB₄ release (10).

At the moment, few components present in SGE of sand flies have been studied. It has been described that *L. Longipalpis* saliva contains apyrase, a potent anti-platelet aggregation agent (11), and adenosine deaminase, an enzyme which promotes the hydrolysis of adenosine, an immunomodulatory molecule (12, 13). Another important protein is maxadilan that besides its potent vasodilator effect, it also presents immunomodulatory effects by increasing *in vitro* secretion of IL-10 and IL-6, while inhibits TNF- α production in macrophages and reduces CD80/86 expression on murine dendritic cells (14-17). However, maxadilan does not inhibit neutrophil migration induced by OVA in sensitized mice (10). In recent years, Valenzuela and colleagues (18) identified and isolated the most abundant salivary proteins from the sand fly *L. Longipalpis* using high-throughput approaches based on massive cDNA sequencing, proteomics and bioinformatic efforts. Thus, these studies have enabled the investigation of which SGE constituents are responsible for its anti-inflammatory activities.

Rheumatoid Arthritis (RA) is an inflammatory chronic systemic autoimmune disorder, affecting mainly joints, with the crucial involvement of neutrophils, T cells, B cells, macrophages-like and fibroblasts-like synoviocytes (19, 20), besides cytokines as TNF-alpha, IL-17 and IFN-gamma (21, 22). These cytokines activate immune and structural cells in the joints, thus, promoting them to release products that lead to tissue destruction (23).

Among the different experimental arthritis models, the Antigen-Induced Arthritis (AIA) model is a useful model to investigate new effective therapies, since it shows similar histopathologic and immune features to human RA (24, 25). In this way, the present study was designed to examine the effect and the mechanism of SGE and its components in experimental AIA model.

METHODS

Animals. Male or female BALB/c, C57/BL6, HePas, HeJ weighing 18–22 gm each were housed in temperature-controlled rooms (22–25°C) in the animal facility of the School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, and received water and

food ad libitum. The male and female HePas, HeJ mice were bred in the animal facility of the School of Medicine of Ribeirão Preto, using breeding mice obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME).

Procedures for immunization with OVA or mBSA. On day 0, mice received a single s.c. injection of OVA (100 µg) or mBSA (500ug) in 0.2mL of an emulsion containing 0.1mL of PBS and 0.1 mL of complete Freund's adjuvant (CFA). The mice were given booster injections of OVA/mBSA in incomplete Freund's adjuvant (IFA) on days 7 and 14.

Challenge with OVA in sensitized mice. On day 21 immunized animals were challenged with injection of saline or OVA (10 µg/animal; intra-peritoneal (i.p.) route) dissolved in 200 µl of PBS, and neutrophil migration was determined as described below.

Induction of antigen induced-arthritis (AIA). Immunized BALB/c mice were challenged with mBSA (10 µg/cavity), intraarticularly, dissolved in 10 µl of PBS. Immunized mice were challenged with mBSA or with PBS. Mice were killed 24 hours after intraarticular injections, and neutrophil migration was determined as described below.

Construction of DNA Plasmids Coding for proteins from SGE and its treatment in immunized mice. DNA plasmids coding for salivary proteins from SGE were cloned into the VR2001-TOPO vector and purified as described (26). In order to screening which DNA plasmids containing genes codifying for secreted proteins mimics the anti-inflammatory effect of SGE, groups of plasmids were prepared based in the coding proteins as following: **Group 1:** coding for LJL35, LJM17, LJL08, LJL38, LJM04, LJS192, LJM19, LJL91, LJL15; **Group 2:** coding for LJM11, LJL34, LJL13 and LJL23; **Group 3:** LJM10, LJL143, LJS142, LJL17, LJM06 and LJL04; **Group 4:** coding for LJM114, LJM111, LJM78, LJS238, LJS169 and LJS105 and **Group 5:** coding for LJL09, LJM26, LJS03, LJL124, LJL138, LJS138, LJS193 and LJS201. OVA- or mBSA-immunized mice were treated with 50 µg of these groups of DNA plasmids (intramuscular route) in 50 µl of saline 48 hours before OVA challenge. Empty plasmids were injected as control.

Expression and HPLC purification of His-tagged *L. longipalpis* salivary proteins. Recombinant proteins were produced by transfecting FreeStyle™ 293-F cells (Invitrogen) with 70µg of purified plasmid following the manufacturer's recommendations (Invitrogen). After 72h, transfected cell cultures were harvested and the supernatant filtered through a 0.45 µM filter unit and concentrated to 15 ml in an AmiconR concentrator device (Millipore Corp., Bedford, MA, USA) in the presence of Buffer A (20 mM NaH₂PO₄, 20 mM Na₂HPO₄, pH 7.4 and 500 mM NaCl). A HiTrap™ Chelating HP column (GE Healthcare) was charged with 5 ml of Ni₂SO₄ 0.1M. The concentrated recombinant protein was then added to the HiTrap Chelating HP column using a vacuum manifold (Alltech associates, Inc). The column was then connected to a Summit station HPLC system (Dionex) consisting of a P680 HPLC pump and a PDA-100 photodiode array detector. The column was equilibrated for 30 minutes with Buffer A

