

VENINA MARCELA DOMINICAL

**PROPRIEDADES ADESIVAS E QUIMIOTÁTICAS
DOS NEUTRÓFILOS DE PACIENTES COM
ARTRITE REUMATOIDE E A INFLUÊNCIA DE
DIFERENTES MEDICAÇÕES**



UNICAMP

CAMPINAS

2010

VENINA MARCELA DOMINICAL

**PROPRIEDADES ADESIVAS E QUIMIOTÁTICAS
DOS NEUTRÓFILOS DE PACIENTES COM
ARTRITE REUMATOIDE E A INFLUÊNCIA DE
DIFERENTES MEDICAÇÕES**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Universidade Estadual de Campinas para a Obtenção do Título de Mestre em Fisiopatologia Médica, área de concentração em Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento

Orientadora: Dra. Nicola Amanda Conran Zorzetto

Coorientador: Dr. Fernando Ferreira Costa

CAMPINAS

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

D713p Dominical, Venina Marcela
Propriedades adesivas e quimiotáticas dos neutrófilos de pacientes
com artrite reumatoide e a influência de diferentes medicações /
Venina Marcela Dominical. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientadores: Nicola Amanda Conran Zorzetto, Fernando Ferreira
Costa

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Moléculas de adesão. 2. Quimiocinas. 3. Neutrófilos. 4.
Migração. 5. Artrite reumatoide. 6. Infliximab. I. Zorzetto,
Nicola Amanda Conran. II. Costa, Fernando Ferreira. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
IV. Título.

**Título em inglês : Chemotactic and adhesive properties of neutrophils from
rheumatoid arthritis patients and influence of different treatments**

Keywords:

- Adhesion molecules
- Chemokines
- Neutrophils
- Migration
- Rheumatoid arthritis
- Infliximab

Titulação: Mestre em Fisiopatologia Médica

**Área de concentração: Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do
Desenvolvimento**

Banca examinadora:

Profa. Dra. Nicola Amanda Conran Zorzetto

Profa. Dra. Lilian Tereza Lavras Costallat

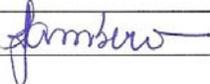
Profa. Dra. Alessandra Gambero

Data da defesa: 03-08-2010

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Venina Marcela Dominical

Orientadora(a): Prof(a). Dr(a). Nicola Amanda Conran Zorzetto

Membros:	
Professor(a) Doutor(a) Nicola Amanda Conran Zorzetto	
Professor(a) Doutor(a) Lilian Tereza Lavras Costallat	
Professor(a) Doutor(a) Alessandra Gambero	

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 03/08/2010

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter movido as coisas em meu favor e me direcionado até aqui.

À minha orientadora Nicola Conran, pela sua bondade, experiência e profissionalismo e por nos momentos em que eu estava mais desanimada, involuntariamente suas atitudes, conselhos e decisões me deram força e me fizeram ver que, como já dizia um antigo provérbio: “a quem sabe esperar, o tempo abre as portas”. Muito obrigada pela sua amizade, orientação e compreensão!

Aos meus pais e irmãos - meus melhores amigos, fiéis conselheiros e de uma sabedoria que não se conquista estudando - obrigada pelo apoio emocional e por ser a minha família!

Aos meus coorientadores: Dr. Fernando Ferreira Costa, obrigada pela oportunidade de ter trabalhado neste laboratório e ao Dr. Manoel de Barros Bértolo, que tem me auxiliado no desenvolvimento deste trabalho e no recrutamento dos pacientes utilizados neste estudo, sem sua compreensão e apoio, nenhum destes resultados seriam possíveis.

A toda equipe ambulatorial de Reumatologia do HC: Dra. Lilian, Dra. Zoraida, Dra. Ana Paula, Dr. Michel, Dr. Bruno e residentes, obrigada pela amizade, compreensão e apoio que me encorajaram a continuar buscando meus objetivos, e pela demonstração de que mais do que médicos, vocês são humanos. Obrigada também a equipe de enfermagem (Adriana, Edson, Dina, Regina) e à Cecília e Joice pelo suporte fornecido durante este tempo de estudo. Agradeço também à equipe da coleta de doadores de sangue do hemocentro da Unicamp, que sempre me acolheu bem e me ajudou na aquisição das amostras.

Agradeço a todos do laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro da Unicamp, local em que foi desenvolvida esta pesquisa, e com carinho especial a Ledian, Renata, Vanessa, Ana Flávia, Diana, Emília, Fernanda, Flávia Pallis e Tatiana Sakamoto, que têm participado mais proximamente da minha vida acadêmica, me ajudando nos experimentos, dissertações e apresentações e pelo aprendizado que obtive com vocês durante este período de mestrado.

Agradeço também e não por estar por último seja menos merecida, à Camila Almeida que desde o início deste trabalho tem me acompanhado, me ajudado quanto ao

desenvolvimento deste e servido como modelo de uma pesquisadora dedicada, inteligente, persistente e merecedora de todas as coisas boas que a pesquisa está lhe proporcionando. Camila, você foi o ponto de partida deste estudo e espero ter feito um bom trabalho!

Enfim, agradeço a todos que participaram direta ou indiretamente deste estudo e reforço que a contribuição e a presença de vocês foram muito importantes para esta concretização. Obrigada!

Este trabalho obteve auxílio científico e financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) durante o período em que foi desenvolvido.



RESUMO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica, autoimune e sistêmica, caracterizada por ser uma poliartrite simétrica, acometendo preferencialmente os punhos, mãos e pés. O processo patológico que explique a AR ainda permanece desconhecido. A indução da resposta imune, característica da doença, resulta de uma inflamação nas articulações através da infiltração de células inflamatórias que são recrutadas para o tecido sinovial, onde elas aderem às células endoteliais e transmigram através da subcamada sinovial, formando complexos que produzirão citocinas inflamatórias, contribuindo para a hiperplasia da camada sinovial e estimulando a produção de mais citocinas e enzimas capazes de degradar a matriz óssea, provocando a destruição das articulações afetadas. No líquido sinovial, os neutrófilos são o principal tipo celular, atraídos para as articulações inflamadas por quimioatraentes como LTB₄, C5a, IL-8 e TGF- β , e expostos a uma variedade de citocinas locais pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α , GM-CSF, IL-6 e IL-18. Estudos demonstraram que os neutrófilos têm papel indutor na geração de inflamação e esforços visando compreender os mecanismos exercidos pelos neutrófilos nesta doença podem ser um ponto chave para intervenções farmacológicas, promovendo a melhora dos sintomas e gravidade da doença. Diante disso, este estudo objetivou avaliar as propriedades adesivas e quimiotáticas de neutrófilos de pacientes com AR (com atividade e em remissão da doença) e verificar a influência das diferentes medicações utilizadas atualmente no tratamento da AR quanto a estas propriedades. Cento e vinte e três pacientes com artrite reumatoide em estado ativo ou de remissão da doença foram incluídos no estudo e divididos em três grupos: pacientes não tratados com drogas direcionadas para a AR (AR nt), pacientes tratados com drogas modificadoras da doença (AR dm) e pacientes tratados com agentes biológicos (AR ab); os indivíduos sem a doença foram nossos controles (Con). Os neutrófilos foram separados do sangue periférico e realizados ensaios de adesão estática e de quimiotaxia celular, ambos *in vitro*. Foi verificada a expressão gênica e de superfície de algumas proteínas envolvidas no processo adesivo. Além disso, foram quantificadas no soro e líquido sinovial destes pacientes, quimiocinas envolvidas no recrutamento de neutrófilos e a L-selectina - molécula de adesão expressa em leucócitos. Os neutrófilos da circulação periférica de pacientes com AR em atividade da doença não apresentaram

alterações quanto às propriedades adesivas em relação a indivíduos saudáveis. Ainda, neutrófilos de pacientes em terapia com agentes biológicos apresentaram aumento das propriedades migratórias comparados a pacientes AR sem tratamento. Interessantemente, os neutrófilos de pacientes com AR em remissão da doença apresentaram redução da capacidade adesiva e migratória dos neutrófilos quando na ausência de estímulo por IL-8. Apesar disso, não observamos diferenças quanto à adesão e à migração destes neutrófilos quando estimulados por esta citocina. O líquido sinovial de pacientes com AR em atividade da doença possui alto potencial quimiotático frente a neutrófilos e foram encontrados níveis elevados de IL-8 e ENA-78 tanto neste fluido, como também no sangue periférico. Há aumento da expressão gênica de L-selectina em neutrófilos de pacientes com AR em atividade da doença, mas curiosamente, não encontramos diferenças quanto à expressão desta molécula na superfície dos neutrófilos ou a sua presença no soro. Em destaque, observamos redução significativa de expressão na superfície neutrofílica de L-selectina e LFA-1 em pacientes em remissão da doença. Esses resultados sugerem que a remissão do quadro inflamatório da AR parece estar associada a alterações significantes nas principais quimiocinas atraentes de neutrófilos na circulação destes indivíduos e que são acompanhadas por modificações funcionais dos neutrófilos. Especulamos se estas características podem participar na melhora do quadro clínico em pacientes com artrite reumatoide.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease that is autoimmune and systemic, and characterized by a symmetric polyarthritis, affecting mainly the wrists, hands and feet. The pathological process that explains RA remains unknown. The induction of an immune response, characteristic of the disease, results from an inflammation of the joints through the infiltration of inflammatory cells that are recruited to the synovial tissue, where they adhere to endothelial cells and transmigrate through the synovial sublayer, forming complexes that produce inflammatory cytokines. These complexes induce hyperplasia of the synovial layer and stimulate the further production of cytokines and enzymes, leading to the degradation of the bone matrix, and resulting in the destruction of affected joints. In the synovial fluid, neutrophils are the main cell type and are attracted to the inflamed joints by chemoattractants, such as LTB₄, C5a, IL-8 and TGF- β , and exposed to a variety of local pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β , TNF - α , GM-CSF, IL-6 and IL-18. Studies have shown that neutrophils play a role in inducing the generation of inflammation, and efforts to understand the mechanisms deployed by neutrophils in this disease may be a key point for the development of pharmacological interventions to ameliorate symptoms and disease severity. Thus, this study evaluated the chemotactic and adhesive properties of neutrophils in patients with RA and the influence of different drugs, currently used in the treatment of this pathology, on these properties. One hundred and twenty-three patients with active RA or in disease remission were enrolled and divided into three groups; patients not treated with drugs specifically for RA (AR nt), patients treated with disease-modifying antirheumatic drugs (AR dm) and patients treated with biological agents (AR ab); healthy individuals were used as controls (Con). Neutrophils were separated from peripheral blood and static adhesion assays and cell chemotaxis assays were performed *in vitro*. We verified the gene and surface expression of some proteins involved in the adhesive process. Moreover, chemokines involved in the recruitment of neutrophils and L-selectin, a cellular adhesion molecule expressed in leukocytes, were quantified in the serum and synovial fluid of these patients. Neutrophils from the peripheral blood of RA patients with active disease demonstrated no difference in adhesive properties, compared to healthy subjects. Furthermore, patients on therapy with biological agents had increased

migratory properties, compared to patients without specific RA treatment. Interestingly, neutrophils from RA patients in remission of disease presented reduced adhesive and migratory capacity in the absence of stimulus. Nevertheless, no differences were observed in these properties with IL-8 stimulus. The synovial fluid of RA patients with active disease has a high chemotactic potential for neutrophils and presented significantly higher levels of IL-8 and ENA-78 in this fluid, as well as in the peripheral blood. An increased gene expression of L-selectin in RA patients with active disease was observed, but interestingly, we found no differences in surface expression or presence in the serum of this molecule. Of note, a significant decrease in the surface expression of neutrophil L-selectin and LFA-1 was observed in patients in remission of disease. Results suggest that the remission of the RA inflammatory state appears to be associated with significant alterations in major neutrophil-attracting chemokines in the circulation of individuals, contributing possibly, to neutrophils function alteration in these individuals and the consequent amelioration of the disease.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Medicação dos pacientes com artrite reumatoide utilizados neste estudo.....	62
Tabela 2: Características de controles e pacientes com artrite reumatoide com/sem atividade da doença.....	81
Tabela 3: Idade, DAS 28 e VHS de pacientes com AR em atividade, separados em grupos de acordo com o tipo de medicação	82
Tabela 4: Expressão das proteínas envolvidas na adesão celular: CD62L, LFA-1 e Mac-1 em neutrófilos de controles (Con), pacientes com artrite reumatoide (AR) em atividade (ativ) e pacientes com artrite reumatoide sem atividade (S/ativ) divididos em grupos de acordo com o tipo de medicação.....	98

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: O critério do American College of Rheumatology de 1987 para a classificação da Artrite Reumatoide - revisado (<i>Symmons, 2000, adaptado para o português</i>)	46
Quadro 2: Sequência dos primers utilizados, tamanho do fragmento amplificado e concentração ótima utilizados para amplificação dos genes das moléculas de adesão	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Características de uma articulação normal e afetada pela artrite reumatoide (Wong & Lord, 2004).	45
Figura 2: Regulação do movimento leucocitário por quimiocinas (Luster, 1998).	50
Figura 3: Papel dos neutrófilos na inflamação das articulações (Cascão <i>et al.</i>, 2010)..	52
Figura 4: Análise da eficiência de amplificação do primer da L-selectina (CD62L).	74
Figura 5: Curva de dissociação do primer da L-selectina (CD62L)	75
Figura 6: Propriedades adesivas dos neutrófilos de controles e de pacientes com artrite reumatoide	84
Figura 7: Propriedades adesivas dos neutrófilos de pacientes com AR em atividade sob diferentes medicações	85
Figura 8: Propriedades adesivas dos neutrófilos de pacientes com AR em remissão da doença sob diferentes medicações.	87
Figura 9: Quimiotaxia de neutrófilos de indivíduos controle e de pacientes com artrite reumatoide.	88
Figura 10: Quimiotaxia de neutrófilos de pacientes com artrite reumatoide em atividade da doença em uso de diferentes medicações	90
Figura 11: Quimiotaxia de neutrófilos de pacientes com artrite reumatoide em remissão do estado inflamatório da doença.	91
Figura 12: Expressão gênica da molécula de adesão L-selectina (CD62L) e das subunidades alfa das integrinas LFA-1 (CD11a) e Mac-1 (CD11b) em controles e pacientes com AR em atividade.	93
Figura 13: Expressão gênica de L-selectina, LFA-1 e Mac-1 em pacientes com AR em atividade sob diferentes medicações	94
Figura 14: Expressão das proteínas L-selectina, LFA-1 e Mac-1 em neutrófilos de pacientes com artrite reumatoide e indivíduos controle.	97

Figura 15: Quantificação de L-selectina no soro de pacientes com artrite reumatoide e indivíduos controle.....	101
Figura 16: Quantificação sérica da quimiocina IL-8 em pacientes com artrite reumatoide e indivíduos controle.....	102
Figura 17: Quantificação sérica da quimiocina IL-8 em pacientes com artrite reumatoide em atividade sob diferentes medicações.	102
Figura 18: Quantificação sérica da quimiocina ENA-78 em pacientes com artrite reumatoide e indivíduos controle.....	103
Figura 19: Quantificação sérica da quimiocina ENA-78 em pacientes com artrite reumatoide em atividade sob diferentes medicações	103
Figura 20: Avaliação da migração de neutrófilos utilizando líquido sinovial de pacientes com artrite reumatoide como agente quimiotático.....	106
Figura 21: Migração neutrofilica após bloqueio com anticorpos monoclonais de citocinas presentes no líquido sinovial de pacientes com AR.....	107
Figura 22: Quantificação das quimiocinas IL-8 e ENA-78 no líquido sinovial de pacientes com AR e indivíduo com osteoartrite.	108

LISTA DE ABREVIATURAS

AINEs - anti-inflamatórios não esteroidais

AR - artrite reumatoide

BAC - beta actina

BSA - albumina sérica bovina

DMARDs - drogas antirreumáticas modificadoras da doença

ENA-78 - peptídeo epitelial ativador de neutrófilos 78

FN - fibronectina

FS - fluído sinovial

GAPDH - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GM-CSF - fator estimulador de colônia macrófago-granulócito

ICAM - molécula de adesão intercelular

IL - interleucina

KD - kilo dálton (unidade de medida)

LFA-1 - antígeno funcional linfocitário-1

LPS - lipopolissacarídeo

LTB4 - leucotrieno B4

Mac-1 - antígeno macrofágico 1

MACs - moléculas de adesão celular

MEC - matriz extracelular

MPO - mieloperoxidase

MTX - metotrexato

Oligo DT - oligonucleotídeo T

PBS - (*phosphate buffer saline*) salina tamponada fosfatada

PE – Ficoeritrina

PMNs - polimorfonucleares

TNF- α - tumor necrosis factor alfa

TGF- β - fator de desenvolvimento transformador beta

VCAM-1 - molécula de adesão celular vascular

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xvii
LISTA DE TABELAS	xxi
LISTA DE QUADROS	xxiii
LISTA DE FIGURAS	xxv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxix
SUMÁRIO.....	xxxiii
1. INTRODUÇÃO.....	41
1.1. Artrite reumatoide: aspectos clínicos e demográficos	43
1.2. O processo inflamatório.....	47
1.3. O papel dos neutrófilos na AR.....	51
1.4. Quimiocinas.....	53
1.5. Tratamentos disponíveis para a AR.....	55
1.6 TNF- α e a sua interação com neutrófilos.....	56
1.7 Atividade da artrite reumatoide	56
1.8. Justificativa	58
1.9. Objetivo	58
2. CASUÍSTICA E ASPECTOS ÉTICOS	59
2.1 Pacientes	61
2.2 Controles.....	62
2.3 Aspectos éticos da Pesquisa.....	63
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	65
3.1 Materiais	67
3.2 Métodos	67
3.2.1 Separação de neutrófilos do sangue periférico.....	67
3.2.2 Contagem de neutrófilos no sangue periférico.....	68
3.2.3 Armazenamento do soro e líquido sinovial.....	68
3.2.4 Ensaio de Adesão Estática <i>in vitro</i>	68

3.2.5 Ensaio de quimiotaxia celular <i>in vitro</i>	69
3.2.6 Citometria de Fluxo.....	70
3.2.7 PCR quantitativo em tempo real	70
3.2.7.1 Extração de RNA.....	70
3.2.7.2 Síntese de DNA complementar (DNAc)	71
3.2.7.3 Verificação da síntese de DNA complementar	71
3.2.7.4 Desenho dos <i>primers</i> para a reação de PCR quantitativo em tempo real	72
3.2.7.5 Concentração dos primers	72
3.2.7.6 Eficiência da reação.....	73
3.2.7.7 Técnica da PCR quantitativa em tempo real (real-time PCR)	74
3.2.7.8 Análise dos dados de PCR em tempo real.....	76
3.3 Análise estatística	76
4. RESULTADOS	79
4.1 Características dos indivíduos inclusos no estudo	81
4.2 Ensaio de adesão celular estática <i>in vitro</i>	82
4.2.1 Propriedades adesivas dos neutrófilos de controles e de pacientes com artrite reumatoide.....	82
4.2.2 Propriedades adesivas dos neutrófilos de pacientes com AR em atividade sob diferentes medicações	82
4.2.3 Propriedades adesivas dos neutrófilos de pacientes com AR em remissão da doença sob diferentes medicações.....	86
4.3 Ensaio de quimiotaxia celular <i>in vitro</i>	86
4.3.1 Quimiotaxia de neutrófilos de indivíduos controle e de pacientes com artrite reumatoide.....	86
4.3.2 Quimiotaxia de neutrófilos de pacientes com artrite reumatoide em atividade da doença em uso de diferentes medicações	89
4.3.3 Quimiotaxia de neutrófilos de pacientes com artrite reumatoide em remissão do estado inflamatório da doença.....	89

4.4 Expressão gênica de L-selectina, LFA-1 e Mac-1, determinada por PCR quantitativo em tempo real.....	92
4.4.1 Expressão gênica da molécula de adesão L-selectina (CD62L) e das subunidades alfa das integrinas LFA-1 (CD11a) e Mac-1 (CD11b) em controles e pacientes com AR em atividade	92
4.4.2 Expressão gênica de L-selectina, LFA-1 e Mac-1 em pacientes com AR em atividade sob diferentes medicações.....	92
4.5 Avaliação da expressão das proteínas de superfície L-selectina, LFA-1 e Mac-1 por citometria de fluxo.....	95
4.5.1 Expressão das proteínas L-selectina, LFA-1 e Mac-1 em neutrófilos de pacientes com artrite reumatoide e indivíduos controle.....	95
4.6 Quantificação de L-selectina no soro de pacientes com artrite reumatoide e indivíduos controle.....	99
4.7 Quantificação sérica das quimiocinas IL-8 e ENA-78 em pacientes com artrite reumatoide e indivíduos controles.....	99
4.8 Avaliação do potencial quimiotático do líquido sinovial de pacientes com artrite reumatoide	104
4.8.1 Avaliação da migração de neutrófilos utilizando líquido sinovial de pacientes com artrite reumatoide como agente quimiotático.....	104
4.8.2 Migração neutrofílica após bloqueio com anticorpos monoclonais de citocinas presentes no líquido sinovial de pacientes com AR	104
4.8.3 Quantificação das quimiocinas IL-8 e ENA-78 no líquido sinovial de pacientes com AR e indivíduo com osteoartrite.....	105
5. DISCUSSÃO	109
6. CONCLUSÃO.....	119
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
8. ANEXOS	137
ANEXO 1	139

ANEXO 2	141
ANEXO 3	143
ANEXO 4	144

1. Introdução

1.1. Artrite reumatoide: aspectos clínicos e demográficos

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica, autoimune e sistêmica (Gaffo *et al.*, 2006), que acomete aproximadamente 1% da população mundial, com incidência e prevalência maiores na América do Norte e o norte da Europa. Na América do Sul, o Brasil é o país com a maior prevalência (cerca de 0,5%), mas ainda há poucos estudos sobre esses fatores em países em desenvolvimento.

Esta doença afeta mais as mulheres do que os homens, sendo a proporção em torno de 3:1. Porém, os motivos por que este gênero é mais afetado permanecem incertos, podendo estar relacionados a diferenças quanto aos hormônios sexuais. A idade comum de início é entre os 30-50 anos, entretanto, estudos recentes sugerem um atraso na idade de início da doença e esta mudança vem sendo mais observada em mulheres (Symmons *et al.*, 2000; Sweeney & Firestein 2003; Alamanos & Drosos, 2005; Saraux *et al.*, 2010).