at 1 ml/min and following equilibration of baseline the following gradient was used to elute the protein: Minute 0-10 , 100% Buffer A; minute 10-20, 0% buffer A, 100% Buffer B (20 mM NaH₂PO₄, 20 mM Na₂HPO₄, pH 7.4, 500 mM NaCl and 50 mM imidazole); minute 20-30 100%B; minute 30-60 a gradient of 100% B to 100%C (20 mM NaH₂PO₄, 20 mM Na₂HPO₄, pH 7.4, 500 mM NaCl and 500 mM imidazole); minute 60-70 100% C. Eluted proteins were detected at 280 nm and the eluted fractions were collected every minute on a 96 well microtiter plate using a Foxy 200 fraction collector. An aliquot (5 ul) of all fractions were blotted on a nitrocellulose paper and the blot was blocked with 5% milk for 1 hour and incubated for 1 hr with anti-saliva antibodies and 1 hour with anti-mouse Ap conjugated secondary antibody. Positive fractions were developed with Watern Blue[®] stabilized substrate for alkaline phosphatase (Promega). An aliquot (5 ul) of positive fractions were run on SDS and silver stained using SilverQuest[™] (Invitrogen). Imidazole was removed from the positive fractions by dialysis against PBS, pH 7.4.

SGE or rLJM111 treatments. Immunized mice were treated with SGE (0.3; 1 or 3 gland/10ul; i.v. route) or rLJM111 (30, 100 or 300 ng/mouse; i.v. route) 24h or 15 min before the challenge with mBSA, respectively.

In vivo neutrophil migration analysis. At the end of the experimental period, the mice were euthanized and the total leukocytes which migrated to the peritoneal cavity were harvested by an injection of 3 ml of PBS plus EDTA 1 mM at 6h post stimulus. In mBSA-challenge mice, the articular cavities were washed twice with 5 µl PBS/EDTA, and then diluted to a final volume of 100 µl with PBS/EDTA to evaluate leukocyte migration at the indicated times. Total cell counts were performed in a cell counter (ACT; Beckman Coulter, Miami, FL), and differential cell counts (100 cells total) were performed on cytocentrifuge slides (Cytospin 3; Shandon, Pittsburgh, PA) with Rosenfeld stain. Differential cell counts were performed with a light microscope (Zeiss, Wetzlar, Germany), and the results were expressed as the number of neutrophils per cavity.

Articular hypernociception evaluation. The articular hypernociception of the femur-tibial joint was evaluated as previously described (Pinto et al., 2009). A nonnociceptive tip probe with area size of 4.15 mm² was used. An increasing perpendicular force was applied to the central area of the hind paw to induce flexion of the femur-tibial joint, followed by paw withdrawn. The electronic pressure-meter apparatus automatically recorded the intensity of the force applied when the paw was withdrawn. The test was repeated until 3 subsequently consistent measurements (i.e. the variation among these measurements was less than 1 g). The results were expressed as the flexion elicited withdrawal threshold in grams (g).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Levels of IL-17, TNF- α and IFN- γ were quantified *in vitro* from popliteal and inguinal lymph nodes cells (5×10^5 cells/well) pre-treated

or not with SGE (3 gland pairs/ml) or rLJM111 protein (2.7 µg/ml) and stimulated with mBSA (100 µg/ml) for 36 hours by ELISA. The results are expressed as picograms per milliliter.

DC generation- Dendritic cells (DC) were generated *in vitro* from bone marrow (BM) cells from 6- to 8-wk-old wild type BALB/c as previously described (27). Briefly, femurs and tibias were flushed with RPMI-1640 (Gibco-BRL Life Technologies, Grand Island, NY) to release the BM cells that were cultured in 24-well-culture plates in RPMI-1640 (Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 100 µg/ml of penicillin, 100 µg/ml of streptomycin, 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol (all from Sigma), murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (30 ng/ml) and IL-4 (10 ng/ml) (Peprotech, Rocky Hill, NJ). On days 3 and 6 the supernatants were gently removed and replaced with the same volume of supplemented medium. On day 9, the non-adherent cells were collected to eliminate the residual macrophage contamination. Flow cytometric evaluation of purified DC shows that in average 85% of cells express CD11c^{interm or high} (marker of DC).

LPS-induced DC maturation. DC (1×10^6 /ml) RPMI 1640 supplemented with 10% FBS was overnight incubated with SGE (3 gland pairs/ml), rLJM111 (2.7 µg/ml) or medium at 37°C in 5% CO₂ and then followed by stimulation with or without LPS (1 µg/ml) for 24h. The cells were then harvested and surface expression characterized by flow cytometry using antibodies against MHC class-II and CD86 conjugated to PE or FITC, as well as isotype controls. Cytokines levels were measured into supernatant of BMDC culture by ELISA assay.

Statistical analysis. Data are reported as the mean ± SEM and are representative of 2 or 3 separate experiments. The means of different treatments were compared by analysis of variance with Bonferroni adjustment for multiple comparisons or by Student's t-test. P values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

The sand fly salivary protein LJM111 mimics the the antiinflammatory effects of the saliva extract

SGE inhibited neutrophil migration to peritoneal cavity induced by OVA in immunized mice (Fig. 1A), confirming previous data published by our group (10). Aiming to identify the salivary proteins responsible for the anti-inflammatory effect we tested 5 groups of DNA plasmids coding for 5 to 7 sand fly secreted salivary proteins. Pre-treatment of OVA-immunized mice with groups 2, 3 and 4 inhibited neutrophil migration into peritoneal cavity induced by OVA-challenge (Fig. 1B). We then evaluated individually the six different plasmids in group 4 (LJM 114, LJM 111, LJM 78, LJS 238, LJS 169 and LJS 105). Only the plasmid coding for LJM111 in group 4 inhibited neutrophil migration induced by OVA in immunized mice (Fig. 1C). Plasmids coding for the proteins LJM 34 from group 2 and LJS 142 from group 3 also

inhibited neutrophil recruitment (data not shown). In order to verify the activity observed on the plasmid coding for LJM111 protein, we produced the recombinant protein LJM111 (rLJM111) in mammalian cells (data not shown). We were not able to express the recombinant proteins LJL34 or LJS142.

SGE and rLJM111 inhibited the neutrophil migration to articular cavity (Fig. 2A) and reduced the hypernociception induced by mBSA-challenge in immunized mice (Fig. 2B).

Mechanism by which SGE and rLJM111 reduce inflammatory parameters in immunized mice

As pro-inflammatory cytokines are clearly involved in neutrophil recruitment and mechanical hypernociception (28, 29), we investigated if SGE and rLJM111 can limit the release of pro-inflammatory cytokines in lymph node cells of immunized mice stimulated with mBSA. SGE and rLJM111 inhibited IL-17, TNF- α and IFN- γ production by lymph nodes cells induced by mBSA *in vitro* (Fig. 3A). Thereafter, we sought to investigate how SGE and LJM 111 reduce the cytokine release. It was observed that both SGE and rLJM111 inhibited the expression of MHC-II and CD-86 in BMDCs stimulated by LPS (Fig. 3B). Additionally, SGE and rLJM111 reduced TNF- α levels and increased IL-10 levels in supernatant of cultured BMDC stimulated with LPS (Fig. 3C).

DISCUSSION

It has been showed that sand fly vector saliva significantly enhance the infectivity of *L. major* promastigotes forms in BALB/c mice (1, 30) by modulate host immune response through enhancement of IL-4 Th2 cytokine and inhibition of the production of Th1 cytokines (8, 9). Moreover, SGE from *L. longipalpis* induces an increase in macrophage recruitment (31) that, without Th1 activation signals, promotes the proliferation of the invading organisms. Accordingly, saliva from *P. papatasi* not only attracts macrophages but also enhances infection by *L. donovani* in these cells, resulting in increased parasite load (32). A lack of macrophage recruitment has also been related to failure of lesion enlargement in an immunodeficient murine model (33). Considering the clear SGE ability to regulate immune responses and the understanding of an wide variety of the pathogenic mechanisms involved in auto-immune diseases provided by studies conducted in experimental models and in patients, herein, we investigated if sand fly SGE could have antiinflammatory effects in an experimental arthritis model. Our results show that SGE strongly reduce neutrophil migration and pain sensitivity in the AIA model. Importantly this experimental models has several features observed in the actual RA disease.

As SGE has several components, we wanted to identify the component (s) responsible for these effects in experimental AIA. Valenzuela and colleagues (18) identified the most abundant secreted proteins from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, thus,

providing the experimental conditions to determine the proteins which could be promoting these SGE effects. Herein, we reported for the first time that using an adequate protocol of treatment of mice with a plasmid containing a gene that codifies for the salivary protein LJM111, inhibited neutrophil migration to peritoneal cavity in OVA-challenged immunized mice. Extending such finding, the recombinant protein LJM111 also reduced neutrophil recruitment and pain sensitivity in AIA. This protein is a novel protein belonging to the family of yellow-related protein of unknown function (18), and similar to *Ae. aegypti* midgut dopachrome conversion enzyme (34) and *D. melanogaster* yellow protein (35). It is noteworthy that previous studies from our laboratory have discarded Maxadilan, a powerful vasodilatory peptide with immunomodulatory properties (14, 36, 37) present in SGE, as the protein responsible for these effects since, maxadilan did not reproduce the effects of SGE in inhibiting neutrophil migration in OVA-challenged immunized mice (10).

DCs play a central role in initiation of autoimmunity through their capacity to present self antigens to T cells (38-40). This role may be dependent on cytokine production and expression of co- and stimulatory surface molecules by these cells during antigen presentation (38, 41, 42). As demonstrated in figure 3B and C, SGE and rLJM111 modulate the phenotypic and functional maturation of DCs. Our results show that SGE and rLJM111 impair the complete maturation of DCs stimulated with LPS, leading to increased IL-10 production and reduced synthesis of TNF- α . This profile of cytokine production was accompanied by an inhibited expression of MHC-II and CD86. These results are of great interest since immature or incompletely matured DCs can prevent autoimmunity (40, 41, 43). Previous reports have demonstrated that injections of incomplete-matured DCs are able to induce IL-10 producing CD4⁺ T cells and to prevent EAE in mice (44). DCs overexpressing IL-10 induced antigen-specific tolerance in experimental autoimmune myocarditis (45). Moreover, TNF- α can improve functional maturation of DCs, selectively stimulating their capacity to induce Th1 responses, while IL-10 is widely known to be an immunosuppressive cytokine (46-48).