A poliartrite inflamatória simétrica é a primeira manifestação clínica da AR e os sintomas são caracterizados por dor, inchaço e rigidez nas articulações dos membros superiores e inferiores, envolvendo geralmente mais que 5 articulações, afetando em ambos os lados do corpo (simetria) e afetando preferencialmente os punhos, mãos e pés. Estes sintomas reforçam o fato de que esta é uma condição sistêmica e inflamatória. A fadiga, a rigidez matinal prolongada e a dor que melhora com atividade física são proeminentes no início da doença e isto pode ajudar a diferenciá-la de outras formas mais comuns de artrite, não-inflamatórias, como por exemplo, a osteoartrite, já que esta é usualmente associada com mínima rigidez matinal e piora da dor após atividade física (Gaffo *et al.*, 2006).

Uma articulação normal é revestida por uma membrana sinovial e lubrificada pelo líquido sinovial. As superfícies ósseas justapostas são cobertas por uma cartilagem hialina e esta não recobre as margens externas próximas à membrana sinovial, a qual se expande com o aparecimento da doença formando a sinovite proliferativa: “pannus”. O “pannus” geralmente invade a cartilagem articular, as bainhas dos tendões e a área desprotegida do osso subcondral. Em muitas pessoas, a inflamação diminui e a doença regride, mas se as respostas inflamatórias persistirem, a doença progride para uma inflamação crônica, ocasionando mudanças destrutivas nos ossos periarticulares, lesões e erosões ósseas e em casos extremos pode chegar a anquilose (Figura 1) (Wong & Lord, 2004).

Os critérios clínicos para o diagnóstico da AR foram desenvolvidos pelo Colégio Americano de Reumatologia (American College of Rheumatology – ACR) (Quadro 1) e estes critérios têm sido utilizados para classificar os pacientes em triagens clínicas de acordo com o grau de atividade da doença (Gaffo *et al.*, 2006).

O processo patológico envolvido na AR ainda permanece desconhecido. A indução da resposta imune, característica da doença, resulta de uma inflamação nas articulações através do infiltrado de células inflamatórias que são recrutados para o tecido sinovial, onde elas aderem às células endoteliais e transmigram através da subcamada sinovial, formando complexos que produzirão citocinas inflamatórias, quimiocinas, ativação de células B com produção de autoanticorpos, formação de imunocomplexos e fatores de crescimento que vão contribuir para a hiperplasia da camada sinovial e estimular os sinoviócitos a produzirem mais citocinas e enzimas capazes de degradar a matriz óssea, provocando a destruição das articulações afetadas (Sweeney & Firestein, 2003; Agarwal & Brenner 2006).

Embora se tenha acreditado que linfócitos T tenham uma ação importante nesta doença, terapias atuando contra essas células têm falhado em cumprir seu papel na melhora clínica, sugerindo que outros fatores tenham importante função no processo inflamatório da AR (Cross *et al.*, 2003). Assim, os mecanismos que governam esta organização e função nessa patologia ainda não estão definidos.

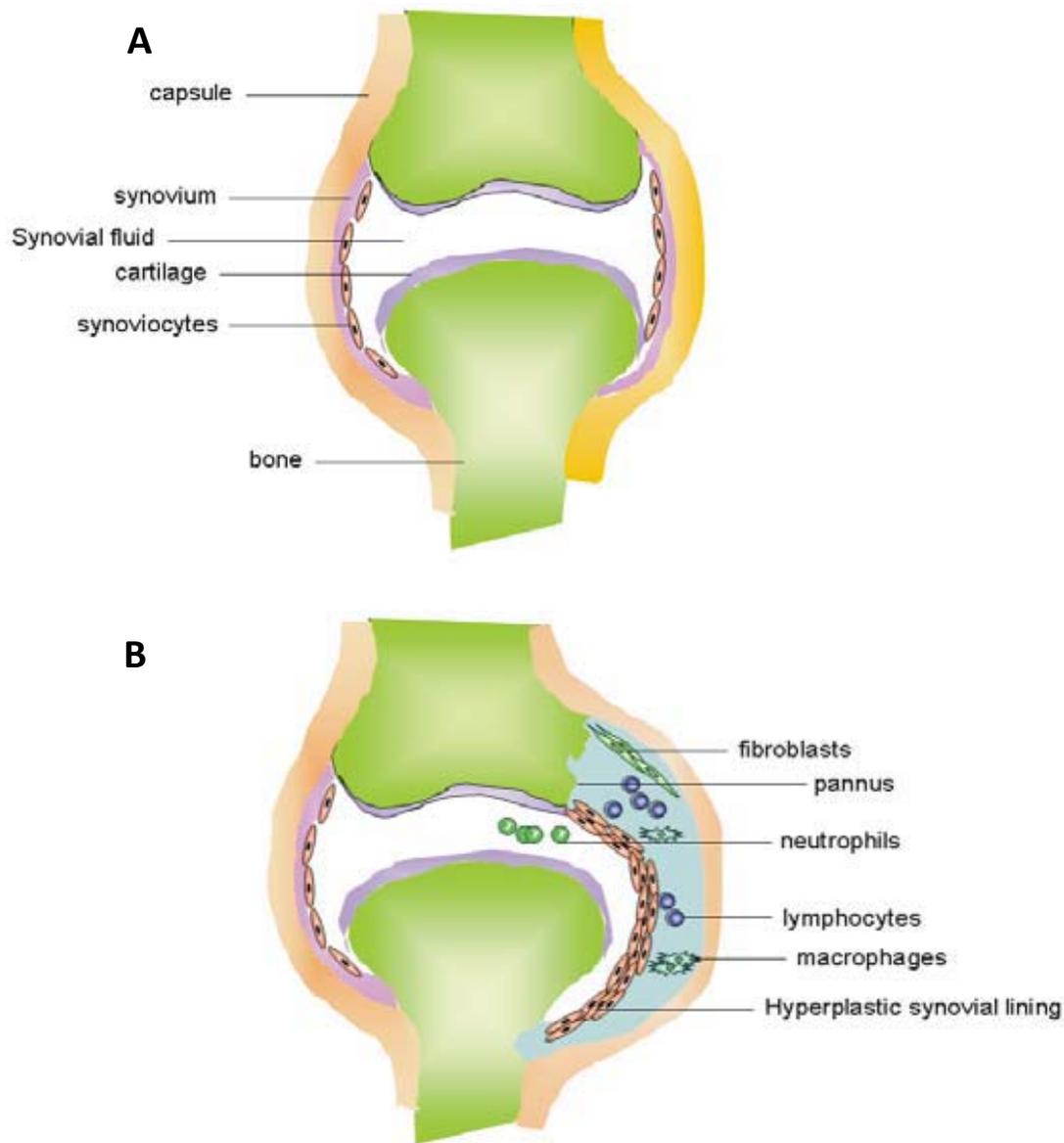


Figura 1: Características de uma articulação normal e afetada pela artrite reumatoide (Wong & Lord, 2004).

(a) Uma articulação sinovial é composta por dois ossos, cobertos com cartilagem articular em suas extremidades, separadas por um espaço comum preenchido com líquido sinovial. A cápsula articular é composta por fibras na camada externa e interna da sinóvia, que reveste a cavidade sinovial onde a cartilagem articular não está presente. O revestimento sinovial é constituído por uma fina camada de sinoviócitos (do tipo fibroblastos e macrófagos). (b) Uma articulação reumatoide tem uma inflamação da membrana sinovial (sinovite), que é causada pelo influxo de leucócitos, incluindo linfócitos, monócitos e neutrófilos. Com a progressão da doença, a sinóvia pode crescer consideravelmente, formando o “pannus”. O ponto final da AR é a erosão óssea.

Quadro 1: O critério do *American College of Rheumatology* de 1987, para a classificação da Artrite Reumatoide - revisado (Symmons, 2000, adaptado para o português)

	Título	Definição
1	Rigidez matinal	Rigidez matinal em uma articulação e em torno dela, com duração de pelo menos uma hora antes da melhora máxima. Pelo menos 3 articulações.
2	Artrite de 3 ou mais áreas articulares	Áreas com aumento simultâneo de partes moles ou fluido (sem desenvolvimento ósseo apenas), observadas por um médico. As 14 áreas possíveis são: articulações interfalangeanas proximais (IFP), metacarpofalangeanas (MCF), punho, cotovelo, joelho, tornozelo e articulações metatarsofalangeanas (MTF), do lado direito ou esquerdo.
3	Artrite de articulações das mãos	Pelo menos uma área edemaciada (como definido acima), em punho, MCF ou IFP
4	Artrite simétrica	Envolvimento simultâneo das mesmas áreas articulares (como definido em 2) em ambos os lados do corpo (envolvimento bilateral de IFPs, MCFs ou MTFs, é aceitável sem simetria absoluta).
5	Nódulos reumatoides	Nódulos subcutâneos observados sobre proeminências ósseas ou estendidos a regiões justa-articulares, observados por um médico.
6	Fator reumatoide sérico	Demonstração de quantidades anormais de fator reumatoide no soro ou qualquer outro método que o resultado tenha sido positivo em testes em que menos de 5% de indivíduos controle normais sejam reagentes.
7	Alterações radiográficas	Alterações radiográficas típicas da artrite reumatoide em radiografias pósterio-anterior das mãos e dos punhos, que devem incluir erosões ou descalcificações ósseas inequívocas, localizadas em uma ou mais articulações adjacentes envolvidas (alterações apenas em osteoartrite não se enquadram).

Para fins de classificação, é considerado que um paciente tenha AR se ele(a) satisfizer pelo menos 4 dos 7 critérios. Critérios do 1 ao 4 devem estar presentes por pelo menos 6 semanas. Pacientes com dois diagnósticos clínicos não são excluídos.

1.2. O processo inflamatório

O recrutamento de leucócitos para os tecidos através da camada de células endoteliais da parede dos vasos sanguíneos é um passo essencial na resposta inflamatória (Toetsch *et al.*, 2008). Essa migração de leucócitos inicia-se com a captura e rolamento ao longo do endotélio vascular e este processo é mediado inicialmente por proteínas de superfície da família das selectinas e seus ligantes, durante o repouso ou condições inflamatórias (Rosen & Bertozzi, 1994).

Selectinas, uma família de 3 lectinas do tipo C, ligam-se fracamente a ligantes de carboidratos na superfície de leucócitos, ocasionando o rolamento na superfície endotelial (Vestweber, 1996). As selectinas são predominantemente, embora não exclusivamente, expressas nas células pelos quais são denominadas: L (leucócito)-, E (endotélio)- e P (plaqueta)- selectina, também nomeadas como CD62L, CD62E e CD62P, respectivamente. As L-selectinas são expressas em quase todos os leucócitos, com exceção de um subtipo de células T de memória, e são responsáveis pela ligação destes ao endotélio tanto *in vivo* quanto *in vitro*. A regulação de L-selectina é particularmente importante no tráfego de leucócitos para órgãos específicos: em animais deficientes em L-selectina, células T são incapazes de se dirigir aos linfonodos periféricos (Tarrant & Patel, 2006).

Os tipos de interações envolvidas na captura de leucócitos são geralmente fracas, permitindo o rolamento no endotélio. Durante este rolamento, quimiocinas enviam sinais que convertem essa baixa afinidade das ligações mediadas pelas selectinas para interações de alta afinidade, o que promoverá a parada e iniciará o processo de adesão firme ao endotélio mediado pelas integrinas e posteriormente, ao extravasamento dos leucócitos (Luster, 1998 - Figura 2).

Integrinas são moléculas de adesão celular transmembrana do tipo I que consistem de duas subunidades não-covalentemente associadas: α e β , que intermedeiam interações entre células-patógeno, célula-célula e célula-matriz extracelular (MEC) (Zarbock & Ley, 2008). A adesão firme é ocasionada principalmente por integrinas β_2 , expressas nos neutrófilos, que incluem LFA-1 (CD11a/CD18) e Mac-1 (CD11b/CD18) (De Clerck *et al.*, 1995) e seus ligantes (Figura 2), que compreendem principalmente a superfamília das imunoglobulinas conhecidas como moléculas de adesão intercelulares (ICAMs), além da molécula de adesão celular vascular (VCAM-1), sendo ICAM-1 a mais importante em

respostas inflamatórias. As integrinas não estão constitutivamente ativas na superfície dos leucócitos e a ligação integrina-receptor requer um segundo sinal para fortalecer esta interação. Por exemplo, a sinalização através do receptor de quimiocina é um mecanismo dependente de RhoA, que leva a mudanças conformacionais na integrina leucocitária. Como resultado, a ligação ocorre através de alta avidéz e afinidade, que leva à captura do leucócito e sua firme adesão (Tarrant & Patel, 2006). A transmigração pelo endotélio ocorre por diapedese e ainda é um processo pouco compreendido (Tarrant & Patel, 2006); após essa migração transendotelial e extravasamento para dentro dos tecidos, o leucócito recebe novos sinais, frequentemente na forma de gradientes de quimiocinas, para continuar esse processo de recrutamento para o local de inflamação.

Nas últimas décadas, avanços significativos no entendimento da patogênese da AR e inflamação sinovial têm levado à identificação de novos alvos terapêuticos, alguns deles envolvendo moléculas de adesão com a intenção de inibir o recrutamento dos leucócitos. Anticorpos contra selectinas, integrinas e membros da família de genes das imunoglobulinas têm mostrado sucesso na melhora do quadro inflamatório da artrite em modelos animais e demonstrado diminuição do recrutamento de leucócitos nas articulações. Como por exemplo, o papel de ICAM-1 tem sido estudado em alguns modelos animais com artrite induzida, em ratos (AIA- *sigla em inglês*) ou artrite induzida por colágeno, em camundongos (CIA – *sigla em inglês*), através de anticorpos específicos bloqueando esta MAC e nestes estudos observou-se a diminuição da expressão desta molécula (Iigo *et al.*, 1991; Kakimoto *et al.*, 1992). Anticorpos contra os ligantes de ICAM-1 (integrinas β_2 , CD11a ou CD11b) reduziram a artrite induzida por colágeno em camundongos (Taylor *et al.*, 1996; Barck *et al.*, 2004). Mais recentemente, Watts e colaboradores (2005) demonstraram que camundongos geneticamente deficientes em integrinas β_2 , foram resistentes ao desenvolvimento de artrite. A inibição de CD18 com um anticorpo monoclonal reduziu grande parte da migração de neutrófilos para as articulações em um modelo de artrite induzida por antígeno em coelhos (Jasin *et al.*, 1992). No entanto, anticorpos monoclonais desenvolvidos contra ICAM-1 em humanos, resultaram em efeitos adversos e formação de complexos imunes, e outros métodos tentando bloquear esta via, como por exemplo, oligonucleotídeos antissense não mostraram eficácia clínica em humanos (Maksymowych *et al.*, 2002; Sweeney & Firestein, 2003).

Há evidências de que as terapias atuais utilizadas no tratamento da AR promovem a melhora da inflamação, em parte pela diminuição dos níveis de expressão das moléculas de adesão solúveis, reduzindo conseqüentemente o influxo celular (Volin, 2005).

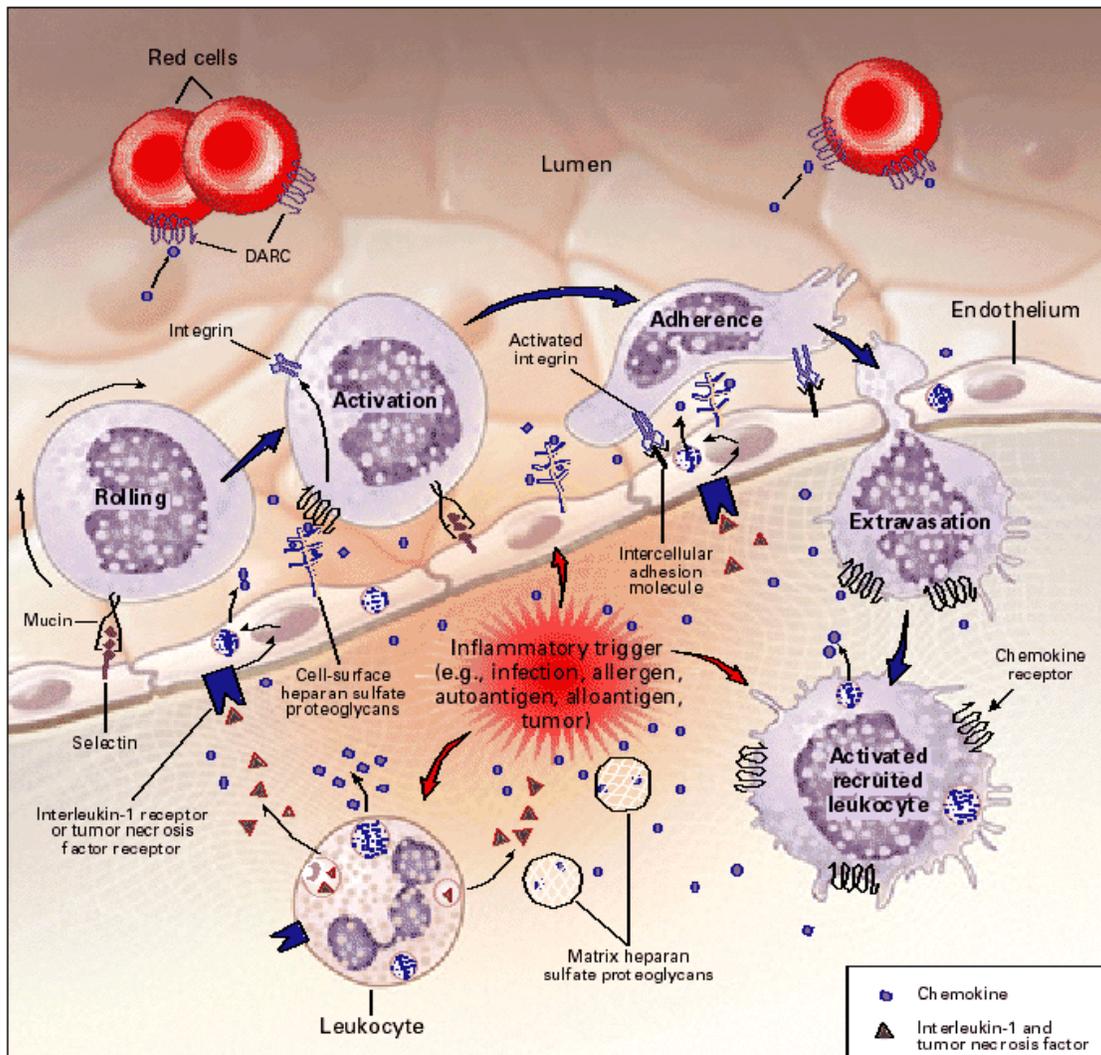


Figura 2: Regulação do movimento leucocitário por quimiocinas (Luster, 1998). Quimiocinas são secretadas nos locais de inflamação por células teciduais residentes, leucócitos residentes e recrutados e células endoteliais ativadas por citocinas. Quimiocinas são localmente retidas nas proteoglicanas heparan-sulfato expressas na matriz e superfície celular, estabelecendo um gradiente de concentração de quimiocinas ao redor do estímulo inflamatório e na superfície do endotélio próximo ao local. Rolamento de leucócitos no endotélio é um processo mediado por selectinas que são interpostas em contato com receptores de quimiocinas presentes nas proteoglicanas de heparan-sulfato expressas na superfície celular. A sinalização de quimiocina ativa integrinas leucocitárias, levando à firme aderência e extravasamento. Os leucócitos recrutados são ativados por citocinas pró-inflamatórias locais e podem se tornar “insensibilizados” a sinais adicionais de quimiocinas devido a elevadas concentrações locais destas moléculas. O receptor do antígeno Duffy para quimiocinas (DARC), um receptor de quimiocina eritrocitário não sinalizado, remove quimiocinas da circulação e auxilia na manutenção do gradiente quimiotático na corrente sanguínea.

1.3. O papel dos neutrófilos na AR

Articulações afetadas pela artrite apresentam hiperplasia da sinóvia com aumento de volume do fluido sinovial, intensa infiltração de vários tipos celulares (neutrófilos, macrófagos, fibroblastos, células T e células dendríticas) nas regiões sinoviais e periarticulares, deposição do complemento, expressão aumentada de citocinas inflamatórias e eventual erosão e remodelamento da cartilagem óssea (Wipke & Allen, 2001). Células T, células B e macrófagos infiltram a sinóvia e formam discretos agregados linfóides, enquanto sinoviócitos do tipo macrófago ou do tipo fibroblasto acumulam-se na íntima causando hiperplasia e secretando enzimas nocivas. No entanto, antes destes eventos acontecerem, os neutrófilos - que são as células predominantes no fluido sinovial (FS) - fagocitarão complexos imunes e liberarão proteases potencialmente citotóxicas, além de serem capazes de se comunicar com outros tipos celulares e regular as suas funções (Figura 3) (Bostan *et al.*, 2002; Cross *et al.*, 2005; Cascão *et al.*, 2010).

Os neutrófilos são produzidos na medula óssea e circulam no sangue por poucas horas antes de serem seletivamente recrutados para tecidos lesionados por infecções, traumas ou uma reação autoimune (Zarbock & Ley, 2008). A função primária dos neutrófilos é reconhecer, fagocitar e matar microorganismos invasores e proteger o hospedeiro de infecções, o que inclui a habilidade de gerar espécies reativas de oxigênio e uma variedade de proteases, e que devido a esse enorme potencial citotóxico podem causar danos teciduais. Essas células são atraídas para as articulações edemaciadas por quimioatraentes como LTB₄, C5a, IL-8 e TGF- β e, quando recrutados nas articulações, estas células são expostas a uma variedade de citocinas locais pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α , GM-CSF, IL-6 e IL-18 (Feldmann *et al.*, 1990, Simmonds & Foxwell, 2008). Essa complexa rede de citocinas, incluindo-se quimiocinas, regula a migração para os sítios inflamatórios e conseqüentemente, sua ativação, função e processo apoptótico estão alterados nesta patologia (Montecucco *et al.*, 2008; Cascão *et al.*, 2010).

Estudos mostraram que os neutrófilos possuem um papel indutor na geração de inflamação específica na articulação em modelos de camundongos (Wipke & Allen, 2001) e esforços visando compreender os mecanismos exercidos pelos neutrófilos nesta doença podem ser um ponto chave para intervenções farmacológicas na melhora dos sintomas e gravidade da doença.