In line with these results, we also demonstrate that cells obtained from lymph nodes of immunized mice and treated with SGE or rLJM111 stimulated with mBSA have a reduced production of IL-17, TNF- α and IFN- γ cytokines (Figure 3 A). In fact, IL-17- and IFN- γ -secreting T cells have been associated with the induction of many autoimmune diseases (49, 50) and DCs play a pivotal role in these processes (38, 40). IL-17 is directly implicated in the severity of the cartilage and bone damage in an experimental model of rheumatoid arthritis (51). Wild type mice develop a more pronounced collagen-induced arthritis than IL-17-deficient animals (52). On the other hand, IL17-deficient animals develop experimental autoimmune encephalomyelitis with delayed onset and diminished severity (53). As IL-17, IFN- γ has been implicated in the development of autoimmunity. Mice deficient for the transcription factors involved in the differentiation of IFN- γ -secreting T cells, such as T-bet and STAT-4, are

resistant to the development of EAE (54, 55). Taken together, these results suggests that one of the possible mechanisms used by SGE and rLJM111 to inhibit the inflammatory response induced by mBSA could be by the modulation of DC function and maturation. However, future studies must be done to test this possibility.

In conclusion, we showed that LJM111 protein, present in SGE, accounts to anti-inflammatory activity in AIA model, thus contributing to a future development of new drugs to treat inflammatory disease, such as RA.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Giuliana Bertozzi, Júlio Anselmo Siqueira, Fabíola Leslie Mestriner, Ana Kátia dos Santos, and Diva Amabile Montanha de Sousa for technical assistance.

REFERENCES

1. Titus, R.G., and J.M. Ribeiro. 1988. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science (New York, N.Y)* 239:1306-1308.
2. Charlab, R., J.G. Valenzuela, E.D. Rowton, and J.M. Ribeiro. 1999. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:15155-15160.
3. Theodos, C.M., J.M. Ribeiro, and R.G. Titus. 1991. Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. *Infection and immunity* 59:1592-1598.
4. Theodos, C.M., and R.G. Titus. 1993. Salivary gland material from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* has an inhibitory effect on macrophage function in vitro. *Parasite immunology* 15:481-487.
5. Ribeiro, J.M. 1989. Vector saliva and its role in parasite transmission. *Experimental parasitology* 69:104-106.
6. Titus, R.G., and J.M. Ribeiro. 1990. The role of vector saliva in transmission of arthropod-borne disease. *Parasitology today (Personal ed)* 6:157-160.
7. Lima, H.C., and R.G. Titus. 1996. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. *Infection and immunity* 64:5442-5445.
8. Norsworthy, N.B., J. Sun, D. Elnaïem, G. Lanzaro, and L. Soong. 2004. Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulating interleukin-10 production. *Infection and immunity* 72:1240-1247.
9. Mbow, M.L., J.A. Bleyenbergh, L.R. Hall, and R.G. Titus. 1998. *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*. *J Immunol* 161:5571-5577.
10. Monteiro, M.C., L.G. Nogueira, A.A. Almeida Souza, J.M. Ribeiro, J.S. Silva, and F.Q. Cunha. 2005. Effect of salivary gland extract of *Leishmania* vector, *Lutzomyia longipalpis*, on leukocyte migration in OVA-induced immune peritonitis. *European journal of immunology* 35:2424-2433.
11. Valenzuela, J.G., Y. Belkaid, E. Rowton, and J.M. Ribeiro. 2001. The salivary apyrase of the blood-sucking sand fly *Phlebotomus papatasi* belongs to the novel Cimex family of apyrases. *The Journal of experimental biology* 204:229-237.
12. Charlab, R., E.D. Rowton, and J.M. Ribeiro. 2000. The salivary adenosine deaminase from the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Experimental parasitology* 95:45-53.
13. Hasko, G., C. Szabo, Z.H. Nemeth, V. Kvetan, S.M. Pastores, and E.S. Vizi. 1996. Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF-alpha, and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. *J Immunol* 157:4634-4640.
14. Soares, M.B., R.G. Titus, C.B. Shoemaker, J.R. David, and M. Bozza. 1998. The vasoactive peptide maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF-alpha and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor. *J Immunol* 160:1811-1816.

15. Bozza, M., M.B. Soares, P.T. Bozza, A.R. Sato, T.G. Diacovo, F. Brombacher, R.G. Titus, C.B. Shoemaker, and J.R. David. 1998. The PACAP-type I receptor agonist maxadilan from sand fly saliva protects mice against lethal endotoxemia by a mechanism partially dependent on IL-10. *European journal of immunology* 28:3120-3127.
16. Brodie, T.M., M.C. Smith, R.V. Morris, and R.G. Titus. 2007. Immunomodulatory effects of the *Lutzomyia longipalpis* salivary gland protein maxadilan on mouse macrophages. *Infection and immunity* 75:2359-2365.
17. Wheat, W.H., K.E. Pauken, R.V. Morris, and R.G. Titus. 2008. *Lutzomyia longipalpis* salivary peptide maxadilan alters murine dendritic cell expression of CD80/86, CCR7, and cytokine secretion and reprograms dendritic cell-mediated cytokine release from cultures containing allogeneic T cells. *J Immunol* 180:8286-8298.
18. Valenzuela, J.G., M. Garfield, E.D. Rowton, and V.M. Pham. 2004. Identification of the most abundant secreted proteins from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, vector of *Leishmania chagasi*. *The Journal of experimental biology* 207:3717-3729.
19. Firestein, G.S. 2003. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 423:356-361.
20. Harris, E.D., Jr. 1990. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *The New England journal of medicine* 322:1277-1289.
21. Issekutz, A.C., A. Meager, I. Otterness, and T.B. Issekutz. 1994. The role of tumor necrosis factor- α and IL-1 in polymorphonuclear leucocyte and T lymphocyte recruitment to joint inflammation in adjuvant arthritis. *Clinical and experimental immunology* 97:26-32.
22. Notley, C.A., J.J. Inglis, S. Alzabin, F.E. McCann, K.E. McNamee, and R.O. Williams. 2008. Blockade of tumor necrosis factor in collagen-induced arthritis reveals a novel immunoregulatory pathway for Th1 and Th17 cells. *The Journal of experimental medicine* 205:2491-2497.
23. Romas, E., M.T. Gillespie, and T.J. Martin. 2002. Involvement of receptor activator of NF- κ B ligand and tumor necrosis factor- α in bone destruction in rheumatoid arthritis. *Bone* 30:340-346.
24. Brackertz, D., G.F. Mitchell, M.A. Vadas, I.R. Mackay, and J.F. Miller. 1977. Studies on antigen-induced arthritis in mice. II. Immunologic correlates of arthritis susceptibility in mice. *J Immunol* 118:1639-1644.
25. Arend, W.P. 2001. Physiology of cytokine pathways in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 45:101-106.
26. Oliveira, F., S. Kamhawi, A.E. Seitz, V.M. Pham, P.M. Guigal, L. Fischer, J. Ward, and J.G. Valenzuela. 2006. From transcriptome to immunome: identification of DTH inducing proteins from a *Phlebotomus ariasi* salivary gland cDNA library. *Vaccine* 24:374-390.
27. Inaba, K., W.J. Swiggard, R.M. Steinman, N. Romani, and G. Schuler. 2001. Isolation of dendritic cells. *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al Chapter 3:Unit 3 7.*
28. Cunha, T.M., W.A. Verri, Jr., I.R. Schivo, M.H. Napimoga, C.A. Parada, S. Poole, M.M. Teixeira, S.H. Ferreira, and F.Q. Cunha. 2008. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. *Journal of leukocyte biology* 83:824-832.
29. Yu, J.J., M.J. Ruddy, G.C. Wong, C. Sfintescu, P.J. Baker, J.B. Smith, R.T. Evans, and S.L. Gaffen. 2007. An essential role for IL-17 in preventing pathogen-initiated bone destruction: recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals. *Blood* 109:3794-3802.
30. Warburg, A., E. Saraiva, G.C. Lanzaro, R.G. Titus, and F. Neva. 1994. Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 345:223-230.
31. Teixeira, C.R., M.J. Teixeira, R.B. Gomes, C.S. Santos, B.B. Andrade, I. Raffaele-Netto, J.S. Silva, A. Guglielmotti, J.C. Miranda, A. Barral, C. Brodskyn, and M. Barral-Netto. 2005. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. *J Immunol* 175:8346-8353.
32. Zer, R., I. Yaroslavski, L. Rosen, and A. Warburg. 2001. Effect of sand fly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. *International journal for parasitology* 31:810-814.
33. Barral-Netto, M., J.S. da Silva, A. Barral, and S. Reed. 1995. Up-regulation of T helper 2 and down-regulation of T helper 1 cytokines during murine retrovirus-induced immunodeficiency syndrome enhances susceptibility of a resistant mouse strain to *Leishmania amazonensis*. *The American journal of pathology* 146:635-642.