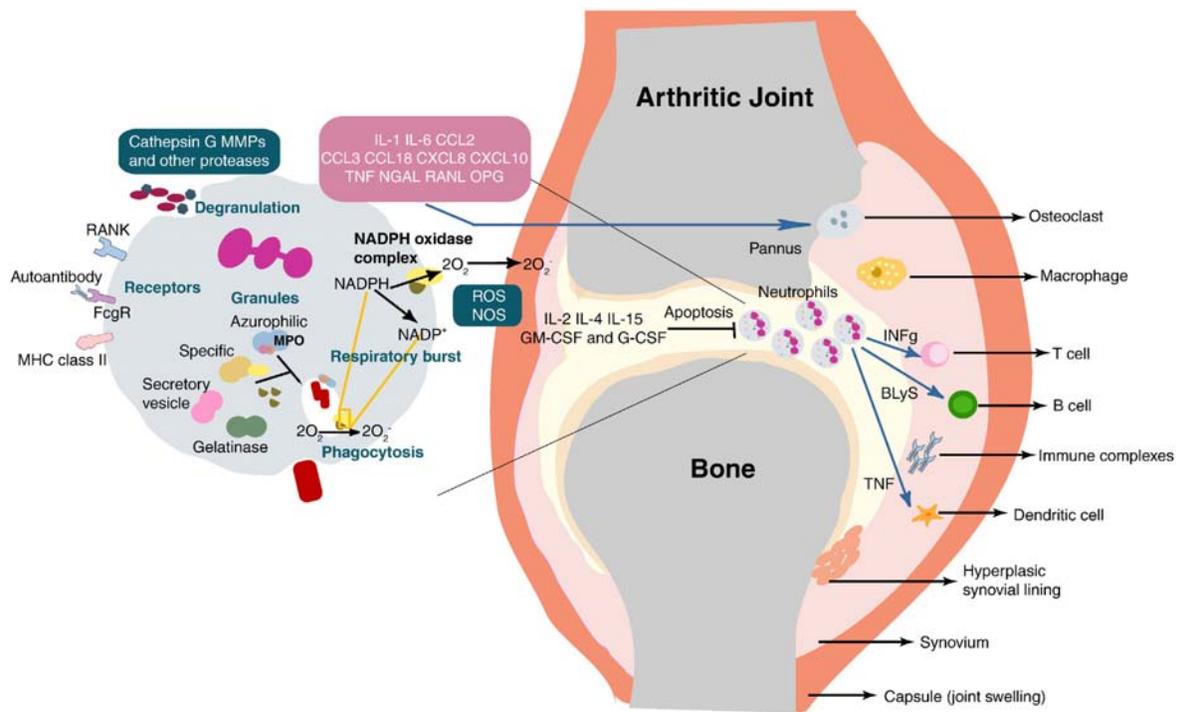


Figura 3: Papel dos neutrófilos na inflamação das articulações (Cascão *et al.*, 2010). Esquema da sinóvia destacando a interação entre todos os tipos de leucócitos, que infiltram maciçamente as articulações edemaciadas e a interface erosiva entre pannus e cartilagem/osso causada pela ação dos osteoclastos. A figura também destaca a contribuição de neutrófilos para o desenvolvimento da doença especialmente pela produção de mediadores imunes e enzimas.

1.4. Quimiocinas

A quimiotaxia é o processo de migração celular direcionada em um gradiente de moléculas solúveis, denominadas quimioatraentes, e os sinais bioquímicos direcionados para este processo são relevantes em todas as instâncias da inflamação (Jeon *et al.*, 2002; Toetsch *et al.*, 2008). Estes quimioatraentes são as quimiocinas, pequenas citocinas formadas por peptídeos estruturalmente relacionados de 8-10 kD, que atuam no movimento direcional de neutrófilos para o desenvolvimento da inflamação, aumentando a adesividade das integrinas e promovendo o acúmulo de células inflamatórias no sítio da inflamação. As quimiocinas são secretadas por uma ampla variedade de células e estão envolvidas nas respostas imunes inata e adaptativa.

O sistema de quimiocinas é amplo, com aproximadamente 50 quimiocinas e 20 receptores. São similares na sequência de aminoácidos e ligam-se a receptores contendo 7 domínios transmembrana. Além disso, são subdivididas dentro de famílias de acordo com a estrutura N-terminal dos resíduos de cisteína em: C, CC, CXC ou CX3C (Luster, 1998; Tarrant & Patel, 2006). A família das CXC quimiocinas atuam principalmente em neutrófilos e linfócitos, enquanto CC quimiocinas atuam em monócitos e linfócitos sem afetar neutrófilos. Dentro das CXC quimiocinas incluem-se IL-8/CXCL8 (interleukin-8), ENA-78/CXCL5 (epithelial neutrophil activating peptide-78), Gro α /CXCL1 (growth related oncogene α), Mig/CXCL9 (monokine induced by interferon- γ), entre outros (Luster, 1998).

Walz e colaboradores, em 1991, identificaram o peptídeo epitelial ativador de neutrófilos, também conhecido como ENA-78 ou ainda, CXCL5, uma proteína secretada com 78 resíduos de aminoácidos, um potente quimiotático e pouco menos potente fator quimiocinético para PMNs do sangue periférico (Koch *et al.*, 1994). Esta citocina possui em torno de 22% de homologia com o gene da IL-8 e é expressa em plaquetas, neutrófilos, monócitos/macrófagos, após estímulo por LPS. O aumento da produção desta citocina tem sido associado ao aumento do influxo de neutrófilos em várias condições inflamatórias (Koch *et al.*, 1994; Schmouder *et al.*, 1995; Colletti *et al.*, 1996). Ainda, o grupo de Koch, em 1994, encontrou níveis elevados desta quimiocina no sangue periférico e líquido sinovial de pacientes com AR, mas uma avaliação quanto ao efeito da medicação ou o estado inflamatório da doença nos níveis desta molécula ainda não foi realizada.

A IL-8 é uma citocina inflamatória produzida por várias células (monócitos/macrófagos, células T, neutrófilos, fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos, hepatócitos, condrócitos e astrócitos) em resposta a estímulos inflamatórios como IL-1, TNF- α , LPS e vírus (Matsushima *et al.*, 1992; Miller e Krangel, 1992). Foi identificada em 1987 como uma nova citocina ativadora de neutrófilos, que promove a quimiotaxia e liberação de grânulos enzimáticos *in vitro* (Baggiolini & Clark-Lewis, 1992) e este estímulo induz as principais respostas em neutrófilos: mudança de forma do neutrófilo, direção da migração e exocitose de proteínas estocadas. Esta quimiocina está super-regulada no tecido sinovial de pacientes com AR comparado a indivíduos com osteoartrite e, além disso, contribui para a atividade quimiotática de neutrófilos presentes nas articulações destes pacientes. Em adição, foi observado que a IL-8 é responsável por 40% da atividade quimiotática de PMNs encontrados nestes fluidos sinoviais (Koch *et al.*, 1994).

As quimiocinas têm um importante papel na patologia da AR por recrutar leucócitos e por controlar outros processos também importantes como a liberação de mediadores inflamatórios, a proliferação celular e a angiogênese. Algumas quimiocinas estão implicadas na patogênese da AR por promover o recrutamento e retenção dos leucócitos na articulação, como exemplos temos MCP-1/CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1), RANTES/CCL5 (Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted), MIP-1 α /CCL3 (macrophage inflammatory protein), IL-8/CXCL8 (interleukin-8), GRO α /CXCL1 e linfotactina/XCL1 (lymphotactin) (Iwamoto *et al.*, 2008).

A redução da atividade quimiotática nas áreas de inflamação na AR pode ser um possível alvo terapêutico adicional às terapias já existentes, como por exemplo às terapias anti-TNF- α , pois estas drogas não são bem toleradas ou possuem efeitos benéficos parciais em alguns pacientes. Intervenções nas interações entre MACs e receptores de quimiocinas que regulam a migração direcionada para determinado órgão podem ser alternativas ideais para reduzir a resposta inflamatória sem afetar a resposta imune contra infecção (Tarrant & Patel, 2006).

1.5. Tratamentos disponíveis para a AR

As terapias farmacológicas atuais para o tratamento da AR incluem:

- Drogas que suprimem a inflamação, como anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e glucocorticoides. Essa classe de medicação atua na melhora da dor e edema provenientes da doença. Esses medicamentos podem ser úteis no tratamento inicial da doença, enquanto o diagnóstico ainda não foi feito, ou administrado juntamente com outros medicamentos próprios para a AR.
- Drogas antirreumáticas modificadoras da doença (conhecidas como DMARDs – disease-modifying antirheumatic drugs) que incluem metotrexato, hidroxicloroquina, sulfasalazina, leflunomide; drogas que melhoram os sintomas com lenta progressão clínica e radiográfica.

Por mais de 20 anos, o metotrexato (MTX) tem sido a droga mais amplamente utilizada para AR. Vários mecanismos de ação têm sido propostos para esta droga, ela pode atuar como agente antifolato, inibindo a rápida proliferação celular incluindo linfócitos e outras células inflamatórias (papel quimioterápico); reduz acúmulo de componentes tóxicos (como poliaminas) que contribuem para o dano tecidual da AR; reduz níveis intracelulares de glutathione diminuindo o dano causado por metabólitos tóxicos de oxigênio; e aumenta os níveis extracelulares de adenosina que tem ação anti-inflamatória.

- E a classe de medicamentos que compreende os modificadores da resposta biológica, que são drogas direcionadas para mediadores inflamatórios de dano tecidual na AR e como exemplos incluem-se: infliximab, adalimumab, etanercept (atuam contra o TNF- α), abatacept (impede ativação de células T), anakinra (inibidor recombinante da citocina pró-inflamatória IL-1) e rituximab (anticorpo monoclonal anti-CD20 presente em células B) e outros ainda não disponíveis no mercado (Gaffo *et al.*, 2006). Estes medicamentos são recomendados para o tratamento da AR ativa, após uma tentativa adequada de tratamento por DMARDs não obter resposta satisfatória (Lee *et al.*, 2008).

O infliximab (anticorpo monoclonal contra a molécula de TNF- α - citocina que exerce papel central na patogênese da AR) foi o primeiro agente anti-TNF- α estudado para o tratamento da AR. Este anticorpo é uma molécula quimérica que reúne a porção Fc da imunoglobulina G1 humana com a porção variável de um anticorpo de camundongo contra

TNF- α . Este anticorpo monoclonal liga-se ao TNF- α solúvel e presente na membrana celular, interferindo na ligação desta citocina ao seu receptor e induzindo uma resposta dependente de anticorpo contra células que expressam esta citocina (Gaffo *et al.*, 2006).

1.6 TNF- α e a sua interação com neutrófilos

Sabe-se que neutrófilos constituem alvos da atividade biológica do TNF- α na patogênese da AR, mas existem poucos dados sobre o efeito da terapia contra esta citocina na função destas células *ex vivo* (Capsoni *et al.*, 2005). Montecucco *et al.*, em 2008, reportaram que a incubação de neutrófilos com TNF- α promoveu aumento da regulação de Mac-1 através de vias de sinalização envolvendo Src kinases, p38 MAPK e ERK 1/2 e, conseqüentemente, o aumento da migração direcionada ao CCL3. Alguns autores reportaram diminuição do influxo de neutrófilos e redução da expressão de citocinas em articulações inflamadas em pacientes AR após tratamento com infliximab (Taylor *et al.*, 2000; Verri Jr. *et al.*, 2010). A terapia anti-TNF- α também mostrou redução dos níveis séricos de algumas moléculas de adesão (Gonzalez-Gay *et al.*, 2006).

A resposta clínica às atuais terapias utilizadas é muito variável entre os pacientes e apesar de alguns destes tratamentos possuírem alvos moleculares bem definidos, como por exemplo, o TNF- α , nosso conhecimento sobre as moléculas e as vias que são afetadas por este bloqueio *in vivo* ainda é limitado. Estudos avaliando a influência das drogas utilizadas no tratamento da AR nas propriedades adesivas e migratórias dos neutrófilos, em pacientes que respondem satisfatoriamente ou não à medicação (com e sem atividade da doença, respectivamente), não foram realizados até o momento.

1.7 Atividade da artrite reumatoide

A AR causa, frequentemente, destruição e perda de função das articulações e o tratamento com as atuais terapias podem melhorar significativamente o quadro clínico. Dessa forma, é importante uma completa avaliação do estado da doença do paciente, como também das modificações decorrentes do tratamento (Aletaha *et al.*, 2005). Na prática clínica, a opinião sobre a atividade da doença é formada pela associação de resultados clínicos, laboratoriais, exames radiológicos e a descrição do seu estado pelo próprio paciente (Van der Heijde *et al.*, 1990). Entretanto, para evitar variações de julgamentos

clínicos entre os reumatologistas, vários instrumentos foram desenvolvidos e são úteis para informar se o tratamento está produzindo os efeitos esperados em determinado período de tempo ou se o tratamento deve ser modificado ou intensificado (Van Riel & Fransen, 2005).

O critério preliminar do Colégio Americano de Reumatologia (ACR) para melhora da AR (Felson *et al.*, 1995) é uma boa ferramenta para avaliar a resposta ao tratamento em triagens clínicas, mas ele não foi desenhado para expressar alguns níveis de atividade da doença. Outras ferramentas de avaliação da atividade da doença incluem o *Disease Activity Score* (DAS) (Van der Heijde *et al.*, 1990) e seu derivado e mais comumente usado, DAS 28 (Prevoo *et al.*, 1995), que são baseados na contagem de articulações edemaciadas e dolorosas, avaliação global da dor do paciente (VAS – *visual analog scale of pain*) e velocidade de hemossedimentação (VHS).

O DAS28 foi desenvolvido utilizando a terapia com DMARDs como parâmetro para classificação de alta e baixa atividade da doença, ele é similar ao DAS, incluindo menor número de articulações avaliadas e possui pontuação diferente das outras ferramentas (Fransen & Van Riel, 2009). Sua pontuação varia de 0 a 10 e classifica a atividade como baixa para valores menores ou iguais a 3,2, enquanto acima de 5,1 são considerados como alta atividade da doença (Van Gestel *et al.*, 1996; Van Gestel *et al.*, 1998). A remissão da doença é considerada para valores abaixo de 2,6 (Mäkinen *et al.*, 2006). Esta ferramenta também tem sido muito útil para monitorar a atividade da doença em pacientes tratados com agentes biológicos (Van Riel & Fransen, 2005).

1.8. Justificativa

O acúmulo de células nas áreas de inflamação presentes em pacientes com artrite reumatoide, envolve diversos mecanismos ainda pouco compreendidos. Os neutrófilos são o tipo celular mais abundante no líquido sinovial desses pacientes e pouco se sabe sobre as características migratórias e adesivas destas células com relação às diversas terapias farmacológicas utilizadas atualmente. Diante disso, torna-se importante avaliar as propriedades adesivas e quimiotáticas dos neutrófilos de pacientes com AR, avaliando a influência de diferentes medicações e entendendo como estas características atuam em pacientes em remissão da atividade inflamatória da doença.

1.9. Objetivo

Este estudo objetivou avaliar as propriedades adesivas e quimiotáticas de neutrófilos em pacientes com AR comparadas a indivíduos sem a doença, verificando a influência das diferentes medicações utilizadas atualmente no tratamento da AR e do estado ativo ou não desta doença;

E investigar o potencial quimiotático do líquido sinovial de pacientes com artrite reumatoide frente a neutrófilos sem a doença e as possíveis citocinas envolvidas neste processo quimiotático.

2. Casuística e Aspectos Éticos

2.1 Pacientes

Foram selecionados 123 pacientes com idade entre 26 e 75 anos, atendidos no Ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP, Campinas-SP, dirigido pelo Prof. Dr. Manoel de Barros Bértolo.

Os pacientes apresentaram diagnóstico definitivo de AR, de acordo com os critérios do Colégio Americano de Reumatologia para a AR (Arnett *et al.*, 1988) e ausência de degradação osteoarticular excessiva (através do julgamento clínico de um médico reumatologista e exames radiológicos). Foram excluídos aqueles pacientes que apresentaram comorbidades como, por exemplo, outros tipos de artrite, tumores benignos ou malignos e outras condições inflamatórias, infecciosas ou neoplásicas.

Foram classificados em com ou sem atividade da doença, de acordo com o DAS 28 (*disease activity score in 28 joints*), índice clínico de atividade da artrite reumatoide. Estes indivíduos foram avaliados clínica e laboratorialmente, de acordo com os seguintes critérios:

- Avaliação do número de articulações edemaciadas e dolorosas dentre as 28 pré-estabelecidas (ombros, cotovelos, punhos, metacarpofalangeanas, interfalangeanas proximais e joelhos);
- Avaliação global do paciente através da escala visual analógica de dor (VAS) que varia de 0 a 100;
- Velocidade de hemossedimentação (VHS) calculada pelo método de Westergren (≥ 20 mm/h) ou avaliação da proteína C-reativa por nefelometria ($\geq 0,8$ mg/dL).

A associação desses valores resulta em pontos que classificam o estado de atividade inflamatória do paciente em:

Atividade alta: $DAS28 > 5,1$

Atividade moderada: $3,2 < DAS28 \leq 5,1$

Atividade baixa: $DAS28 \leq 3,2$

Remissão: $DAS28 < 2,6$

Neste estudo consideramos pacientes em atividade aqueles que apresentaram atividade moderada ou alta (valores maiores que 3,2) e pacientes sem atividade aqueles em remissão da doença (valores abaixo de 2,6).

Estes pacientes foram divididos em grupos de acordo com o tipo de tratamento:

- com AR sem tratamento com medicações específicas para a AR, isto é, sem uso de drogas modificadoras da doença ou agentes biológicos, podendo estar tomando anti-inflamatórios não esteroidais ou corticoides;
- com AR e em tratamento com drogas modificadoras do curso da doença (hidroxicloroquina, leflunomide, metotrexato e sulfassalazina), sendo o metotrexato (MTX) a droga mais amplamente utilizada nos pacientes do ambulatório de Reumatologia do Hospital de Clínicas da Unicamp, com dosagens entre 7,5 a 25 mg/semana, estando estável em uma determinada dosagem há pelo menos 3 meses;
- com AR e em tratamento com agentes biológicos (terapia anti-TNF- α) associado ou não ao MTX, neste estudo foram considerados os pacientes em uso de *infiximab* (Remicade®) com infusão intravenosa e dosagens de 3mg/Kg administradas a cada 8 semanas e pacientes em uso de adalimumab (Humira®), por injeção subcutânea e dosagem de 40mg a cada duas semanas, estando estáveis na dosagem estabelecida por pelo menos 3 meses.

Tabela 1: Medicação dos pacientes com artrite reumatoide utilizados neste estudo

Supressores da dor e inflamação			Agentes biológicos anti-TNF- α	
AINEs	Analgésicos	corticoides	Adalimumab	Infiximab
26	41	73	02	26

Drogas modificadoras da doença (DMARDs)			
Hidroxicloroquina	Leflunomide	Metotrexato	Sulfassalazina
13	33	62	09

Nota: Os números não correspondem ao total de pacientes de cada grupo, pois alguns pacientes poderiam estar tomando mais de um medicamento

2.2 Controles

Como controle, coletamos sangue periférico de voluntários sadios (masculino e feminino) que compreenderam funcionários, alunos e doadores de sangue do Hemocentro da UNICAMP e que não estavam em uso de medicação. Nos experimentos com líquido sinovial, o controle foi líquido sinovial de paciente com osteoartrite.

A idade dos controles compreendeu entre 21 e 62 anos de idade.

2.3 Aspectos éticos da Pesquisa

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (CEP) e à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Aprovado pelo CEP em 31 de Janeiro de 2008 durante a XII Reunião Ordinária de CEP/FCM (registro CEP: 991/2007). Aprovação pelo CONEP em 29 de janeiro 2008 (registro CONEP: 169206/2008, processo n° 0728.0.146.000-07), segundo as atribuições do Conselho Nacional de Saúde.

Todos os indivíduos controles e pacientes foram informados sobre os procedimentos da coleta e seus riscos e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para a autorização da mesma. A cópia dos termos aplicados encontram-se em anexo.

3. Materiais e Métodos

3.1 Materiais

A fibronectina (FN) obtida de plasma humano e os reagentes de ficoll-hypaque® nas densidades 1077 e 1119g/L foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich (St. Louis, USA). A citocina IL-8 recombinante humana (CXCL8) foi adquirida da empresa Biosource (California, USA).

Os anticorpos monoclonais para bloqueio e neutralização da IL-8 e TNF- α foram obtidos da R&D systems (Abingdon, UK). Os anticorpos conjugados com fluorocromos para citometria de fluxo, anti-CD11b e anti-CD62L, foram obtidos da BD Pharmingen (California, USA) e anti-CD11a obtido da AbD serotec (North Caroline, USA).

Kits para os ensaios de ELISA para quantificação da citocina IL-8 foram obtidos da BD Biosciences e para as quantificações da citocina ENA-78 e da selectina CD62L foram obtidos da R&D systems. A enzima Hyaluronidase® e todos os demais produtos foram obtidos da Sigma Co. (St. Louis, USA).

3.2 Métodos

3.2.1 Separação de neutrófilos do sangue periférico

O sangue periférico (6mL) foi coletado em tubo contendo citrato de sódio (3,2%) (BD vacutainer, Brasil), pelos métodos convencionais de flebotomia e em seguida, colocado sobre 2 camadas de Ficoll-paque® com densidades iguais a 1.119g/L e 1.077g/L, respectivamente.

Após a centrifugação a 700g por 30 minutos à temperatura ambiente, a camada de células granulocíticas foi separada, transferida e lavada com PBS 1X (pH=7,4). Em seguida, uma lise hipotônica (Solução de amônia - 155mM NH₄CL, 10mM KHCO₃) foi realizada, a fim de romper hemácias contaminantes, e estas células foram lavadas novamente com PBS 1X. Após as lavagens, essas células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 (pH=7,2) com concentrações de acordo com o experimento a ser feito. As células foram mantidas à 4°C até o prosseguimento do experimento, não ultrapassando 30 minutos até o início do ensaio (Almeida *et al.*, 2007).

3.2.2 Contagem de neutrófilos no sangue periférico

A contagem das células foi feita através de suspensão de neutrófilos diluídos 20X em solução de Turk (solução de ácido acético com corante violeta genciana). Os cálculos foram feitos a partir do número de neutrófilos contados na câmara de Neubauer, ajustando às concentrações desejadas dos experimentos.

3.2.3 Armazenamento do soro e líquido sinovial

Para separar o soro, o sangue total foi coletado em tubos sem anticoagulante (BD vacutainer, Brasil) e imediatamente centrifugado a 1700g por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, o soro obtido foi separado em alíquotas e armazenado em freezer - 80°C, até o dia do experimento.