34. Johnson, J.K., J. Li, and B.M. Christensen. 2001. Cloning and characterization of a dopachrome conversion enzyme from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect biochemistry and molecular biology* 31:1125-1135.
35. Geyer, P.K., C. Spana, and V.G. Corces. 1986. On the molecular mechanism of gypsy-induced mutations at the yellow locus of *Drosophila melanogaster*. *The EMBO journal* 5:2657-2662.
36. Lerner, E.A., J.M. Ribeiro, R.J. Nelson, and M.R. Lerner. 1991. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *The Journal of biological chemistry* 266:11234-11236.
37. Qureshi, A.A., A. Asahina, M. Ohnuma, M. Tajima, R.D. Granstein, and E.A. Lerner. 1996. Immunomodulatory properties of maxadilan, the vasodilator peptide from sand fly salivary gland extracts. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 54:665-671.
38. Bayry, J., M. Thirion, S. Delignat, N. Misra, S. Lacroix-Desmazes, M.D. Kazatchkine, and S.V. Kaveri. 2004. Dendritic cells and autoimmunity. *Autoimmunity reviews* 3:183-187.
39. Martin, E., C. Capini, E. Duggan, V.P. Lutzky, P. Stumbles, A.R. Pettit, B. O'Sullivan, and R. Thomas. 2007. Antigen-specific suppression of established arthritis in mice by dendritic cells deficient in NF-kappaB. *Arthritis and rheumatism* 56:2255-2266.
40. Thomson, A.W., and P.D. Robbins. 2008. Tolerogenic dendritic cells for autoimmune disease and transplantation. *Annals of the rheumatic diseases* 67 Suppl 3:iii90-96.
41. van Duivenvoorde, L.M., W.G. Han, A.M. Bakker, P. Louis-Pence, L.M. Charbonnier, F. Apparailly, E.I. van der Voort, C. Jorgensen, T.W. Huizinga, and R.E. Toes. 2007. Immunomodulatory dendritic cells inhibit Th1 responses and arthritis via different mechanisms. *J Immunol* 179:1506-1515.
42. Vincenti, F. 2008. Costimulation blockade in autoimmunity and transplantation. *The Journal of allergy and clinical immunology* 121:299-306; quiz 307-298.
43. Jaen, O., S. Rulle, N. Bessis, A. Zago, M.C. Boissier, and G. Falgarone. 2009. Dendritic cells modulated by innate immunity improve collagen-induced arthritis and induce regulatory T cells in vivo. *Immunology* 126:35-44.
44. Menges, M., S. Rossner, C. Voigtlander, H. Schindler, N.A. Kukutsch, C. Bogdan, K. Erb, G. Schuler, and M.B. Lutz. 2002. Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *The Journal of experimental medicine* 195:15-21.
45. Yang, S., W. Li, W. Liu, C. Gao, B. Zhou, S. Li, Y. Li, and Y. Kong. 2006. IL-10 gene modified dendritic cells induced antigen-specific tolerance in experimental autoimmune myocarditis. *Clinical immunology (Orlando, Fla)* 121:63-73.
46. Trinchieri, G. 1995. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annual review of immunology* 13:251-276.
47. D'Andrea, A., M. Aste-Amezaga, N.M. Valiante, X. Ma, M. Kubin, and G. Trinchieri. 1993. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *The Journal of experimental medicine* 178:1041-1048.
48. Filippi, C.M., and M.G. von Herrath. 2008. IL-10 and the resolution of infections. *The Journal of pathology* 214:224-230.
49. Dardalhon, V., T. Korn, V.K. Kuchroo, and A.C. Anderson. 2008. Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. *Journal of autoimmunity* 31:252-256.
50. Oukka, M. 2008. Th17 cells in immunity and autoimmunity. *Annals of the rheumatic diseases* 67 Suppl 3:iii26-29.
51. Sato, K., A. Suematsu, K. Okamoto, A. Yamaguchi, Y. Morishita, Y. Kadono, S. Tanaka, T. Kodama, S. Akira, Y. Iwakura, D.J. Cua, and H. Takayanagi. 2006. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *The Journal of experimental medicine* 203:2673-2682.
52. Nakae, S., A. Nambu, K. Sudo, and Y. Iwakura. 2003. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* 171:6173-6177.
53. Komiyama, Y., S. Nakae, T. Matsuki, A. Nambu, H. Ishigame, S. Kakuta, K. Sudo, and Y. Iwakura. 2006. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 177:566-573.
54. Bettelli, E., B. Sullivan, S.J. Szabo, R.A. Sobel, L.H. Glimcher, and V.K. Kuchroo. 2004. Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of experimental medicine* 200:79-87.

55. Neurath, M.F., B. Weigmann, S. Finotto, J. Glickman, E. Nieuwenhuis, H. Iijima, A. Mizoguchi, E. Mizoguchi, J. Mudter, P.R. Galle, A. Bhan, F. Autschbach, B.M. Sullivan, S.J. Szabo, L.H. Glimcher, and R.S. Blumberg. 2002. The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *The Journal of experimental medicine* 195:1129-1143.

Figure 1

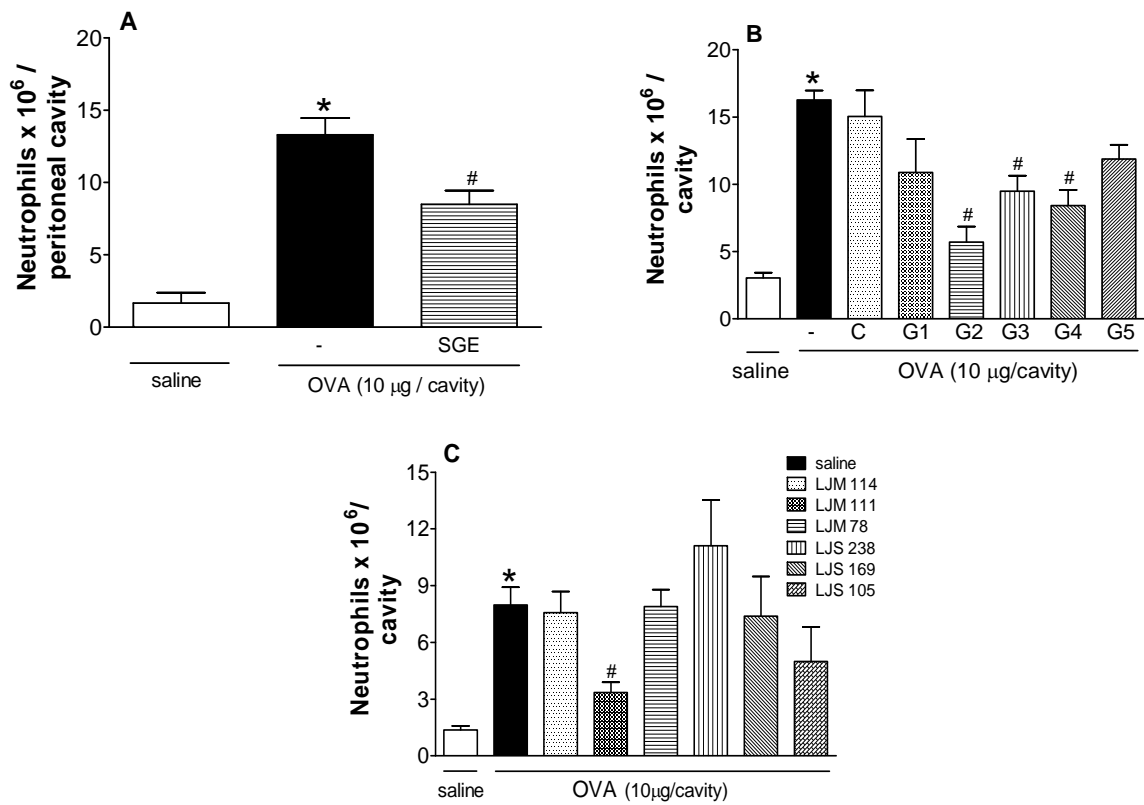


Figure 2

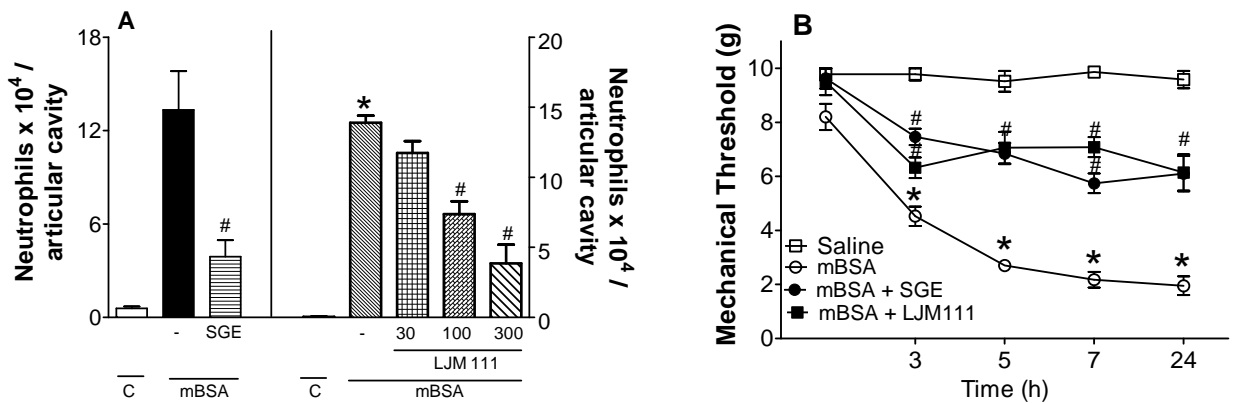
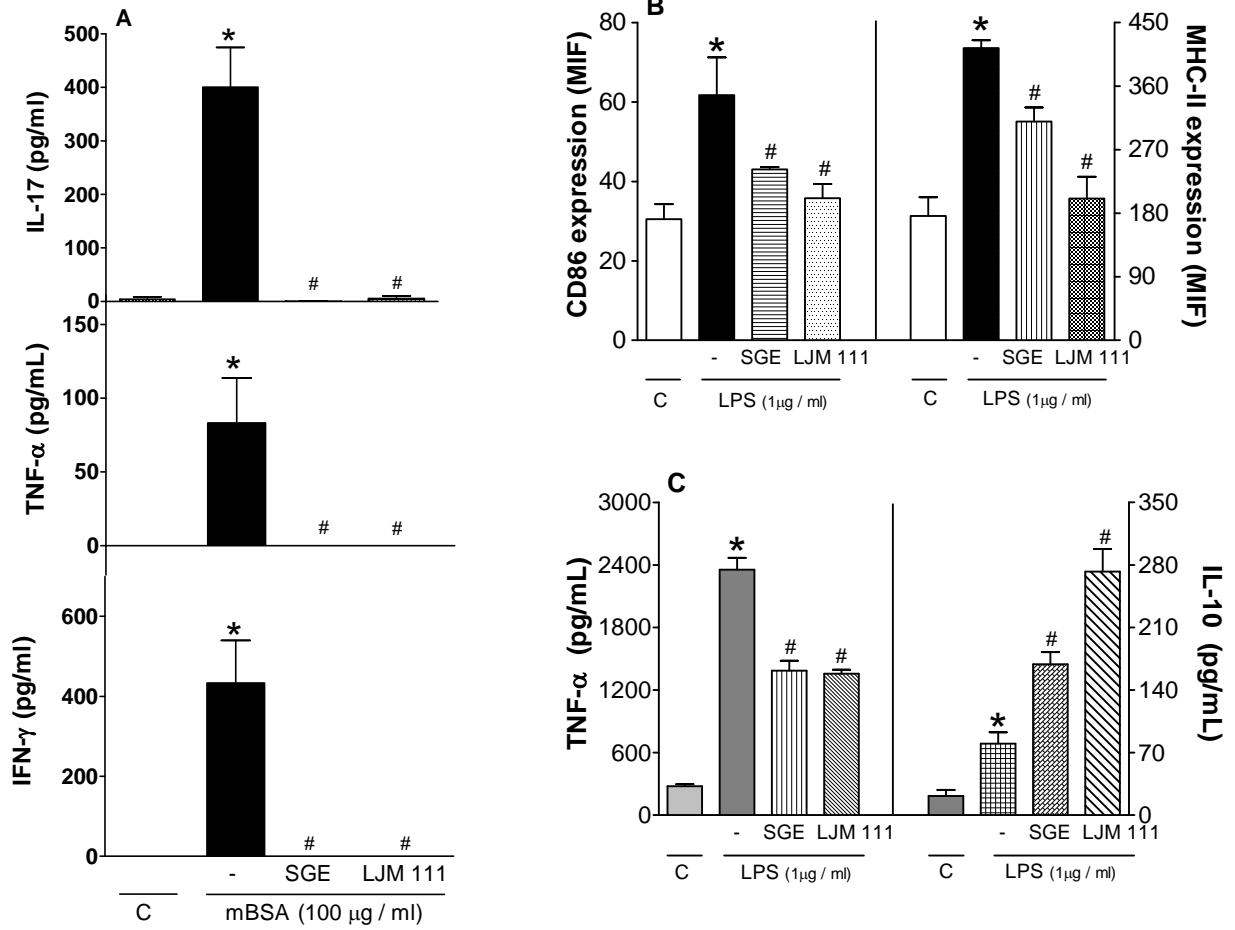