Para armazenamento do fluido sinovial, a artrocentese foi realizada por profissional médico qualificado e o fluido obtido foi coletado em tubos com heparina lítica (GBO, vacuette, Brasil). Após a coleta, o fluido foi imediatamente centrifugado a 800g por 15 minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante obtido foi separado e armazenado em alíquotas até a realização do experimento. A viscosidade do líquido sinovial foi reduzida após tratamento com a enzima hyaluronidase (Sigma, bovina tipo I-S, H3506; 1756U/mL), por 10 minutos à temperatura ambiente imediatamente antes do ensaio.

3.2.4 Ensaio de Adesão Estática *in vitro*

Esses ensaios são utilizados para avaliar propriedades adesivas dos neutrófilos conforme descrito por Assis *et al.*, 2005 e Canalli *et al.*, 2007. Uma placa de 96 poços foi previamente incubada com 60 µl de fibronectina (FN - 20µg/mL), uma proteína da matriz extracelular, e incubou-se overnight à 4°C. No dia seguinte, dia do ensaio, os poços foram lavados com PBS 1X (salina tamponada fosfatada) por duas vezes e adicionou-se 100 µL em cada poço de 0,5% de BSA (albumina sérica bovina) para bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação. Esta placa foi incubada em estufa à 37°C por 60 minutos e em seguida, os poços foram novamente lavados com PBS 1X por 2 vezes e aguardou-se a secagem. Após este procedimento, a placa torna-se pronta para receber os neutrófilos

(2×10^6 células/mL) incubados ou não com IL-8 (500ng/mL). O meio RPMI (50 μ L) foi adicionado em cada poço.

A quantificação de neutrófilos aderidos foi feita através da leitura por um espectrofotômetro (Multiscan MS, Labsystems, EUA) a 492nm, que quantifica a densidade óptica emitida pela reação do substrato de O-dianisidina (Sigma[®]), na presença de peróxido de hidrogênio, com o conteúdo de mieloperoxidase (MPO), enzima presente no interior dos neutrófilos, e comparada à curva padrão de cada indivíduo.

A curva padrão foi realizada com porcentagens de células pré-determinadas de cada amostra e comparada aos resultados obtidos. Foi feita uma curva para cada amostra, pois o conteúdo de MPO presente no interior dos neutrófilos pode variar para cada indivíduo.

3.2.5 Ensaio de quimiotaxia celular *in vitro*

Para o ensaio de migração celular foi utilizado uma câmara de ensaio para quimiotaxia (ChemoTX – NeuroProbe Inc, USA). Foram adicionados 25 μ L de suspensão celular de neutrófilos na concentração de 4×10^6 células/mL em RPMI na parte superior da câmara e separada por um filtro com poros de 5 μ m da parte inferior, que contém 29 μ L de RPMI para avaliação da migração sem estímulo, ou IL-8 (100ng/mL) para migração sob estímulo quimiotático. Incubou-se esta câmara à 37°C por 120 minutos, proporcionando a migração dos neutrófilos. Após esta incubação, o conteúdo de células migradas presente na parte inferior da câmara foi transferido para outra placa e a migração foi quantificada pela leitura em espectrofotômetro do conteúdo de MPO, da mesma forma como descrito acima.

Nos experimentos utilizando o líquido sinovial como agente quimiotático, este líquido foi tratado com enzima hyaluronidase (para reduzir a viscosidade deste fluido) e, logo após o tratamento, incubado previamente ou não com anticorpos monoclonais anti-IL8 e anti-TNF- α (ambos na concentração de 1 μ g/mL) por 60 minutos à 37°C. Em seguida, o líquido sinovial tratado foi colocado na parte inferior da câmara, enquanto na parte superior foi colocada a suspensão de neutrófilos, extraídos do sangue periférico de indivíduos controles, na concentração de 4×10^6 cels/mL em RPMI. A incubação foi de modo semelhante ao descrito acima, mas a leitura foi feita manualmente por câmara de Neubauer, contando-se o número de neutrófilos migrados presentes na parte inferior da câmara de quimiotaxia.

3.2.6 Citometria de Fluxo

A expressão da molécula de adesão L-selectina (CD62L) e das subunidades alfas das integrinas β_2 : CD11a (LFA-1) e CD11b (Mac-1), foi detectada por citometria de fluxo.

Foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais humanos:

- anti-CD11a conjugado ao fluorocromo PE;
- anti-CD11b conjugado ao fluorocromo Alexa Fluor 488;
- anti-CD62L conjugado ao fluorocromo PE.

Para todos os anticorpos de superfície celular citados, a concentração de células foi de 2×10^6 células por tubo num volume final de $100 \mu\text{L}$ de PBS. Os neutrófilos foram incubados com $3\text{-}5 \mu\text{L}$ dos anticorpos por 30 min a 4°C , na ausência de luz. Em seguida, estas células foram lavadas com $500 \mu\text{L}$ de PBS, fixadas em $0,5\text{mL}$ de paraformaldeído 1% e conservadas a 4°C , ao abrigo de luz, até a aquisição pelo citômetro.

Estas células foram analisadas no aparelho FACScalibur Becton-Dickinson SSC/FSC (*side scatter/forward scatter*) em comprimento de onda igual a 488nm . “*Dot plots*” foram utilizados para identificar a população de neutrófilos. Células incubadas com um anticorpo IgG isotípico foram utilizadas como controles negativos. Os resultados foram expressos como média de intensidade de fluorescência (MIF) que demonstra a média da quantidade, em unidades de fluorescência, da subunidade de integrina e da selectina expressa na superfície de cada célula, relativa às células incubadas com o anticorpo controle negativo e % de células positivas para cada marcador celular.

3.2.7 PCR quantitativo em tempo real

3.2.7.1 Extração de RNA

A extração do RNA de neutrófilos (5×10^6 células/mL) foi feita com Trizol (Invitrogen, CA, USA), segundo as instruções do fabricante.

A integridade das amostras foi verificada por eletroforese em gel desnaturante de agarose a 1,2%. As amostras íntegras apresentaram duas subunidades ribossômicas: 18 S e 28 S. Após a eletroforese, as amostras de RNA foram armazenadas em freezer -80°C.

3.2.7.2 Síntese de DNA complementar (DNAc)

A leitura do RNA total foi feita em espectrofotômetro a 230nm (NanoDrop® ND - 1000 NanoDrop Technologies, Wilmington). As amostras de RNA obtidas foram tratadas com a enzima DNaseI para remoção de DNA contaminante. A transcrição reversa para o DNAc é realizada utilizando-se o kit SuperScriptIII RT™ (Invitrogen, Life Technologies).

Para transcrição, foi utilizado 5µg de RNA que foram inicialmente tratados com a adição de 1µL de 1u/µL DNase I, 1µL de 10x DNase I *Reaction Buffer* (200mM Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, 500 mM KCl) e água suficiente para um volume final de 10µL de reação. As amostras foram incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente e a reação bloqueada com a adição de 1µL de 25 mM EDTA, com posterior incubação por 5 minutos a 65°C.

Após essa etapa, iniciou-se a síntese do DNA complementar com a adição de 1µL de 50µM oligo (dT) e 1µL de 10mM dNTP's. As amostras foram incubadas por 5 minutos a 65°C e em seguida por 1 minuto a 4°C. Para cada amostra, adicionamos 10µL da seguinte mistura de reação: 2µL de 10xRT *buffer*, 4µL de 25 mM MgCl₂, 2µL de 0,1 M DTT, 1µL de 40U/µL Rnase OUT™ e 1µL de 200 U/µl Superscript III RT™. A reação ocorreu por 50 minutos a 50°C, seguida de 15 minutos a 75°C.

3.2.7.3 Verificação da síntese de DNA complementar

A verificação da síntese de DNAc foi feita através da reação de polimerase em cadeia (PCR) para o gene da beta-actina (β-actina). As reações de PCR foram realizadas com: 5µL de 10x PCR *buffer* (20mM Tris-HCl, 500mM KCl), 1,5µL de 50mM MgCl₂, 1µL de 10mM dNTP's, 1µL de 10mM de *primer* BAC_F (5' – AAGAGATGGCCACGGCTGCT – 3'), 1µL de 10mM de *primer* BAC_R (5' – TCGCTCCAACCGACTGCTGT – 3'), 0,5µL de Taq DNA polimerase, 1µL de DNAc e 39µL de água, para um volume final de 50µL. O programa foi iniciado por 2 minutos à 94°C, seguido de 35 ciclos: 94°C/30 segundos, 58°C/45 segundos e 72°C/40 segundos, sendo finalizado por 72°C/7 minutos. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese

em gel de agarose 1,5% para verificar a amplificação de um fragmento de 640 pares de base (pb).

3.2.7.4 Desenho dos *primers* para a reação de PCR quantitativo em tempo real

Os *primers* utilizados nas reações de PCR quantitativo em tempo real foram desenhados com o uso do site www.invitrogen.com e com o *software* “Primer Express” (Applied Biosystems). Os fragmentos desenhados foram submetidos ao programa *Blast* (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) para confirmar homologia com o gene de interesse. A formação de estruturas como *hairpins* e *dimers* também foram avaliadas através do programa Gene Runner. Os *primers* utilizados neste estudo estão listados no Quadro 2.

3.2.7.5 Concentração dos *primers*

Em PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), a concentração ideal de *primer* a ser utilizada deve ser a mínima suficiente para permitir a duplicação de todas as cópias do material a cada ciclo de reação. Para isso, utilizando a mesma quantidade de amostra, foram feitas reações contendo cada um dos *primers* (sense e anti-sense) nas concentrações finais de 150nM, 300nM, 600nM e 900nM.

A concentração ideal foi aquela em que o gene de interesse obteve o menor valor de Ct (ciclo *threshold*), ou seja, foi a concentração em que o gene foi amplificado mais precocemente. No Quadro 2 estão listadas as concentrações dos *primers* utilizados na amplificação dos genes de estudo.

Quadro 2: Sequência dos primers utilizados, tamanho do fragmento amplificado e concentração ótima utilizados para amplificação dos genes das moléculas de adesão

Gene	Primers	Tam. do fragmento amplificado	Conc. ótima
L-selectina – F L-selectina – R	5'– GGTCAAATCCTAGTCCAATATGTCA –3' 5'– CATGACTGCCACTGGAATGAAG –3'	98pb	300nM
LFA-1 – F LFA-1 – R	5'– GCTTGTCATTACCAGACGGTTC –3' 5'– AACATCCCTAGGTCCTGAGACTAC –3'	107pb	300nM
MAC-1 – F MAC-1 – R	5'–TGCCCTCTCACTCCGACTTT –3' 5'– AACATCCCTAGGTCCTGAGACTAC –3'	81pb	300nM
Beta-actina – F Beta-actina – R	5'– AAAGAGATGGCCACGGCTGCT –3' 5'– TCGCTCCAACCGACTGCTGT –3'	79pb	150nM
GAPDH – F GAPDH – R	5'– GCACCGTCAAGGCTGAGAAC –3' 5'– CCACTTGATTTTGGAGGGATCT –3'	89pb	150nM

Legenda: F- primer forward, R- primer reverse

3.2.7.6 Eficiência da reação

A reação de PCR em tempo real precisa ser confiável e reprodutiva. Para isso são necessárias condições ótimas de reação, em que as amplificações apresentem 100% de eficiência a cada ciclo da reação de PCR. A eficiência de amplificação é obtida através da fórmula $10^{(-1/slope)}$, em que *slope* é derivado da inclinação da curva, e esse valor quando aplicado a fórmula de eficiência, tem que ser próximo de 2, significa que a cada ciclo de amplificação o material genômico está sendo duplicado e é equivalente a 100% de eficiência (Meijerink *et al.*, 2001). Veja Figura 4.

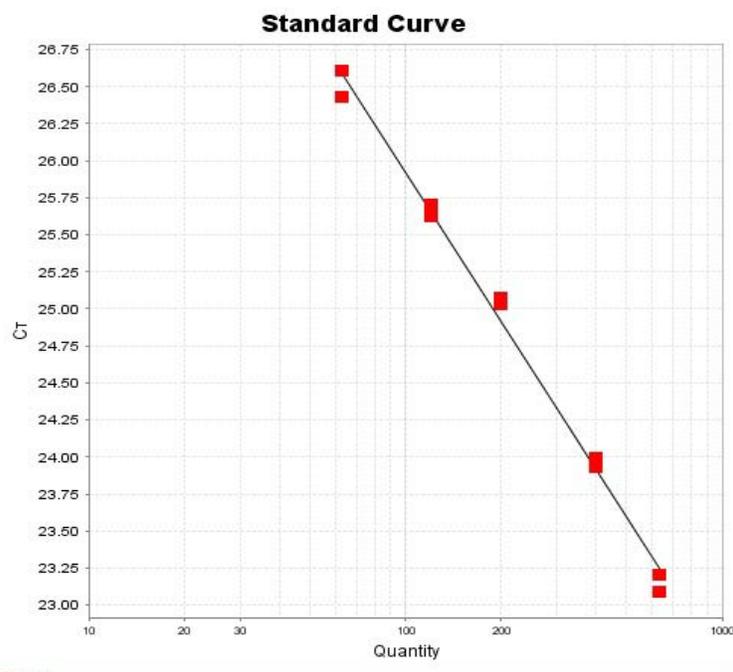


Figura 4: Análise da eficiência de amplificação do primer da L-selectina (CD62L).

3.2.7.7 Técnica da PCR quantitativa em tempo real (real-time PCR)

A PCR em tempo real é uma técnica utilizada para a avaliação da expressão gênica. A expressão é dita relativa porque leva em consideração também a expressão de controles endógenos como beta actina e GAPDH. A técnica consiste no monitoramento óptico da fluorescência emitida durante a reação de PCR (Higuchi *et al.*, 1993), através da ligação de uma sonda específica ou um corante, na fita recém sintetizada.

As amostras de cDNAs utilizadas na reação de qRT-PCR foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoDrop[®], 260nm). As reações foram feitas em duplicatas utilizando como sistema de detecção o reagente Platinum[®]SYBR[®]Green qPCR Super Mix-UDG with ROX (Invitrogen Co.), que além de conter todos os reagentes necessários para PCR (dNTP's, MgCl₂, tampão, Taq Dna-polimerase), contém o corante SYBR Green: uma molécula que emite maior quantidade de sinal fluorescente ao intercalar com DNA dupla fita, e com ROX: um estabilizador de fluorescência. Para cada gene analisado foram utilizados *primers* específicos.

A detecção da amplificação em tempo real foi realizada no equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems, USA) em gráficos de fluorescência versus número de ciclos.

Quanto maior a expressão de um determinado gene, isto é, quanto mais cópias existirem dele no início da reação, mais precocemente ocorrerá a amplificação e consequentemente, menor será o Ct.

Todas as amostras foram ensaiadas em 12 μ L de volume final; sendo 6 μ L do reagente SYBR Green with ROX®, 10ng para os genes de interesse e a concentração ótima de *primer* determinada. Em todas as placas continham controles negativos (NTC) para cada *primer* avaliado, que foram poços contendo água estéril em substituição à amostra. As reações foram realizadas em placas de 96 poços (Sorenson, BioScience Inc.) com tampas plásticas que permitem a passagem da luz. O programa foi iniciado a 95°C/10 minutos, seguido de 40 ciclos: 95°C/15 segundos e 60°C/1 minuto.

Ao final de uma aplicação normal adiciona-se um passo de 20 minutos, em que a temperatura aumenta gradualmente de 60° para 95°C. À medida que os produtos gerados por PCR desnaturam com o aumento de temperatura, cai o sinal fluorescente do SYBR Green. O gráfico resultante permite verificar se há um ou mais produtos de PCR presentes em cada reação, devido a diferenças de Tm (temperatura de *melting*) entre os produtos de PCR causadas pelo número e composição de bases de cada produto. A representação da curva de dissociação está apresentada na Figura 5.

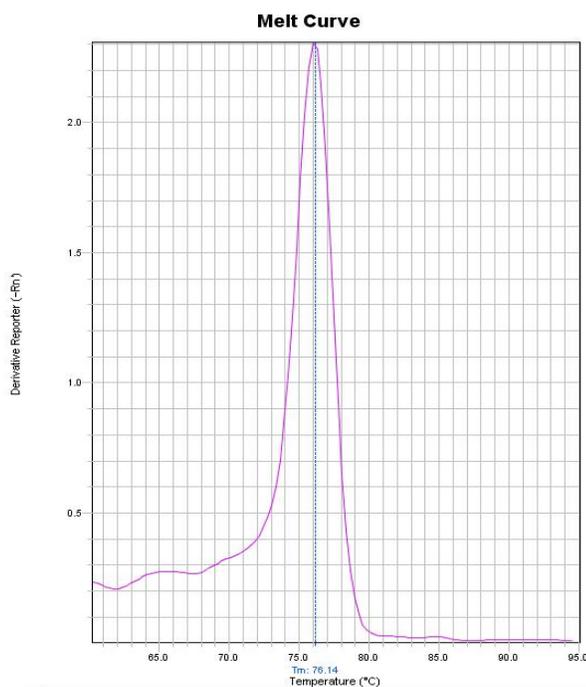


Figura 5: Curva de dissociação do primer da L-selectina (CD62L)

3.2.7.8 Análise dos dados de PCR em tempo real

A expressão dos genes de interesse foi determinada de forma relativa, ou seja, os valores de expressão são normalizados em relação a genes chamados de “controles endógenos”. Neste trabalho foi utilizado o gene da Beta actina (β -actina) e GAPDH, que são genes cuja expressão é dita constitutiva, ou seja, apresentam pouca variação entre diversas condições (Vandesompele *et al.*, 2002).

Os valores de Ct de cada gene foram obtidos em duplicata, dessa forma, foram calculadas as médias aritméticas destas, para cada amostra que teve um determinado gene estudado. Em seguida foi obtido o valor de delta Ct (Δ Ct), que consistiu na subtração do menor Ct de um gene de uma determinada amostra com os demais Cts desse mesmo gene de outras amostras estudadas. O próximo cálculo foi o de “Q”, valor que corresponde a $2^{\Delta Ct}$.

Os valores de Q dos genes Beta actina e GAPDH de cada amostra analisada foram submetidos ao programa geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002), que calculou a média geométrica entre eles, valor este denominado de Fator de Normalização da amostra. A expressão normalizada de um dado gene de interesse em uma determinada amostra foi dada pela razão entre o valor de Q do gene de interesse da amostra pelo fator de normalização da amostra. O valor obtido foi expresso em unidades arbitrárias (UA) ou valor absoluto de expressão.

3.3 Análise estatística

Os resultados são apresentados como médias \pm erro da média em todos os experimentos. Os grupos de pacientes em uso de medicações diferentes e controles foram comparados pelos testes paramétricos ANOVA, seguidos pelo teste de Bonferroni, quando as médias passaram pelo teste de normalidade, assumindo distribuição *Gaussiana*; o teste *t não pareado* para as comparações entre dois grupos de indivíduos diferentes. Quando os valores não foram paramétricos, foi realizado o teste de Kruskal Wallis, seguido pelo teste de Dunn para comparações de 3 grupos ou mais, ou o teste de Mann Whitney para a comparação dos níveis das quimiocinas entre dois grupos. Para avaliar os efeitos de adesão ou migração com e sem estímulo de uma mesma amostra foi realizado o teste *t pareado*.

Os gráficos foram obtidos utilizando o programa GraphPad Prism 4 (*GraphPad Software, Inc.*) e os cálculos foram efetuados no programa Graphpad INSTAT (*GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA*). Os valores de *p* menores ou igual a 0,05 foram considerados como estatisticamente significantes.

4. Resultados

4.1 Características dos indivíduos incluídos no estudo

Nas tabelas 2 e 3 estão representadas as características dos indivíduos controle e pacientes incluídos neste estudo, em que é possível visualizar o número de indivíduos, sexo e média de idade, VHS (velocidade de hemossedimentação) e DAS 28 (índice de atividade da AR). O VHS e DAS 28 foram avaliados apenas nos grupos de pacientes com AR em atividade da doença. Todos os indivíduos sem atividade da AR apresentaram DAS28<2,6, considerados em remissão do quadro inflamatório da doença por um médico reumatologista. Estes pacientes em remissão apresentaram média de idade de 55,7 (30; 56; 75 – mínima; mediana; máxima, respectivamente) no grupo de pacientes em tratamento com DMARDs, e média de 55 anos (36; 59; 68 – mínima; mediana; máxima, respectivamente) no grupo de pacientes em terapia com agentes biológicos e não houve diferença estatisticamente significativa de idade entre estes grupos ($p>0,05$). A idade dos controles foi estatisticamente menor ($p<0,001$) comparada à idade dos pacientes com AR (Tabela 2), mas não foram apresentadas diferenças significativas entre os dados clínicos e a idade dos pacientes em atividade, divididos em grupos de acordo com o tratamento (Tabela 3).

Tabela 2: Características de controles e pacientes com artrite reumatoide com/sem atividade da doença

	Controles	Pacientes AR em atividade da doença	Pacientes AR sem atividade da doença
N (nº indivíduos)	108	103	20
Sexo (Fem/Masc)	50/58	91/12	16/4
Idade (anos)	36,1^{***} (21;32;62)	49,7 (26;51;72)	55,5 (30;57;75)

*Valores de idade expressos em média (mínima ; mediana ; máxima). *** $p<0,001$, entre a média de idade dos controles comparados a pacientes AR, de acordo com ANOVA.*

Tabela 3: Idade, DAS 28 e VHS de pacientes com AR em atividade, separados em grupos de acordo com o tipo de medicação

	AR nt	AR dm	AR ab
Idade (anos)	52,7 (29;52;72)	48,3 (26;49;71)	49,7 (35;51;67)
DAS 28	5,3 (3,5;5,2;7,0)	4,9 (3,5;4,8;7,5)	5,1 (3,4;5,1;6,3)
VHS	45,6 (2;33;120)	50 (8;47;115)	42 (6;37;90)

Resultados expressos em média (mínima ; mediana ; máxima). $P > 0,05$, de acordo com ANOVA.

4.2 Ensaio de adesão celular estática *in vitro*

4.2.1 Propriedades adesivas dos neutrófilos de controles e de pacientes com artrite reumatoide

As propriedades adesivas dos neutrófilos foram avaliadas em pacientes com artrite reumatoide (com ou sem atividade da doença) e comparadas à adesão de neutrófilos de indivíduos controle, através do ensaio de adesão celular estática *in vitro*, utilizando fibronectina (FN) como ligante. Foi realizada a adesão de neutrófilos (2×10^6 cls/mL) sem estímulo e com estímulo inflamatório (neutrófilos foram incubados com 500 ng/mL de IL-8 antes do ensaio de adesão). No grupo de pacientes com AR sem atividade, observou-se uma menor porcentagem de adesão de neutrófilos, quando na ausência de estímulo inflamatório, que foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) ao comparar-se com o grupo de pacientes com atividade (Figura 6 A).