Figure 3



LEGENDS

Figure 1. SGE, plasmids codifying to groups G2, G3 and G4 of proteins and to LJM 111, present in G4, inhibited neutrophil migration induced by OVA in immunized mice. Immunized animals were treated 48 h before challenge with SGE (1gl/mouse) or saline (**A**), with control plasmid (C) or groups of plasmids - G1, G2, G3, G4 or G5 (**B**) or with plasmids codifying to indicated proteins (**C**). The neutrophil migration was determined 4 h after saline or OVA challenge in peritoneal cavity. Values are the mean and SEM of 5 mice. * P < 0.05 versus saline injected immunized mice, # P < 0.05 versus immunized mice after mBSA challenge, by analysis of variance with Bonferroni adjustment.

Figure 2. SGE and recombinant LJM 111 protein inhibited neutrophil migration and pain sensitivity on AIA model. (A) Immunized animals were treated with saline, SGE (1gl/mouse, 48 hours before) or with recombinant LJM 111 protein (30, 100 or 300 ng/mouse, 15 minutes before). Neutrophil migration to articular cavity was evaluated 24 hours after saline or mBSA (10 µg/cavity) challenge. **(B)** Prior to i.a. challenge with mBSA, immunized animals were treated with 1gl/mouse of SGE (48 hours before) or 300 ng/mouse of LJM 111 (15 minutes before). Hypernociception was evaluated at the indicated time after saline or mBSA challenge (30 µg/cavity). Values are the mean and SEM of 5 mice. * P < 0.05 versus saline injected immunized mice, # P < 0.05 versus immunized mice after mBSA challenge, by analysis of variance with Bonferroni adjustment.

Figure 3. SGE and LJM 111 inhibited inflammatory cytokines levels on lymph nodes cells and reduced CD86, MHC-II expression and TNF- α levels and enhance IL-10 levels on dendritic cells. (A) Concentrations in vitro of IL-17, TNF- α and IFN- γ in supernatant from lymph nodes cells treated or not with SGE (3 gl/ml) or protein LJM 111 (2700 ng/ml). The concentrations of cytokines were determined 36 hours after mBSA (100 µg/ml) stimulus. **(B)** Flow cytometry of CD86 and MHC-II expression and **(C)** enzyme-linked immunosorbent assay to measurement of TNF- and IL-10 levels following or not SGE (3.0 gl/ml) or LJM 111 (2700 ng/ml) treatment on dendritic cells (DC) stimulated with LPS (1µg/ml) per 24 hours. The control group (C) received only medium. * P < 0.05 versus untreated control, # P < 0.05 versus DC cells stimulated with LPS, by analysis of variance with Bonferroni adjustment.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 004/2009, sobre o projeto intitulado “*Mecanismos de ação do extrato da glândula salivar de Lutzomyia longipalpis e sua proteína LJM 111 sobre parâmetros inflamatórios em modelo de artrite experimental e sobre células obtidas de pacientes com artrite reumatóide*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Fernando de Queiroz Cunha** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de **16 de fevereiro de 2009**.

(We certify that the protocol nº 004/2009, about “*Mechanisms of action of the extract of the salivary gland of Lutzomyia longipalpis and his protein LJM 111 on inflammatory parameters in model of experimental arthritis and on obtained cells of patients with rheumatoid arthritis*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO – ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in 02/16/2009 meeting).

Ribeirão Preto, 16 de fevereiro de 2009

Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br



Ribeirão Preto, 11 de outubro de 2006

Ofício nº 2902/2006
CEP/SPC

Prezada Senhora,

O trabalho intitulado **“MECANISMOS DE AÇÃO DA PROTEÍNA LJM111 E SEUS PEPTÍDEOS SOBRE O INFLUXO DE NEUTRÓFILOS EM INFLAMAÇÃO IMUNE EXPERIMENTAL E SOBRE A EXPRESSÃO DE CITOCINAS, QUIMIOCINAS E RECEPTORES DE QUIMIOCINAS EM LINFÓCITOS OBTIDOS DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATÓIDE E ASMA BRÔNQUICA”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 235ª Reunião Ordinária realizada em 09/10/2006, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 10540/2006.

Atenciosamente.

PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora
RENATA GRESPAN
PROF. DR. FERNANDO DE QUEIRÓZ CUNHA (Orientador)
Depto. de Farmacologia – FMRP-USP
Laboratório de Inflamação

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](#)