Nos grupos controle (Con) e pacientes AR em atividade (AR ativ) foi observado um aumento significativo ($p < 0,001$) nas propriedades adesivas após co-incubação com IL-8 (Figura 6 B); e, de modo interessante, este aumento não foi visto nos neutrófilos de pacientes com AR sem atividade.

4.2.2 Propriedades adesivas dos neutrófilos de pacientes com AR em atividade sob diferentes medicações

As propriedades adesivas de neutrófilos à FN foram avaliadas em pacientes com AR em atividade da doença e divididos em grupos de acordo com o tipo de medicação: pacientes com AR sem tratamento com drogas direcionadas para a doença (AR nt), pacientes AR tratados com drogas modificadoras da doença (AR dm) e pacientes AR

tratados com agentes biológicos (AR ab). Não houve diferença de adesão à fibronectina, tanto nos neutrófilos sem estímulo (Figura 7 A) quanto nos neutrófilos estimulados por IL-8 (Figura 7 B), entre os diferentes grupos de pacientes com AR analisados.

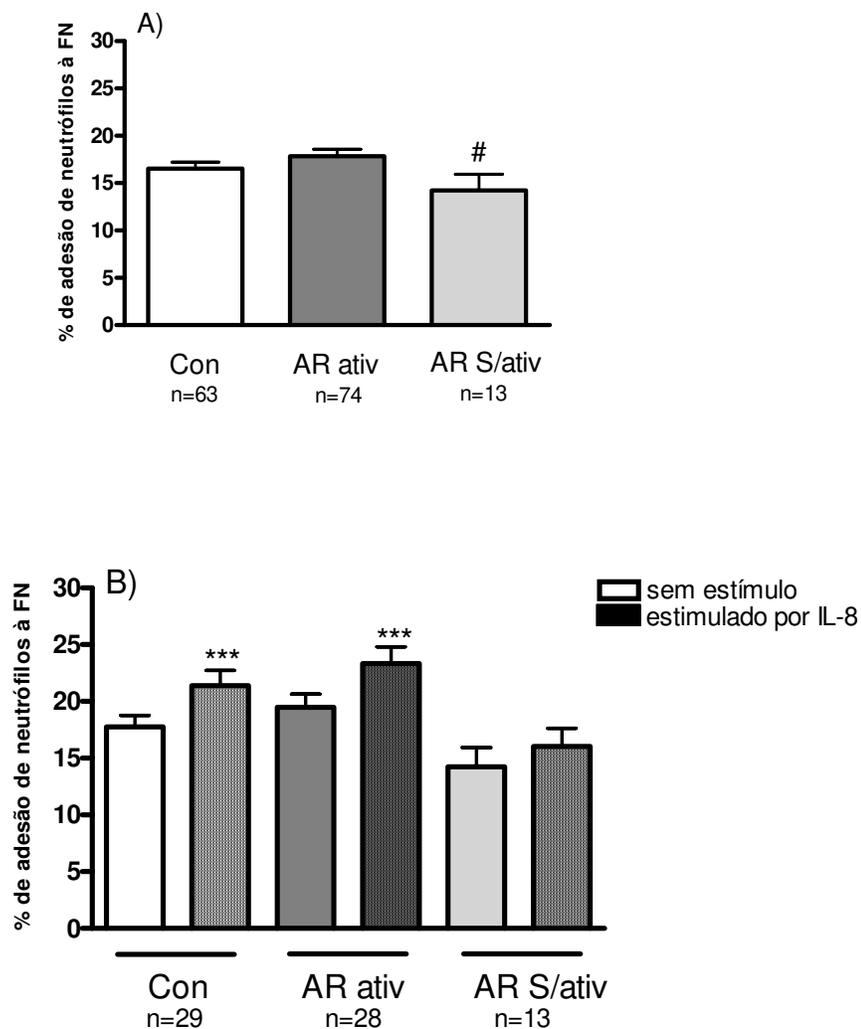


Figura 6: Adesão de neutrófilos de controles (Con), pacientes com AR em atividade (AR ativ) e pacientes com AR sem atividade (AR S/ativ) na ausência de estímulo (A) e sem/com estímulo 500ng/mL de IL-8 (B). Neutrófilos foram incubados por 30 minutos à 37°C, em estufa a 5% CO₂, em placas previamente cobertas com FN (20µg/ml). Resultados expressos em média ± erro da média. #p<0,05, comparando AR ativ e AR S/ativ, por *teste de Bonferroni*; ***p<0,001, entre sem/com estímulo de IL-8, por *teste t pareado*.

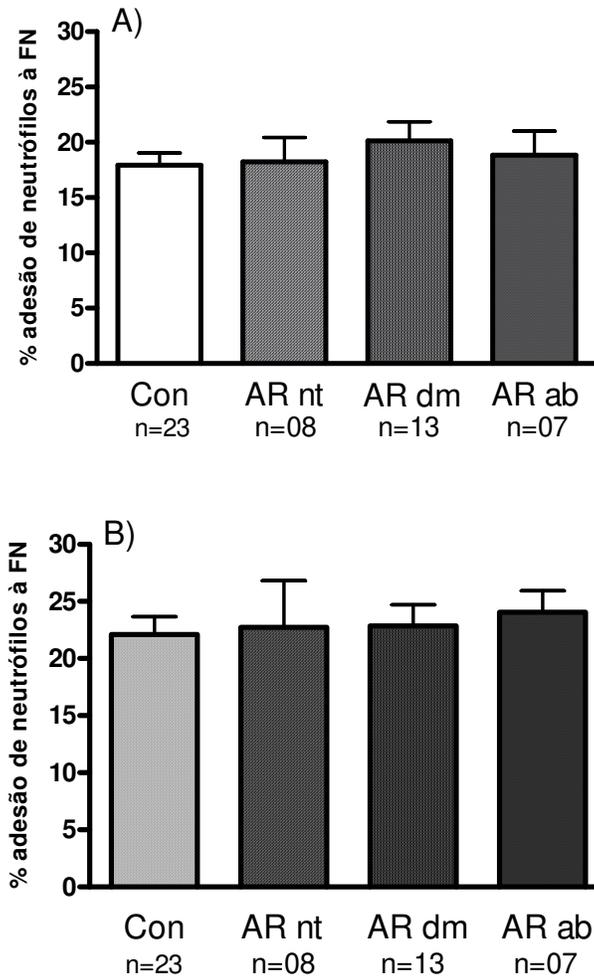


Figura 7: Adesão de neutrófilos de controles (Con), pacientes com AR em atividade não tratados (AR nt), pacientes com AR tratados com DMARDs (AR dm) e pacientes com AR tratados com agentes biológicos (AR ab), na ausência de estímulo (A) e estimulados por 500ng/mL de IL-8 (B). Neutrófilos foram incubados por 30 minutos à 37°C, em estufa a 5% CO₂, em placas previamente cobertas com FN (20µg/ml). Resultados expressos em média ± erro da média. Valor de $p > 0,05$, determinado por ANOVA.

4.2.3 Propriedades adesivas dos neutrófilos de pacientes com AR em remissão da doença sob diferentes medicações

As propriedades adesivas de neutrófilos à FN foram avaliadas também em pacientes com AR sem atividade da doença (DAS 28 < 2,6) e agrupados de acordo com o tipo de medicação: pacientes AR tratados com drogas modificadoras (AR dm) e tratados com agentes biológicos (AR ab). Observa-se uma reduzida porcentagem de adesão dos neutrófilos, na ausência de estímulo por IL-8, no grupo de pacientes em tratamento com anticorpos contra o TNF- α comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). Apesar disso, não houve diferença significativa na porcentagem de adesão destes neutrófilos à FN, quando estimulados por IL-8 (Figura 8 B) entre os dois grupos de pacientes com AR analisados e grupo controle.

4.3 Ensaio de quimiotaxia celular *in vitro*

4.3.1 Quimiotaxia de neutrófilos de indivíduos controle e de pacientes com artrite reumatoide

A migração de neutrófilos de pacientes com artrite reumatoide e controles foi avaliada sem estímulo quimiotático, utilizando meio RPMI sem células, e com estímulo do quimioatraente IL-8 na concentração de 100ng/mL, pelo ensaio de migração celular *in vitro* em câmara quimiotática de 96 poços. Com relação às propriedades quimiotáticas dos neutrófilos, houve redução significativa da migração, na ausência de estímulo quimiotático, no grupo de pacientes com AR em remissão da doença comparado ao grupo de pacientes em atividade (Figura 9 A), enquanto que na presença do estímulo de IL-8, não foram observadas diferenças entre a migração dos neutrófilos dos pacientes com ou sem atividade quando comparado ao controle. Além disso, IL-8 foi capaz de aumentar significativamente ($p < 0,05$) estas propriedades quimiotáticas em todos os grupos comparadas à migração sem estímulo (Figuras 9 B e C).

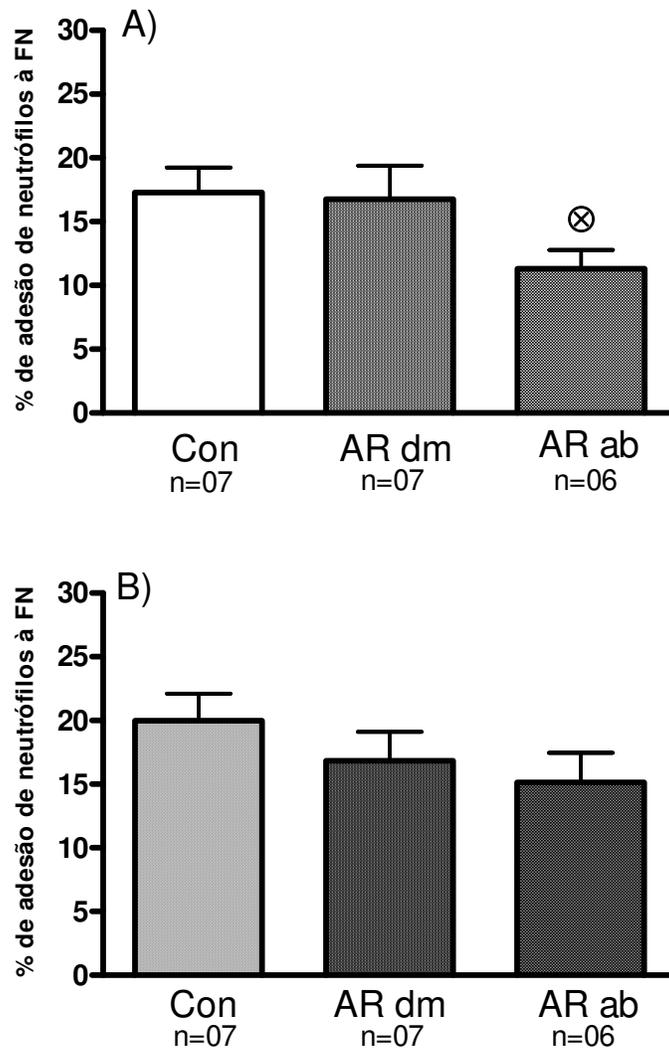


Figura 8: Adesão de neutrófilos de controles (Con), pacientes com AR sem atividade tratados com DMARDs (AR dm) e pacientes tratados com agentes biológicos (AR ab), sem a presença de estímulo (A) e estimulados por IL-8 (B). Neutrófilos foram incubados por 30 minutos à 37°C, em estufa a 5% CO₂, em placas previamente cobertas com FN (20µg/ml). Resultados expressos em média ± erro da média. [⊗]p<0,05, comparado ao grupo controle, determinado por Kruskal-Wallis, seguido de *Dunn* (não-paramétrico).

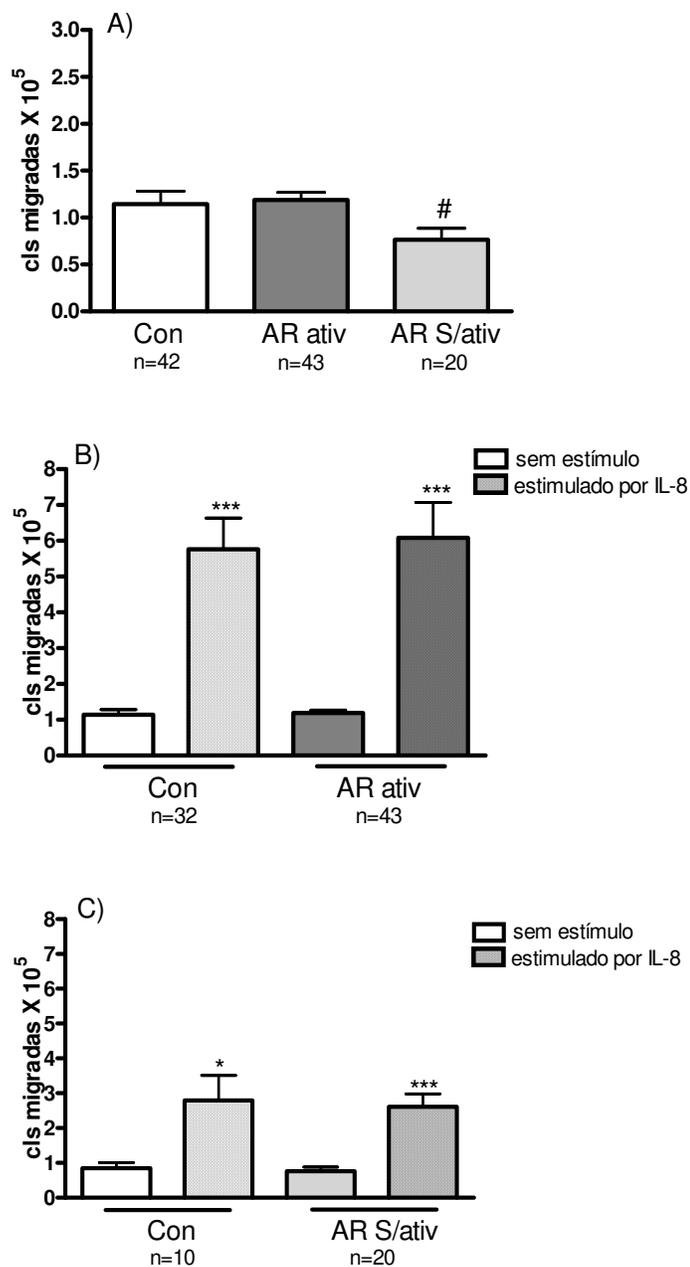


Figura 9: Migração de neutrófilos na ausência de estímulo (A), sem e com estímulo por 100ng/mL de IL-8 de controle (Con) e pacientes com AR em atividade (AR ativ) (B) e de controle (Con) e pacientes com AR sem atividade (AR S/ativ) (C), realizada por ensaio de quimiotaxia *in vitro*. Neutrófilos foram incubados por 120 minutos à 37°C, em estufa a 5% CO₂. Resultados expressos em média ± erro da média. #p<0,05 entre AR ativ e AR S/ativ, por teste de Bonferroni; *p<0,05 e ***p<0,001, entre sem/com estímulo de IL-8 por teste *t* pareado.

4.3.2 Quimiotaxia de neutrófilos de pacientes com artrite reumatoide em atividade da doença em uso de diferentes medicações

As propriedades migratórias de neutrófilos foram avaliadas em controle e pacientes com artrite reumatoide em atividade, separados em grupos de acordo com o tipo de medicação. A migração foi avaliada pelo ensaio de quimiotaxia *in vitro*, na ausência e presença de estímulo quimiotático (IL-8, 100ng/mL). Não foram observadas diferenças significativas quanto à migração sem estímulo de quimioatraente entre os grupos (Figura 10 A). No entanto, quando houve estímulo quimiotático observou-se aumento significativo ($p < 0,05$) da migração de neutrófilos de pacientes em tratamento com agentes biológicos (anti-TNF- α) comparado ao grupo de pacientes sem tratamento específico para a doença (Figura 10 B). Em todos os grupos foi observado aumento significativo da migração com o estímulo quimiotático da IL-8, comparado a migração na ausência de estímulo (Figura 10 C).

4.3.3 Quimiotaxia de neutrófilos de pacientes com artrite reumatoide em remissão do estado inflamatório da doença

As propriedades migratórias de neutrófilos foram avaliadas em controles e pacientes com artrite reumatoide em remissão da doença, separados em grupos de acordo com o tipo de tratamento a que estavam submetidos: DMARDs ou agentes biológicos. A migração foi avaliada na ausência e presença de estímulo quimiotático (IL-8, 100ng/mL). Não foram observadas diferenças significativas com relação à migração sem ou com estímulo de quimioatraente entre os grupos (Figura 11 A e B, respectivamente). Em todos os grupos foi observado aumento significativo ($p < 0,05$) da migração quando houve estímulo quimiotático (Figura 11 C).

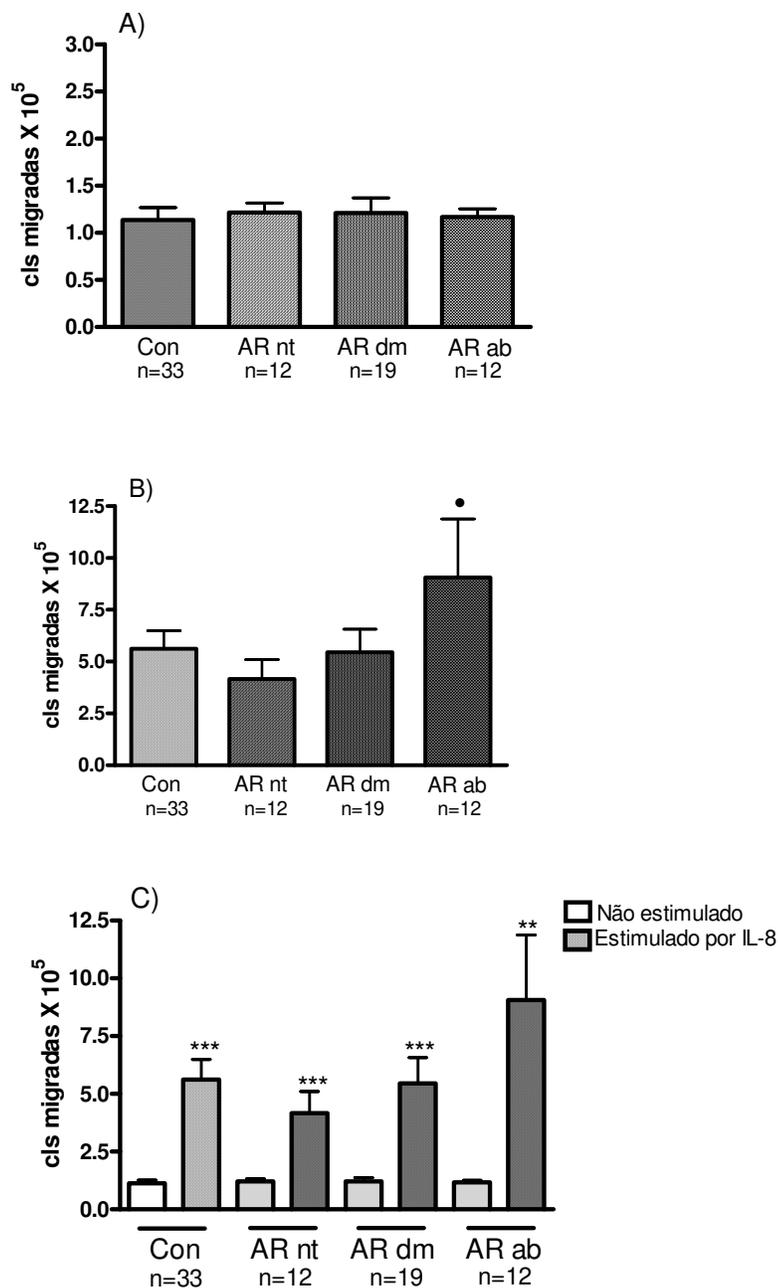


Figura 10: Migração de neutrófilos sem estímulo (A), estimulados por 100ng/mL de IL-8 (B) e sem/com estímulo de IL-8 (C), de controles (Con), pacientes com AR em atividade não tratados (AR nt), pacientes AR tratados com DMARDs (AR dm) e pacientes AR tratados com agentes biológicos (AR ab), realizada por ensaio de quimiotaxia celular *in vitro*. Neutrófilos foram incubados por 120 minutos à 37°C, em estufa a 5% CO₂. Resultados expressos em média ± erro da média. • p<0,05 comparado ao grupo AR nt, pelo teste de Bonferroni; **p<0,01 e ***p<0,001, entre sem/com estímulo de IL-8 por teste *t* pareado.

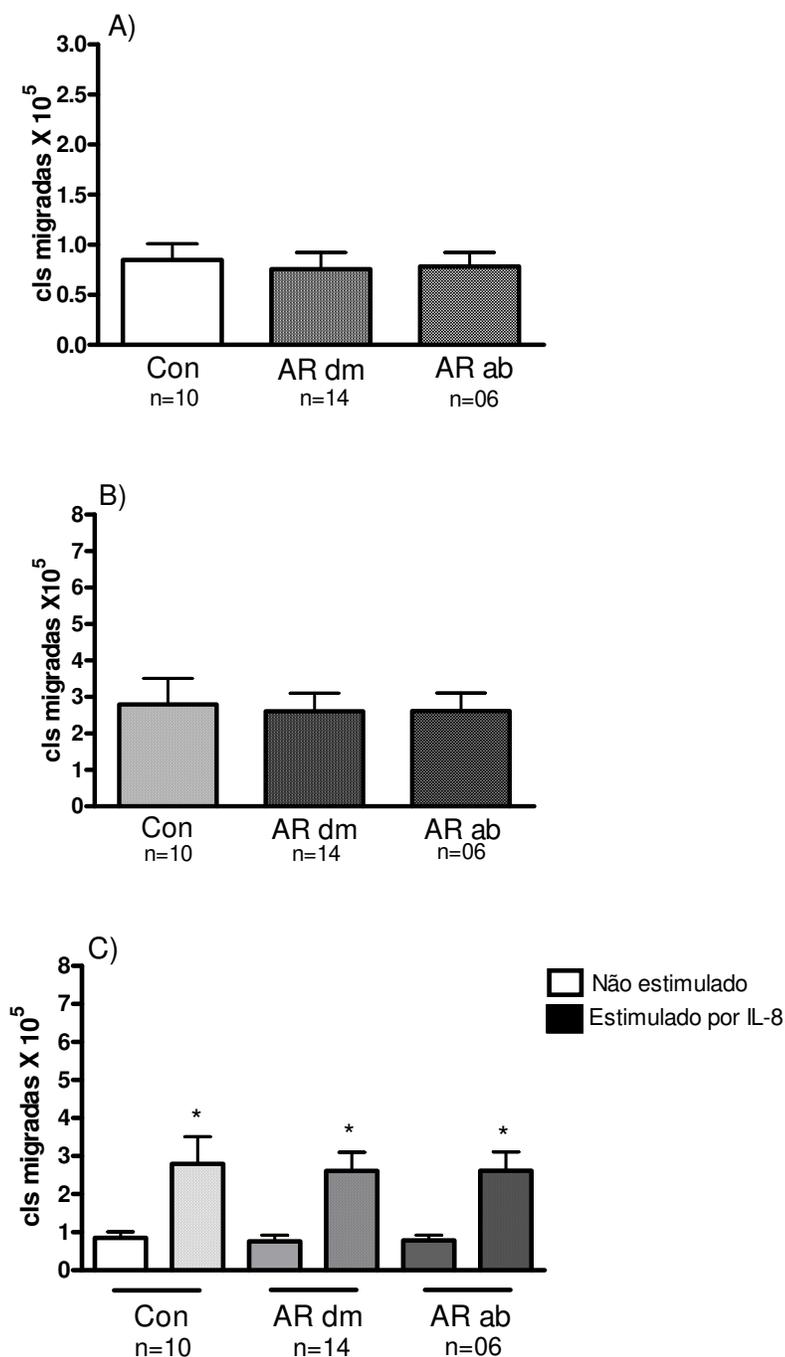


Figura 11: Migração de neutrófilos sem estímulo (A) e estimulada por IL-8 (B), de controles (Con), pacientes com AR sem atividade tratados com DMARDs (AR dm) e pacientes tratados com agentes biológicos (AR ab), realizada por ensaio de quimiotaxia celular *in vitro*. Neutrófilos foram incubados por 120 minutos à 37°C, em estufa a 5% CO₂. Resultados expressos em média ± erro da média. * p<0,05, entre sem/com estímulo de IL-8, por teste *t* pareado.

4.4 Expressão gênica de L-selectina, LFA-1 e Mac-1, determinada por PCR quantitativo em tempo real

4.4.1 Expressão gênica da molécula de adesão L-selectina (CD62L) e das subunidades alfa das integrinas LFA-1 (CD11a) e Mac-1 (CD11b) em controle e pacientes com AR em atividade

A expressão relativa dos genes das principais moléculas envolvidas no processo adesivo e quimiotático de neutrófilos: L-selectina (CD62L) e das subunidades alfa das integrinas LFA-1 (CD11a/CD18) e Mac-1 (CD11b/CD18), foram determinadas por PCR quantitativo em tempo real, que quantificou o RNA mensageiro nos neutrófilos do grupo controle e de pacientes com AR em atividade, em relação à expressão dos RNAm de genes endógenos constitutivos: beta actina (BAC) e GAPDH. Foi observado que o gene da L-selectina está significativamente mais expresso ($p < 0,05$) em pacientes com AR comparado aos indivíduos controle. Com relação às subunidades das integrinas, não foram observadas diferenças significativas entre pacientes e controle (Figura 12).

4.4.2 Expressão gênica de L-selectina, LFA-1 e Mac-1 em pacientes com AR em atividade sob diferentes medicações

As expressões gênicas de L-selectina (Figura 13 A), LFA-1 (Figura 13 B) e Mac-1 (Figura 13 C) foram avaliadas em neutrófilos de pacientes com AR em atividade, separados de acordo com o tipo de tratamento medicamentoso a que estavam submetidos, e comparada a expressão gênica de indivíduos controles. O grupo de pacientes com AR tratados com agentes biológicos (AR ab) apresentou expressão gênica significativamente aumentada ($p < 0,05$) de L-selectina (CD62L) comparada ao controle, conforme pode ser visto na figura 13 A. As subunidades das integrinas avaliadas não demonstraram diferenças de expressões gênicas entre os grupos avaliados (Figura 13 B e C).

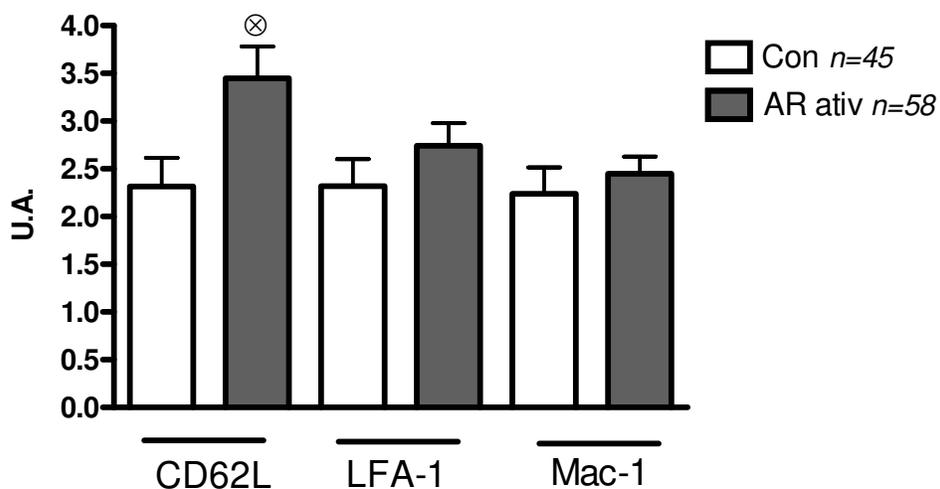


Figura 12: Expressão relativa dos genes da L-selectina (CD62L) e das subunidades alfa das integrinas LFA-1 e Mac-1, em relação aos genes de BAC e GAPDH (controles endógenos), determinada por *Real Time PCR*. RNAm obtido de neutrófilos de controles (Con) e pacientes com AR em atividade (AR ativ). Valores expressos em unidades arbitrárias de expressão (U.A.) \pm erro médio padrão. [⊗] $p < 0,05$, entre AR *ativ* e Con, por teste *t* não pareado e correção de Welch.

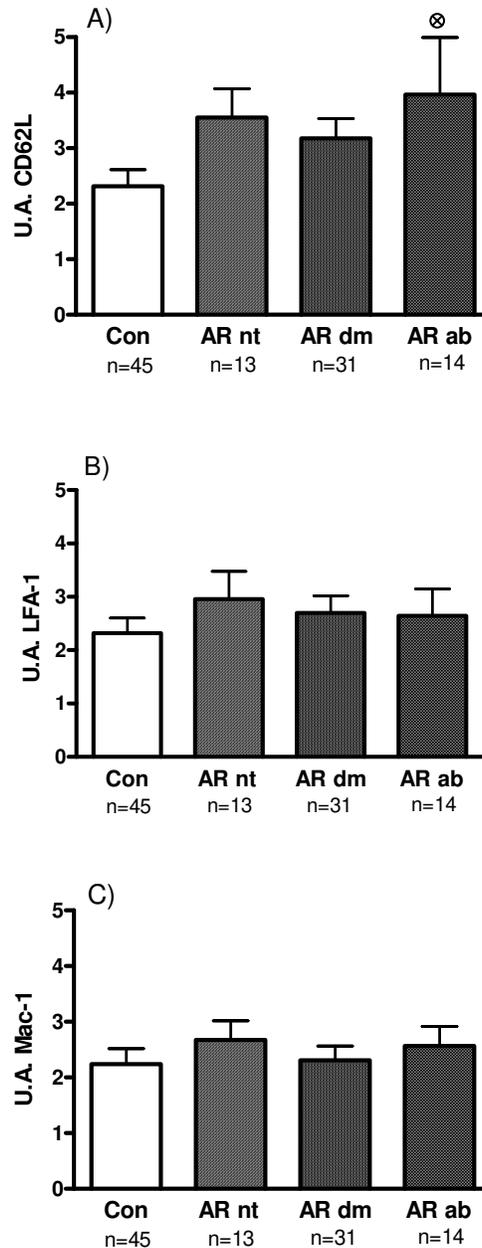


Figura 13: Expressão relativa dos genes da L-selectina (A) e das subunidades alfa das integrinas LFA-1 (B) e Mac-1 (C), em relação aos genes endógenos de BAC e GAPDH. RNAm obtido de neutrófilos de controles (Con) e pacientes com AR em atividade não tratados (AR nt), pacientes tratados com DMARDs (AR dm) e pacientes tratados com agentes biológicos (AR ab), determinada por *Real Time PCR*. Os valores estão representados como unidades arbitrárias de expressão (U.A.) \pm erro médio padrão. [⊗] $p < 0,05$ comparado ao controle, pelo *teste de Bonferroni*.

4.5 Avaliação da expressão das proteínas de superfície L-selectina, LFA-1 e Mac-1 por citometria de fluxo

4.5.1 Expressão das proteínas L-selectina, LFA-1 e Mac-1 em neutrófilos de pacientes com artrite reumatoide e indivíduos controle

A expressão de L-selectina (CD62L) e das subunidades alfa das integrinas LFA-1 (CD11a/CD18) e Mac-1 (CD11b/CD18) na superfície de neutrófilos, foi determinada por citometria de fluxo. O resultado foi expresso como média de intensidade de fluorescência (MIF) dos neutrófilos positivos para o marcador fluorescente destas proteínas. O grupo de pacientes com AR ativa não demonstrou diferenças quanto à expressão destas proteínas na superfície dos neutrófilos, quando comparados ao grupo controle. Entretanto, os neutrófilos de pacientes com AR sem atividade da doença expressaram menor quantidade de L-selectina e LFA-1 comparado ao grupo controle ($p < 0,01$) e pacientes em atividade ($p < 0,05$) (Figura 14). Não houve diferenças quanto à expressão da subunidade alfa de Mac-1 na superfície dos neutrófilos entre os grupos controle e pacientes com e sem atividade da doença.

A expressão destas proteínas também foi avaliada separadamente, de acordo com o tipo de medicação a que os pacientes AR estavam submetidos, conforme pode ser visto na Tabela 3. Nela, estão representadas as médias de intensidade de fluorescência (MIF) dos neutrófilos positivos para a marcação e a porcentagem de neutrófilos que expressam estas moléculas (*% posit ± SEM*), dos grupos controle, pacientes com AR em atividade da doença e pacientes com AR sem atividade, divididos em grupos de acordo com medicação: não tratados (nt), tratados com DMARDs (dm) e tratados com agentes biológicos (ab). Podemos observar expressão reduzida de CD62L em neutrófilos de pacientes com AR sem atividade da doença comparada aos grupos de pacientes em atividade sem tratamento específico e controles, porém essa redução é significativa apenas no grupo de pacientes em tratamento com DMARDs ($p < 0,05$). Além disso, também pode ser visto com relação a esta molécula, que o grupo de pacientes sem atividade e em tratamento com agentes biológicos apresenta menor porcentagem de neutrófilos que expressam esta proteína comparada aos grupos de pacientes em atividade e controles ($p < 0,05$).

Com relação à subunidade da integrina LFA-1, pode-se observar que sua expressão ocorre em 99% dos neutrófilos. Apesar disso, verifica-se menor expressão desta proteína,

em cada neutrófilo analisado, no grupo de pacientes em tratamento com drogas modificadoras (AR dm) em remissão da doença, comparada ao grupo controle, pacientes em atividade não tratados e tratados com agentes biológicos ($p < 0,05$).

Observa-se aumento significativo da expressão de Mac-1 (CD11b) na superfície de neutrófilos de pacientes AR sem atividade e em tratamento com agentes biológicos, comparada aos demais grupos ($p < 0,05$).

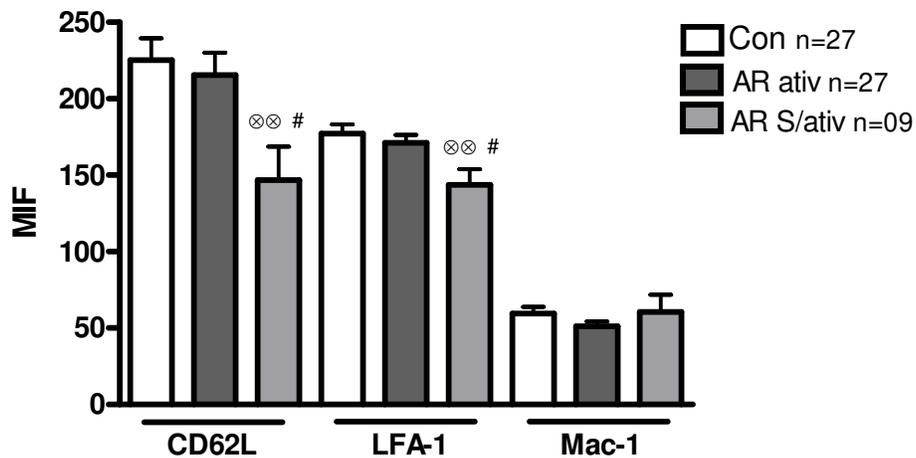


Figura 14: Expressão de superfície das proteínas CD62L, LFA-1 e Mac-1 em neutrófilos de indivíduos controle (Con), pacientes com AR em atividade (AR ativ) e pacientes com AR sem atividade (AR S/ativ), determinada por citometria de fluxo. Os resultados são expressos em MIF \pm erro da média. # $p < 0,05$ comparado ao grupo AR ativ, $\otimes\otimes p < 0,01$, comparado ao grupo Con, por ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni.

Tabela 4: Expressão das proteínas envolvidas na adesão celular: CD62L, LFA-1 e Mac-1 em neutrófilos de controles (Con), pacientes com artrite reumatoide (AR) em atividade (ativ) e pacientes com artrite reumatoide sem atividade (S/ativ) divididos em grupos de acordo com o tipo de medicação

	anti-CD62L		anti-CD11a		anti-CD11b	
	<i>MIF ± SEM</i>	<i>% posit ±SEM</i>	<i>MIF ± SEM</i>	<i>% posit ±SEM</i>	<i>MIF ± SEM</i>	<i>% posit ±SEM</i>
Con <i>n</i> =27	225.4 ± 14.0 [†]	92.6 ± 2.1*	177.2 ± 6.0 ^{##}	99.9 ± 0.01	59.43 ± 4.3 [‡]	99.2 ± 0.2
AR nt (ativ) <i>n</i> =11	240.8 ± 24.7 [†]	96.2 ± 0.9**	174.2 ± 6.7 [#]	99.9 ± 0.01	51.64 ± 6.1 [‡]	99.4 ± 0.2
AR dm (ativ) <i>n</i> =08	215.8 ± 28.6	94.2 ± 2.2*	163.7 ± 12.7	99.9 ± 0.00	50.04 ± 4.6 [‡]	99.5 ± 0.2
AR ab (ativ) <i>n</i> =08	180.5 ± 18.0	95.6 ± 1.8**	174.6 ± 9.9 [#]	99.9 ± 0.05	51.82 ± 5.1 [‡]	99.5 ± 0.3
AR dm (S/ativ) <i>n</i> =05	132.9 ± 36.6 [†]	90.6 ± 4.5	127.7 ± 9.5 ^{###}	99.8 ± 0.10	40.10 ± 3.2 [‡]	99.3 ± 0.2
AR ab (S/ativ) <i>n</i> =04	163.9 ± 21.9	77.6 ± 3.9* **	163.4 ± 15.6	99.8 ± 0.03	86.20 ± 18.2 [‡]	98.0 ± 0.8

Os resultados da expressão das moléculas de adesão estão representados como média de intensidade de fluorescência (MIF) de neutrófilos positivos para a marcação ± erro médio padrão (SEM) e porcentagem de neutrófilos positivos marcados (% posit ± SEM). As comparações em cada coluna foram feitas com o grupo marcado com símbolo em vermelho. [†]p<0.05, comparado ao grupo AR dm (S/ativ); *p<0.05 e **p<0.01, comparado ao grupo AR ab (S/ativ); # p<0.05 e ## p<0.01, comparado ao grupo AR dm (S/ativ); [‡]p<0.05, comparado ao grupo AR ab (S/ativ), por ANOVA, seguido por *teste de Bonferroni*.

4.6 Quantificação de L-selectina no soro de pacientes com artrite reumatoide e indivíduos controle

A quantificação dos níveis de L-selectina (CD62L) solúvel no soro de pacientes com AR e controle foi feita através de ensaios do tipo ELISA sanduíche, não encontrando diferenças significativas ($p > 0,05$) nos níveis séricos desta selectina em pacientes com artrite reumatoide e controle (Figura 15).

4.7 Quantificação sérica das quimiocinas IL-8 e ENA-78 em pacientes com artrite reumatoide e indivíduos controle

Sabe-se que as quimiocinas IL-8 e ENA-78/CXCL-5 atuam principalmente no recrutamento de neutrófilos e foi investigado se estes quimioatraentes estavam aumentados no soro de pacientes com artrite reumatoide sem/com atividade da doença, comparados aos indivíduos saudáveis.

A IL-8 mostrou-se elevada ($p < 0,01$) no grupo de pacientes com artrite reumatoide em atividade comparada aos grupos controle e pacientes com AR sem atividade da doença e estes últimos, apresentaram níveis desta citocina semelhantes aos níveis encontrados nos indivíduos controle (Figura 16). Em seguida, esta molécula foi quantificada no soro de pacientes com AR em atividade (grupo que apresentou níveis elevados), avaliando este mediador inflamatório em cada grupo com relação ao tipo de medicação a que estavam submetidos (Figura 17). Foram encontrados níveis elevados de IL-8 no grupo de pacientes com AR não tratados com drogas específicas (AR nt) e no grupo de pacientes tratados com DMARDs (AR dm) comparados ao controle ($p < 0,05$). Os níveis desta interleucina no grupo de pacientes com AR tratados com agentes biológicos foram semelhantes aos níveis encontrados em soros de indivíduos controle.

Nos pacientes em remissão da AR, os níveis de IL-8 no grupo em tratamento com DMARDs foram de $23,5 \pm 5,5$ pg/mL, que foram significativamente menores ($p < 0,001$ -*Mann Whitney*) comparados ao indivíduos sob este tratamento mas em atividade da doença ($118,9 \pm 25,2$ pg/mL). Adicionalmente, os pacientes em terapia com agentes biológicos apresentaram valores de $18,4 \pm 2,0$ pg/mL, aparentemente reduzidos comparados aos indivíduos sob mesma terapia ativos na AR ($45,3 \pm 15,3$ pg/mL), mas devido ao insuficiente número de dados, não foi possível realizar a análise estatística.

Com relação à quimiocina ENA-78 (peptídeo epitelial ativador de neutrófilos 78), também conhecida como CXCL-5, seus níveis foram encontrados elevados ($p < 0,05$) em pacientes com AR em atividade comparado a pacientes sem a doença ativa (Figura 18). No entanto, ao se analisar este grupo de pacientes em atividade de acordo com os grupos de medicações em que estavam incluídos, não foram encontradas diferenças significativas entre os níveis desta quimiocina comparados aos controles (Figura 19).

Contudo, analisando separadamente os grupos de tratamento nos pacientes em remissão da doença, observou-se níveis reduzidos desta quimiocina no grupo de pacientes tratados com DMARDs ($2.183 \pm 0,644$ pg/mL, $p < 0,05$ – *Mann Whitney*), assim como aparentemente também, no grupo em terapia com agentes biológicos ($1.037 \pm 0,431$ pg/mL, sem análise estatística, $n=02$), quando comparados aos indivíduos tomando a mesma medicação mas em atividade da doença ($4.016 \pm 0,492$ pg/mL e $3.140 \pm 0,548$ pg/mL, respectivamente).

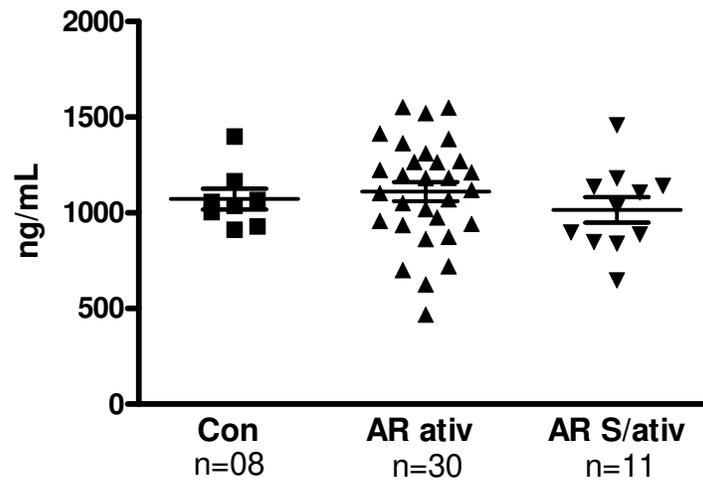


Figura 15: Quantificação sérica de CD62L (L-selectina) em controle (Con), pacientes com AR em atividade (AR ativ) e sem atividade da doença (AR S/ativ), determinada por ensaio de ELISA do tipo sanduíche. $p > 0,05$, por ANOVA.

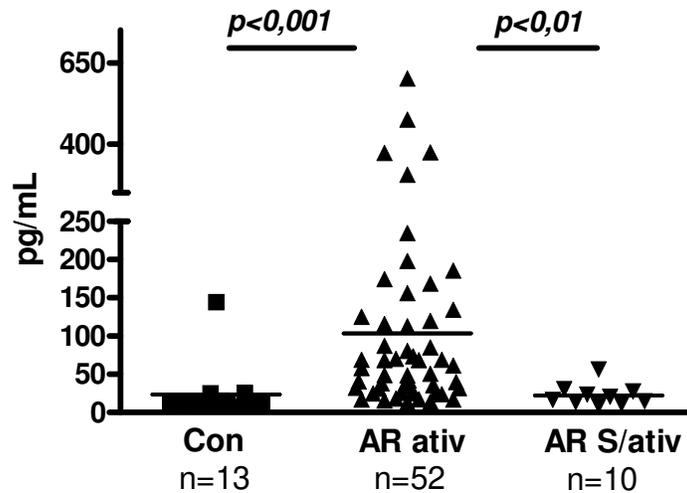


Figura 16: Quantificação sérica dos níveis de IL-8 em controle (Con), pacientes com artrite reumatoide em atividade (AR ativ) e sem atividade da doença (AR S/ativ), determinada por ensaio de ELISA. Análise estatística determinada por ANOVA, seguido do teste de Bonferroni.

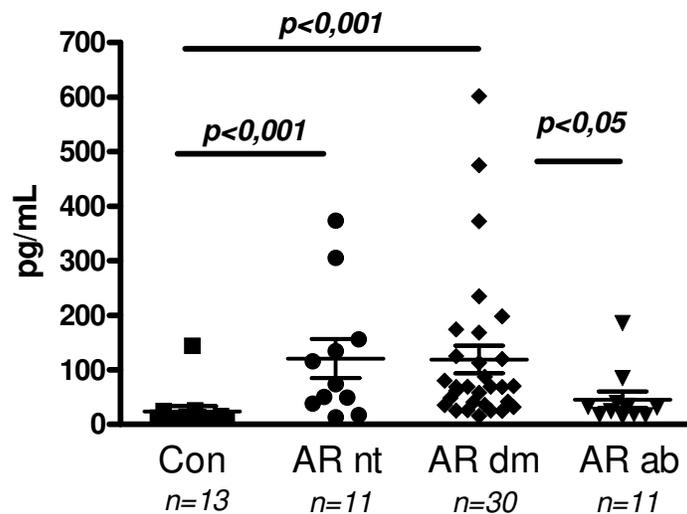


Figura 17: Quantificação sérica dos níveis de IL-8 em controles (Con), pacientes com artrite reumatoide em atividade não tratados (AR nt), pacientes tratados com DMARDs (AR dm) e pacientes tratados com agentes biológicos (AR ab), determinada por ensaio de ELISA. Análise estatística determinada por ANOVA, seguida do teste de *Bonferroni*.

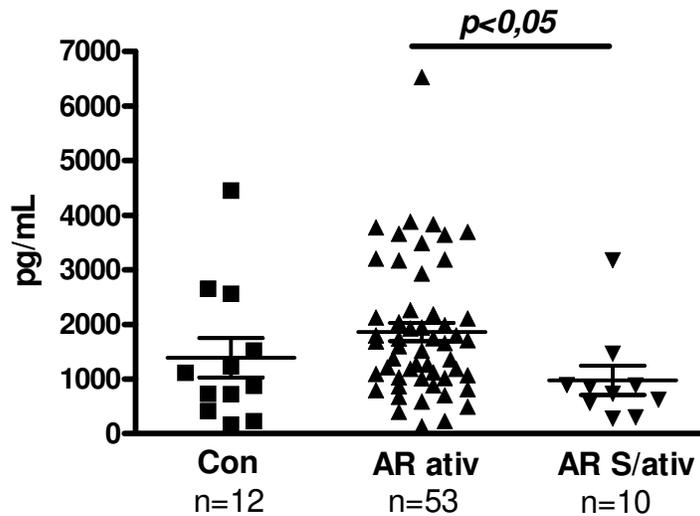


Figura 18: Quantificação sérica dos níveis de ENA-78 em controle (Con), pacientes com artrite reumatoide em atividade (AR ativ) e sem atividade da doença (AR S/ativ), determinada por ensaio de ELISA. Análise estatística determinada pelo teste de *Bonferroni*.

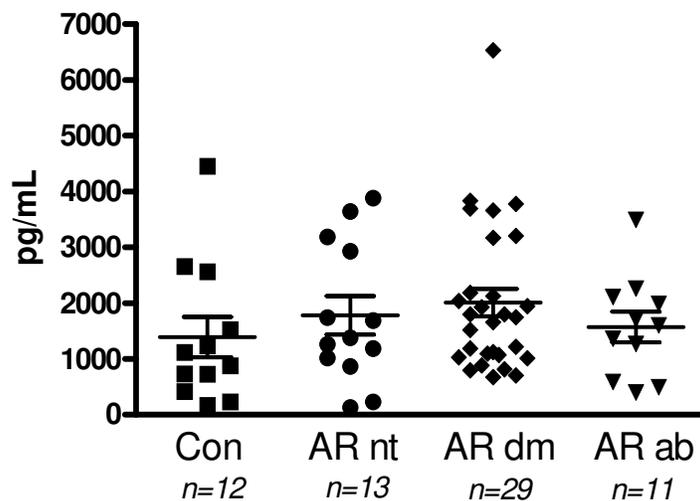


Figura 19: Quantificação sérica dos níveis de ENA-78 em controle (Con), pacientes com artrite reumatoide em atividade não tratados (AR nt), pacientes tratados com DMARDs (AR dm) e pacientes tratados com agentes biológicos (AR ab), determinada por ensaio de ELISA. $p > 0,05$, determinado por ANOVA.

4.8 Avaliação do potencial quimiotático do líquido sinovial de pacientes com artrite reumatoide

4.8.1 Avaliação da migração de neutrófilos utilizando líquido sinovial de pacientes com artrite reumatoide como agente quimiotático

O potencial quimiotático do sobrenadante do líquido sinovial de pacientes com artrite reumatoide foi avaliado frente a neutrófilos (2×10^6 cls/mL) obtidos de indivíduos saudáveis (n=08) e submetidos ao ensaio de quimiotaxia *in vitro*. Foi feito um pool de amostras (n=02) de líquidos sinoviais de pacientes com AR não tratados e um pool de amostras (n=04) de líquidos sinoviais de pacientes com AR tratados com DMARDs. A atração neutrofilica obtida pelos líquidos sinoviais foi comparada ao líquido sinovial de paciente com osteoartrite (n=01), meio RPMI sem células com 100ng/mL de IL-8 e meio RPMI sem células e sem quimioatraente, que atuaram como controles neste experimento (Figura 20). Foi observado aumento da migração de neutrófilos quando o quimioatraente foi LS de pacientes com AR tratados com DMARDs e esse aumento foi significativo ($p < 0,01$), comparado a atração exercida pelo LS de paciente com OA ou com AR sem tratamento específico para a doença (AR nt).

4.8.2 Migração neutrofilica após bloqueio com anticorpos monoclonais de citocinas presentes no líquido sinovial de pacientes com AR

A migração de neutrófilos de indivíduos saudáveis (n=04) foi avaliada frente ao estímulo quimiotático presente no sobrenadante do líquido sinovial e por bloqueio com anticorpos monoclonais contra citocinas presentes neste fluido: anti-IL-8 e anti-TNF- α . O líquido sinovial de paciente com osteoartrite (OA) e pool de LS de pacientes AR não tratados (AR nt, n=02) e tratados com DMARDs (AR dm, n=04), foram incubados com os anticorpos monoclonais anti-IL-8 (hCXCR-1) e anti-TNF- α , ambos nas concentrações de 1 μ g/mL (esta concentração foi escolhida após padronização da melhor concentração para bloqueio da função). Após o tratamento, foram adicionados os neutrófilos (2×10^6 cls/mL) de indivíduos controle e realizado o ensaio de migração celular *in vitro*. Observou-se uma redução da migração de neutrófilos após adição de anti-IL-8 no LS de pacientes AR não tratados ($p < 0,05$), mas essa redução não foi observada nos LS de paciente com OA ou com

AR tratados com DMARDs (Figura 21 A). Após bloqueio com anti-TNF- α , não se notou alteração na quimiotaxia de neutrófilos nos grupos avaliados (Figura 21 B).

4.8.3 Quantificação das quimiocinas IL-8 e ENA-78 no líquido sinovial de pacientes com AR e indivíduo com osteoartrite

Também foram quantificados os níveis das quimiocinas IL-8 e ENA-78 no sobrenadante obtido do líquido sinovial de pacientes com AR, visto o potencial quimioatrativo deste fluido, e comparados aos níveis encontrados em pacientes com osteoartrite (OA) (Figura 22). Devido ao reduzido número de amostras não foi possível realizar a análise estatística, mas pode-se observar que os níveis destas quimiocinas (Figura 22 A e B, respectivamente) encontram-se elevados no líquido sinovial de pacientes AR tratados com DMARDs comparados aos pacientes sem tratamento (AR nt) ou indivíduo com osteoartrite (OA).

O LS de pacientes com AR nt demonstrou níveis apenas da IL-8, enquanto o LS de pacientes em uso de DMARDs apresentou níveis de ambas as quimiocinas que aparentaram estar elevados comparados aos outros fluídos.

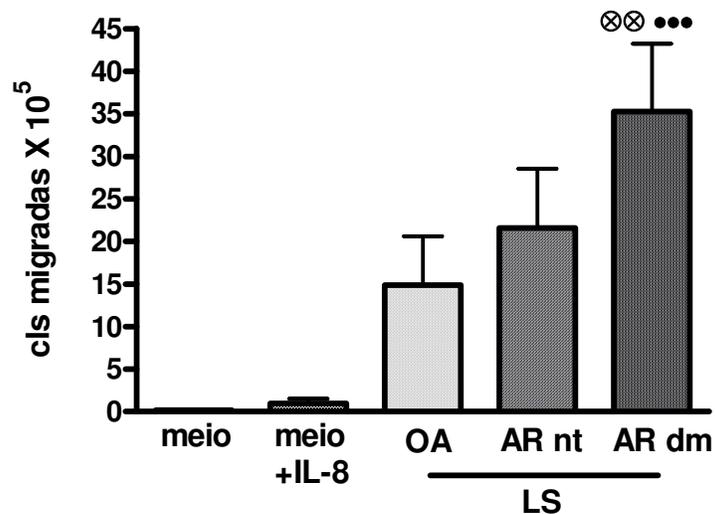


Figura 20: Ensaio de quimiotaxia *in vitro* de neutrófilos frente a estímulo quimiotático de meio RPMI sem células (meio), meio com adição de 100ng/mL de IL-8 (meio + IL-8), líquido sinovial (LS) de pacientes com osteoartrite (OA), pacientes com AR em atividade não tratados (AR nt) e pacientes AR ativa tratados com DMARDs (AR dm). Os neutrófilos de 8 indivíduos saudáveis, na concentração de 2×10^6 cls/mL foram incubados por 120 minutos à 37°C, em estufa a 5% CO₂ em câmara quimiotática de 96 poços. Resultados expressos em média \pm erro da média. $\otimes\otimes$ $p < 0,01$ entre LS AR dm e LS OA; $\bullet\bullet\bullet$ $p < 0,001$ entre LS AR dm e LS AR nt, por teste *t* pareado.

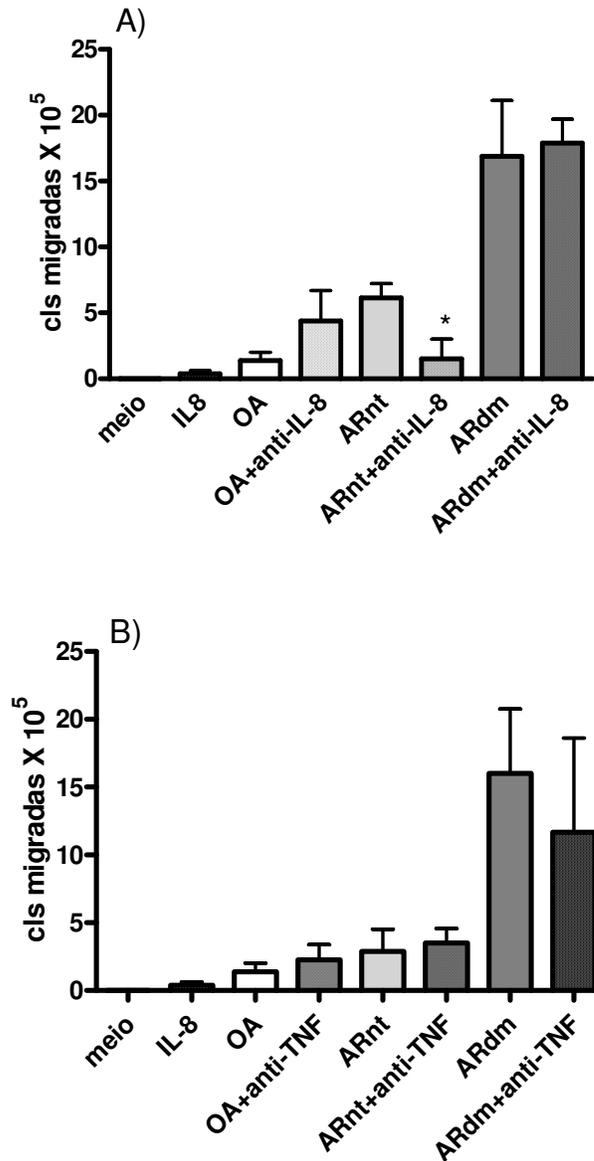


Figura 21: Ensaio de quimiotaxia *in vitro* de neutrófilos após bloqueio do LS de pacientes com AR em atividade com anticorpos monoclonais anti-IL-8 (A) e anti-TNF- α (B). A migração foi avaliada utilizando meio RPMI sem células (meio), meio RPMI com adição de IL-8 (meio + IL-8), líquido sinovial de pacientes com osteoartrite (OA) e com adição de anticorpos (anti-IL-8/anti-TNF), pacientes com AR não tratados (AR nt) e com adição de anticorpos (anti-IL-8/anti-TNF) e pacientes AR tratados com DMARDs (AR dm) e com adição de anticorpos (anti-IL-8/anti-TNF). Os neutrófilos de 4 indivíduos saudáveis, na concentração de 2×10^6 cls/mL foram incubados por 120 minutos à 37°C, em estufa a 5% CO₂ em câmara quimiotática de 96 poços. Resultados expressos em média \pm erro da média. * $p < 0,05$ entre AR nt e ARnt+anti-IL-8, por teste *t* pareado.

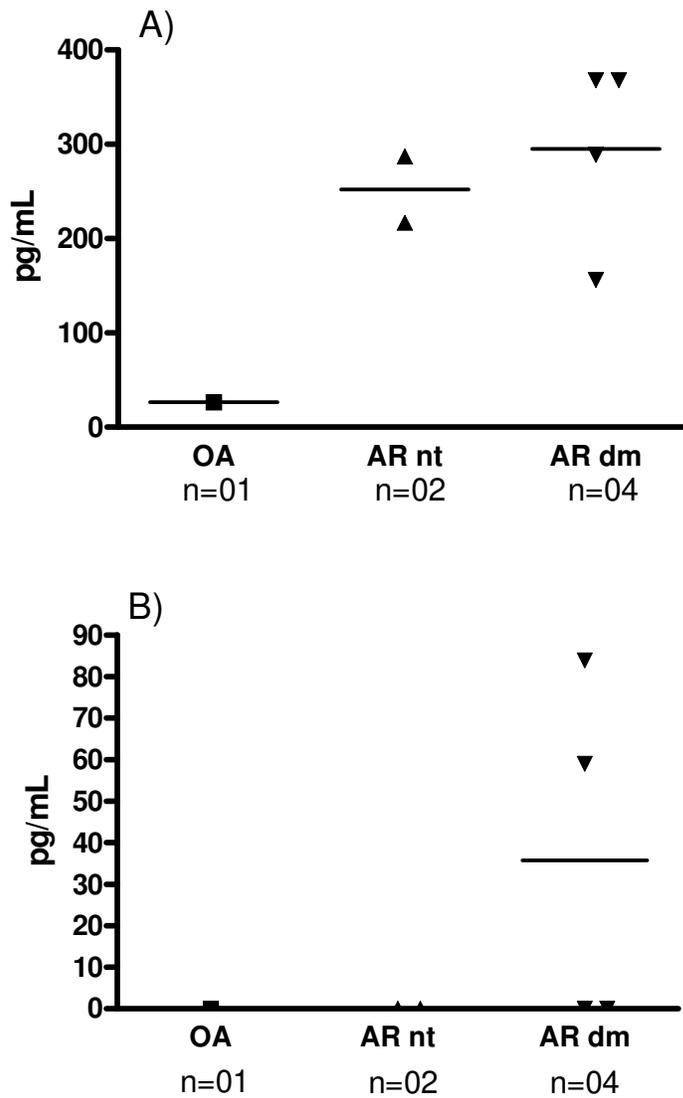


Figura 22: Quantificação dos níveis de IL-8 (A) e ENA-78 (B) no líquido sinovial de pacientes com OA (OA), pacientes AR em atividade não tratados (AR nt) e pacientes com AR ativa tratados com DMARDs (AR dm), determinada por ELISA sanduíche. Resultados expressos em pg/mL.

5. Discussão

Os neutrófilos são o primeiro tipo celular a chegar aos sítios de inflamação e são as células mais abundantes no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatoide (Bostan *et al.*, 2002; Cascão *et al.*, 2010) e apesar disso, pouco se sabe sobre as características migratórias e adesivas destas células com relação às diversas terapias farmacológicas utilizadas atualmente para a AR. Assim, este estudo buscou comparar alguns aspectos das propriedades funcionais dos neutrófilos e a expressão das moléculas de adesão, investigando a atuação do estado ativo da doença e dos atuais tratamentos utilizados para a AR, uma vez que pode ser sugerido que alterações na função celular associadas à melhora do quadro clínico desta patologia podem implicar em mecanismos para a remissão da doença ou pelo menos refletir uma consequência destas alterações.

De modo geral, observamos neste trabalho que a adesão e migração de neutrófilos encontram-se alteradas principalmente em pacientes com AR sem atividade da doença, ou seja, naqueles pacientes em que o estado inflamatório crônico da doença está sendo controlado pela medicação. E dentro dos grupos de medicação avaliados, pacientes em uso de agentes biológicos anti-TNF- α parecem apresentar maiores alterações quanto a estas funções, comparados aos pacientes sob outras formas de tratamento. Vimos também que o líquido sinovial de paciente AR em atividade possui alto potencial quimioatrativo de neutrófilos, possivelmente associado à presença das principais quimiocinas atraentes destas células.

Apesar de os indivíduos controle utilizados neste estudo apresentarem média de idade menor e maior número do sexo masculino comparados aos pacientes com AR, isto não atuou como interferente nos ensaios realizados neste estudo, pois não houve diferença significativa entre as propriedades adesivas e migratórias dos neutrófilos dos pacientes com AR quando comparadas aos controles. Quanto aos pacientes com AR em atividade, o maior grupo avaliado neste estudo, não foram encontradas diferenças quanto às características clínicas dentre os grupos divididos de acordo com as medicações, confirmando estarem de modo geral, com atividade inflamatória semelhante, independente da medicação e, portanto, indicando que essas variáveis não influenciaram nas avaliações realizadas neste trabalho.

A adesão de neutrófilos à fibronectina de pacientes com artrite reumatoide sem atividade mostrou-se diminuída em relação aos neutrófilos de pacientes em atividade da

doença, quando na ausência de estímulo inflamatório. E quando essas propriedades foram avaliadas nos grupos divididos de acordo com a medicação, observou-se menor porcentagem de adesão em neutrófilos de pacientes em terapia com anti-TNF- α , na ausência de estímulo por IL-8 e uma tendência à redução quando estimulados por esta citocina. Possivelmente, a remissão do estado inflamatório, causado pelas medicações contra a AR, impeça que estas células funcionem normalmente na ausência de um estímulo inflamatório, enquanto que na presença de estímulo, esta proteção contra o processo adesivo é removida, fazendo com que os neutrófilos se comportem de modo semelhante aos de pacientes em atividade inflamatória da doença. Além disso, observou-se neste grupo uma redução da expressão de algumas moléculas de adesão que podem estar associadas à redução dessas funções nestes neutrófilos, conforme será discutido adiante. A presença da atividade da doença não pareceu influenciar na adesão dos neutrófilos comparados ao controle e não demonstrou haver influência das medicações nestas propriedades adesivas.

De Clerck *et al.*, em 1995, avaliaram a adesão de neutrófilos do sangue periférico a condrócitos em pacientes com AR em atividade e não observaram diferenças de adesão nos neutrófilos de controle e pacientes. Linfócitos T isolados da sinóvia reumatoide mostraram aumento de adesão a E-selectina e VCAM-1, em um ensaio de adesão estática *in vitro* (Postigo *et al.*, 1992). Similarmente aos resultados verificados, não foram vistas alterações quando foi observada a adesão de neutrófilos de pacientes com AR ativa, à cultura de células endoteliais e colunas de fibras de nylon (Howe *et al.*, 1981; Sheehan *et al.*, 1987). No entanto, não foram encontrados trabalhos na literatura que avaliassem a adesão estática de neutrófilos do sangue periférico de pacientes com AR e a influência da remissão do quadro inflamatório, de modo semelhante ao avaliado neste estudo.

Interessantemente, as propriedades migratórias de neutrófilos de pacientes em remissão da doença apresentaram-se significativamente reduzidas, na ausência de estímulo quimiotático, comparadas à migração de neutrófilos de pacientes com a AR ativa. Por outro lado, quando houve estímulo da IL-8 não foram observadas diferenças quanto a estas funções comparadas ao controle e pacientes em atividade da doença.

Nos pacientes com AR em estado ativo, a migração de neutrófilos sob estímulo de IL-8, de pacientes sem tratamento específico para a doença, apresentou discreta redução (embora não seja significativa) comparada ao grupo controle. Ainda sob estímulo da IL-8, a

migração dos neutrófilos de indivíduos em tratamento com agentes biológicos mostrou-se significativamente aumentada comparada a pacientes não tratados, contudo, esta diferença não foi vista na ausência de estímulo quimiotático. O aumento da quimiotaxia dos neutrófilos nesses pacientes pode estar relacionado aos níveis reduzidos de IL-8 presentes na circulação destes e que ao entrar em contato com este quimioatraente *in vitro*, a resposta quimiotática no estado ativo da doença se torna aumentada. Reforçando esta hipótese, neste trabalho foram encontrados níveis séricos reduzidos de IL-8 nestes pacientes, semelhantes aos níveis de indivíduos controle, enquanto os outros grupos de medicações apresentaram índices elevados ($p < 0,05$), comparados a estes.

Vollmer e colaboradores, em 1992, avaliaram a influência do TNF- α na orientação e movimento direcional de neutrófilos sob ação de fMLP como quimioatrativo e observaram que as células tratadas com TNF- α se comportaram como células não expostas ao agente quimiotático, falhando quanto à orientação e movimento em direção a este gradiente. Outros investigadores avaliaram o efeito do TNF- α na migração de polimorfonucleares (PMNs) humanos através de câmaras de Boyden e sob agarose. Nas técnicas utilizando agarose, este mediador inflamatório tem mostrado consistentemente inibir a migração tanto direcional, quanto não-direcionada (Atkinson *et al.*, 1981; Ferrante *et al.*, 1988; Shalaby *et al.*, 1985). Ao passo que, estudos empregando a câmara de Boyden possuem resultados mistos, alguns mostraram inibição da migração (Kownatzki *et al.*, 1988) e ainda outros demonstraram aumento (Otsuka *et al.*, 1990).

Avaliando a migração de PMN em AR, sob influência de outros mediadores inflamatórios, alguns estudos não encontraram diferenças (Kemp *et al.*, 1980; Hashimoto *et al.*, 1994; Bostan *et al.*, 2002), enquanto Aglas *et al.*, em 1998, mostraram redução da migração de PMNs frente ao estímulo de fMLP em artrite reumatoide juvenil. Uma recente publicação (Verri Jr *et al.*, 2010) relatou não ter encontrado diferenças quanto à quimiotaxia de neutrófilos sob estímulo de fMLP em controle, pacientes AR em atividade tratados com MTX e pacientes tratados com anti-TNF- α .

Capsoni e colaboradores, em 2005, estudaram o efeito da terapia anti-TNF- α na função neutrofilica *ex vivo*. Para isso, eles avaliaram neutrófilos de sangue periférico de pacientes com AR em atividade da doença (DAS 28 > 3,2), em uso de adalimumab e avaliaram a quimiotaxia por câmara de Boyden, antes e durante as 2, 6, 12 semanas do

início do tratamento com este anticorpo. Os resultados encontrados foram semelhantes aos encontrados neste estudo, visto que as propriedades migratórias de neutrófilos destes pacientes antes do tratamento encontraram-se reduzidas comparadas aos de indivíduos controle e após as semanas de tratamento, foi observado aumento da atividade quimiotática destes neutrófilos. Autores deste estudo sugerem que elevados níveis circulantes de TNF- α em pacientes AR induzem uma “insensibilização” dos neutrófilos que prejudicaria esse movimento direcionado e que é restaurada e melhorada pelo bloqueio desta citocina quando empregada a terapia anti-TNF- α , permitindo uma resposta eficiente destes neutrófilos ao estímulo quimiotático (Vollmer *et al.*, 1992; Agarwal *et al.*, 1994; Nada *et al.* 1999).

O estado ativo da AR juntamente com o bloqueio do TNF- α , na presença de quimioatraente promoveria um aumento na migração direcionada, ao passo que com a remissão deste estado inflamatório, causado pela medicação, estes neutrófilos poderiam se polarizar, mas não se orientar em direção ao estímulo de IL-8. Além disso, os pacientes em uso da terapia anti-TNF- α são, geralmente, pacientes que não obtiveram resultados satisfatórios a outros tipos de tratamentos, já que esta é a última terapia a ser indicada, sugerida após tentativas de tratamento com DMARDs ou ainda, AINEs (Gaffo *et al.*, 2006). A dificuldade de remissão da inflamação nos pacientes em atividade e em uso desta terapia pode estar relacionada ao aumento da migração neutrofílica nestes pacientes sob estímulo inflamatório.

As subunidades alfa das integrinas LFA-1 (CD11a) e Mac-1 (CD11b), envolvidas principalmente no processo de adesão firme do leucócito ao endotélio (De Clerck *et al.*, 1995), não demonstraram diferenças de expressão gênica de pacientes AR e controle, bem como quando avaliada a influência das medicações. Todavia, a expressão do gene da L-selectina, molécula envolvida no rolamento inicial do processo de adesão leucocitária (Ley & Tedder, 1995), mostrou-se elevada em pacientes com AR em atividade e, quando esta proteína foi avaliada nos grupos divididos pelo tipo de medicação, observou-se aumento da expressão gênica no grupo em terapia com agentes biológicos. É importante lembrar que, os neutrófilos deste grupo apresentaram aumento das propriedades migratórias na presença de IL-8 e o aumento desta expressão gênica pode estar relacionado ao aumento da migração neutrofílica.

Avaliou-se também a expressão destas proteínas na superfície dos neutrófilos através de anticorpos conjugados a fluorocromos e, no entanto, não foi observado aumento da expressão de superfície da L-selectina em pacientes com AR em atividade quando comparada ao controle e não foi vista influência das medicações na expressão desta molécula de adesão celular. Mas, observou-se uma redução significativa da expressão proteica da L-selectina e LFA-1 na superfície dos neutrófilos de pacientes em remissão da doença, comparados aos neutrófilos daqueles em estado ativo, e não encontramos diferenças quanto à expressão da integrina Mac-1 entre pacientes e controles, embora quando observada a influência das medicações, percebeu-se aumento significativo da expressão desta subunidade de integrina na superfície de neutrófilos de pacientes em remissão sob tratamento com agentes biológicos.

A reduzida expressão de L-selectina na superfície dos neutrófilos dos pacientes sem atividade pode estar em concordância com a tendência a uma menor capacidade migratória e adesiva dos neutrófilos nestes pacientes e a presença do estado inflamatório ativo poderia promover a produção desta molécula. Alguns autores encontraram diminuição da expressão de L-selectina na superfície de leucócitos do sangue e fluido sinovial de pacientes com AR (Humbria *et al.*, 1994; Bond & Hay, 1997; Honig *et al.*, 1999). Estudos que avaliaram a expressão de superfície de CD11b e L-selectina em neutrófilos do sangue periférico de pacientes com AR em atividade, não encontraram diferenças com relação ao controle (De Clerck *et al.*, 1995; Capsoni *et al.*, 2005), concordando com este estudo. Torsteinsdóttir *et al.*, em 1999, encontraram níveis elevados da expressão de cadeia alfa e beta da integrina Mac-1 em PMNs de pacientes com AR.

Uma possível explicação para o fato de que a expressão gênica de L-selectina esteja aumentada em pacientes com AR em atividade, mas este aumento não seja observado quanto à expressão na superfície é a de que, provavelmente os níveis de expressão gênica, embora elevados, não sejam suficientes para promover aumento fisiologicamente significativo de expressão proteica na membrana, como também de maior liberação na corrente sanguínea destes pacientes. Também é conhecido que a L-selectina é liberada da superfície dos neutrófilos para a circulação quando estes se encontram em estado ativado (Smalley & Ley, 2005). Portanto, foram quantificados os níveis séricos desta selectina no

soro dos pacientes com artrite reumatoide, mas não foram encontradas diferenças nos níveis solúveis desta molécula.

Há um debate se os níveis de L-selectina solúveis em indivíduos com AR estão significativamente aumentados. Sfrikakis e colegas, em 1999, mostraram que não há elevação dos níveis de L-selectina solúvel no sangue de pacientes AR, em contraste, Litter e colaboradores, em 1997, encontraram níveis desta selectina significativamente elevados no soro de pacientes AR comparados a indivíduos saudáveis. Diferentemente dos resultados encontrados neste estudo, Ates *et al.*, em 2004, encontraram níveis maiores de L-selectina solúvel no soro de pacientes com AR em atividade comparados a pacientes sem a doença ativa, porém os critérios de classificação de atividade da AR utilizados por eles foram diferentes dos critérios aplicados aqui.

A subunidade de LFA-1, CD11a, controla grande parte das respostas imunes e é alvo potencial para a imunossupressão (Yusuf-Makagiansar *et al.*, 2002). Isso possivelmente pode estar relacionado à diminuição da expressão dessa molécula na superfície de neutrófilos em pacientes com remissão do quadro inflamatório. A ação dos medicamentos e, conseqüentemente, a ausência do quadro de artrite, podem ser a causa dessa redução. Watts *et al.*, em 2005, mostraram que camundongos KB x N deficientes em CD11a, mas não em CD11b, foram resistentes ao desenvolvimento da artrite inflamatória e anticorpos contra esta molécula atenuaram os efeitos da inflamação já instalada.

Surpreendentemente, neste estudo foi verificado que os níveis de CD11b (subunidade de Mac-1) estavam aumentados na superfície neutrofílica em pacientes inativos para a AR em terapia com anti-TNF- α . O papel que esta integrina exerceria nas propriedades adesivas e quimiotáticas é incerto, visto que seu aumento é usualmente associado com aumento destas interações adesivas (Ding *et al.*, 1999).

Os níveis de IL-8, molécula quimioatraente de neutrófilos e de importância na inflamação da AR, apresentaram-se elevados em pacientes com AR em atividade da doença e, quantificando-se esta quimiocina nestes pacientes divididos pelo tipo de medicação, foi observado aumento dos níveis em pacientes sem tratamento específico e tratados com drogas modificadoras da doença. Os níveis séricos de IL-8 foram significativamente reduzidos nos pacientes em tratamento com agentes biológicos, apresentando níveis semelhantes aos encontrados nos indivíduos controle. Isto poderia ser atribuído ao

tratamento, pois estudos mostram que o TNF- α é um potente ativador de IL-8 (Strieter *et al.*, 1992; Cassatela *et al.*, 1993; Fujishima *et al.*, 1993; Taylor *et al.*, 2000); Lun e colegas, em 2007, observaram que após início da terapia com infliximab, mesmo medicamento avaliado neste trabalho, a liberação de IL-8 em PMNs do sangue periférico cultivados de pacientes com AR apresentou-se significativamente reduzida, o que pode ser atribuído à inibição de TNF- α . De notável interesse, os níveis de IL-8 foram significativamente reduzidos nos pacientes em remissão da doença e pode indicar que a reduzida produção desta citocina implicaria em um importante papel na redução da atividade da AR.

Apesar da importância da IL-8, C5a e LTB4 no recrutamento de polimorfonucleares para as articulações de pacientes AR, estes fatores podem não compreender totalmente a atividade quimiotática encontrada no fluido sinovial. Koch *et al.*, em 1994, identificaram uma nova citocina quimiotática, o ENA-78. Eles encontraram níveis elevados desta quimiocina no sangue e no fluido sinovial de pacientes com AR, mas não investigaram a atuação dos medicamentos para a AR quanto aos níveis desta molécula. Além disso, eles também verificaram que a IL-8 parece ser responsável por apenas 40% da atividade quimiotática induzida em PMNs. Diante disso, foram investigados os níveis de ENA-78 solúvel no soro de pacientes com AR, que se mostraram levemente, embora não significativamente, aumentados na circulação de pacientes com AR em atividade comparados aos controles. E, ao avaliar-se separadamente esses pacientes de acordo com o tratamento medicamentoso estabelecido, não foram encontradas diferenças significativas, inclusive no grupo tratado com anti-TNF- α . Em contraste, os níveis de ENA-78 estavam significativamente reduzidos nos pacientes em remissão comparados aos pacientes em atividade da AR.

Assim, a remissão do estado inflamatório da AR parece estar associada a alterações significantes nas principais quimiocinas atraentes de neutrófilos na circulação destes indivíduos. Se a melhora dos níveis destas quimiocinas possui participação na redução das propriedades adesivas e quimiotáticas dos neutrófilos nestes indivíduos, ainda é uma questão que precisa ser elucidada.

O mecanismo responsável pelo acúmulo de leucócitos nas articulações reumatoides ainda não é bem compreendido e essa migração para dentro do espaço extravascular é o principal estágio no desenvolvimento da infiltração celular. Este fenômeno depende da

expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais e do gradiente de fatores quimiotáticos produzidos no sítio da inflamação (Stanczyk *et al.*, 2005). Desse modo, a quimiotaxia celular *in vivo* na AR ocorre na presença de estímulos oriundos do líquido sinovial, então decidiu-se avaliar a influência deste fluido AR em relação ao potencial quimioatrativo de neutrófilos obtidos de indivíduos sem a doença, pelo ensaio de migração *in vitro*. O pool de líquidos sinoviais de indivíduos com AR em atividade tratados com DMARDs mostrou-se significativamente mais quimioatrativo.

Bostan e colegas, em 2002, avaliaram o efeito do líquido sinovial frente a neutrófilos do próprio paciente e observaram aumento da atividade quimiotática, apresentando resultados similares aos encontrados neste estudo.

O bloqueio com anticorpos monoclonais contra duas citocinas presentes abundantemente no fluido sinovial de indivíduos com AR: IL-8 e TNF- α , teve a intenção de avaliar a influência que estas moléculas exerceriam no processo quimiotático do fluido sinovial destes pacientes. A redução da migração de neutrófilos, quando houve bloqueio da IL-8, no LS de pacientes AR não tratados indica, possivelmente, um papel quimiotático fundamental desta quimiocina no fluido sinovial AR. Interessantemente, a ausência de alteração na quimiotaxia exercida pelo fluido sinovial de pacientes em uso de DMARDs, demonstrou um possível papel complementar do ENA-78 na quimioatração de neutrófilos, visto que este fluido apresentou níveis aparentemente elevados de ambas as quimiocinas, IL-8 e ENA-78. A não alteração do potencial quimiotático quando houve bloqueio com anti-TNF- α , indica que a redução da migração neutrofílica ocasionada quando utilizou-se anticorpo contra IL-8, foi devido ao bloqueio da ação desta citocina e não pela ação de um anticorpo monoclonal apenas, reforçando a sugestão de que a migração dos neutrófilos para as articulações inflamadas é ocasionada principalmente pela ação das principais quimiocinas atraentes de neutrófilos.

Por fim, os níveis das quimiocinas IL-8 e ENA-78 no líquido sinovial de pacientes com AR em atividade parecem estar elevados comparados ao de um indivíduo com osteoartrite, apesar de não ter sido feita a análise estatística, devido ao pequeno número de amostras. Esses resultados já foram confirmados por outros autores (Koch *et al.*, 1994; Furuzawa-Carballeda *et al.*, 1999).

6. Conclusão

Os neutrófilos da circulação periférica de pacientes com AR em atividade da doença não possuem alterações quanto às propriedades adesivas e quimiotáticas em relação a indivíduos saudáveis;

Em contrapartida, pacientes com AR em remissão da doença apresentam redução da capacidade adesiva e quimiotática de neutrófilos do sangue periférico, quando na ausência de estímulo inflamatório, e a presença de IL-8 parece retomar aos níveis normais essas funções. Além disso, estes pacientes apresentaram níveis reduzidos das principais quimiocinas atraentes de neutrófilos, IL-8 e ENA-78, em relação aos pacientes com AR em atividade;

A terapia por bloqueio da molécula TNF- α possivelmente exerce as maiores alterações nas funções avaliadas dos neutrófilos;

Níveis circulantes reduzidos de IL-8 e ENA-78, nos pacientes inativos para a AR podem estar associados à redução da expressão de moléculas de adesão envolvidas nestes processos;

A remissão do quadro inflamatório da doença parece estar associada a alterações significantes nas principais quimiocinas atraentes de neutrófilos na AR, mas é preciso esclarecer se esta redução participaria das alterações funcionais dos neutrófilos nestes indivíduos.

7. Referências Bibliográficas

Agarwal S, Suzuki JB, Riccelli AE. Role of cytokines in the modulation of neutrophil chemotaxis in localized juvenile periodontitis. **Journal of periodontal research**. 1994; 29: 127-37.

Agarwal SK, Brenner MB. Role of adhesion molecules in synovial inflammation. **Current opinion in Rheumatology**. 2006; 18: 268-76.

Aglas F, Hermann J, Egger G. Abnormal directed migration of blood polymorphonuclear leukocytes in rheumatoid arthritis. Potential role in increased susceptibility to bacterial infections. **Mediators of inflammation**. 1998; 7: 19-23.

Alamanos Y, Drosos AA. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. **Autoimmunity reviews**. 2005; 4: 130-6.

Aletaha D, Ward MM, Machold KP, Nell VP, Stamm T, Smolen JS. Remission and active disease in rheumatoid arthritis: defining criteria for disease activity states. **Arthritis & Rheumatism**. 2005; 9: 2625-36.

Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS *et al*. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**. 1988; 31(3): 315-24.

Assis A, Conran N, Canalli AA, Lorand-Metze I, Saad STO, Costa FF. Effect of cytokines and chemokines on sickle neutrophil adhesion to fibronectin. **Acta Haematologica**. 2005; 113(2): 130-6.

Ates A, Kinikli G, Turgay M, Duman M. Serum-soluble selectin levels in patients with rheumatoid arthritis and systemic sclerosis. **Scandinavian Journal of Immunology**. 2004; 59: 315-20.

Atkinson Y, Marasco W, Lopez A, Vadas M. Recombinant human tumor necrosis factor-alpha. Regulation of N-formylmethionylleucylphenylalanine receptors affinity and function on human neutrophils. **Journal of Clinical Investigation**. 1988; 81: 759-65.

Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. **FEBS Letters**. 1992; 307 (1): 97-101.

Barck KH, Lee WP, Diehl LJ, Ross J, Gribling P, Zhang Y *et al*. Quantification of cortical bone loss and repair for therapeutic evaluation in collagen-induced arthritis, by micro-computed tomography and automated image analysis. **Arthritis and Rheumatism**. 2004; 50: 3377-86.

Bond A, Hay FC. L-selectin expression on the surface of peripheral blood leucocytes from rheumatoid arthritis patients is linked to disease activity. **Scandinavian Journal of Immunology**. 1997; 46: 312-6.

Bostan M, Constantin MC, Nicolau A, Hirt M, Galatiuc C, Matei I *et al*. Study of chemotactic activity developed by neutrophils from rheumatoid arthritis patients. **Roumanian archives of Microbiology and Immunology**. 2002; 61(4): 243-58.

Canalli AA, Franco-Penteado CF, Traina F, Saad STO, Costa FF, Conran N. Role for cAMP-protein kinase A signalling in augmented neutrophil adhesion and chemotaxis in sickle cell disease. **European Journal fo Haematology**. 2007; 79: 330-7.

Capsoni F, Sarzi-Puttini P, Atzeni F, Minonzio F, Bonara P, Doria A, Carrabba M. Effect of adalimumab on neutrophil function in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Research Therapy**. 2005; 7: 250-5.

Cascão R, Rosário HS, Souto-Carneiro MM, Fonseca JE. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. **Autoimmunity Reviews**. 2010.

Cassatella MA, Meda L, Bonora S, Ceska M, Constantin G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. **The journal of Experimental Medicine**. 1993; 178(6): 2207-11.

Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, Burdick MD, Kunkel RG, Wilke CA *et al*. The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat. **Hepatology**. 1996; 23 (3): 506-14.

Conran N, Almeida CB, Lanaro C, Ferreira RP, Saad STO, Costa FF. Inhibition of caspase-dependent spontaneous apoptosis via a cAMP-protein kinase A dependent pathway in neutrophils from sickle cell disease patients. **British Journal of Hematology**. 2007; 139: 148-58.

Cross A, Bucknall RC, Cassatella MA, Edwards SW, Moots RJ. Synovial fluid neutrophils transcribe and express class II major histocompatibility complex molecules in rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**. 2003; 48 (10): 2797-806.

Cross A, Bakstad D, Allen JC, Thomas L, Moots RJ, Edwards SW. Neutrophil gene expression in rheumatoid arthritis. **Pathophysiology**. 2005; 12:191-202.

De Clerck LS, De Gendt CM, Bridts CH, Van Osselaer N, Stevens WJ. Expression of neutrophil activation markers and neutrophil adhesion to chondrocytes in rheumatoid arthritis patients: relationship with disease activity. **Research in Immunology**. 1995; 146: 81-7.

Ding ZM, Babensee JE, Simon SI, Lu H, Perrard JL, Bullard DC *et al*. Relative contribution of LFA-1 and Mac-1 to neutrophil adhesion and migration. **Journal of Immunology**. 1999; 163 (9): 5029-38.

Feldmann M, Brennan FM, Chantry D, Haworth C, Turner M, Abney E *et al.* Cytokine production in the rheumatoid joint: implications for treatment. **Annals of the Rheumatic Diseases**. 1990; 49 Suppl 1: 480-6.

Felson DT, Anderson JJ, Boers M, Bombardier C, Furst D, Goldsmith C *et al.* American College of Rheumatology preliminary definition of improvement in rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**. 1995; 38: 727-35.

Ferrante A, Nandoskar A, Wolz A, Goh D, Kowanko I. Effects of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 alpha and beta on human neutrophil migration, respiratory burst, and degranulation. **International Archives of allergy and applied immunology**. 1988; 86: 82-91.

Fransen J, van Riel PL. Outcome measures in inflammatory rheumatic diseases. **Arthritis Research & Therapy**. 2009; 11: 244-54.

Fujishima S, Hoffman AR, Vu T, Kim KJ, Zheng H, Daniel D *et al.* Regulation of neutrophil interleukin 8 gene expression and protein secretion by LPS, TNF-alpha, and IL-1 beta. **Journal of cellular physiology**. 1993; 154(3): 478-85.

Furuzawa-Carballeda J, Alcocer-Varela J. Interleukin-8, interleukin-10, intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 expression levels are higher in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis than in osteoarthritis. **Scandinavian Journal of Immunology**. 1999; 50(2): 215-22.

Gaffo A, Saag KG, Curtis JR. Treatment of rheumatoid arthritis. **American Society of Health-System Pharmacists**. 2006; 63: 2451-65.

Gonzalez-Gay MA, Garcia-Unzueta MT, De Matias JM, Gonzalez-Juanatey C, Garcia-Porrua C, Sanchez-Andrade A *et al.* Influence of anti-TNF-alpha infliximab therapy on adhesion molecules associated with atherogenesis in patients with rheumatoid arthritis. **Clinical and Experimental Rheumatology**. 2006; 24: 373-9.

Hashimoto H, Yamamura M, Nishiya K, Ota Z. Impaired interleukin-8-dependent chemotaxis by synovial fluid polymorphonuclear leukocytes in rheumatoid arthritis. **Acta Medica Okayama**. 1994; 48(4): 181-7.

Hidalgo A, Peired AJ, Wild MK, Vestweber D, Frenette PS. Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. **Immunity**. 2007; 26: 477-89.

Honig M, Peter HH, Jantscheff P, Grunert F. Synovial PMN show a coordinated up-regulation of CD66 molecules. **Journal of Leukocyte Biology**. 1999; 66: 429-36.

Humbria A, Diaz-Gonzalez F, Campanero MR, Arroyo AG, Laffon A, Gonzalez-Amaro R *et al.* Expression of L-selectin, CD43, and CD44 in synovial fluid neutrophils from patients with inflammatory joint diseases: evidence for a soluble forms of L-selectin in synovial fluid. **Arthritis & Rheumatism**. 1994; 37: 342-8.

Iigo Y, Takashi T, Tamatani T, Miyasaka M, Higashida T, Yagita H *et al.* ICAM-1 dependent pathway is critically involved in the pathogenesis of adjuvant arthritis in rats. **Journal of Immunology**. 1991; 147: 4167-71.

Iwamoto T, Okamoto H, Toyama Y, Momohara S. Molecular aspects of rheumatoid arthritis: chemokines in the joints of patients. **FEBS Journal**. 2008; 275: 4448-55.

Jasin HE, Lightfoot E, Davis LS, Rothlein R, Faanes RB, Lipsky PE. Amelioration of antigen-induced arthritis in rabbits treated with monoclonal antibodies to leukocyte adhesion molecules. **Arthritis and Rheumatism**. 1992; 35: 541-9.

Jeon NL, Baskaran H, Dertinger SKW, Whitesides GM, Van De Water L, Toner, M. Neutrophil chemotaxis in linear and complex gradients of interleukin-8 formed in a microfabricated device. **Nature biotechnology**. 2002; 20: 826-30.

Kakimoto K, Nakamura T, Ishii K, Takashi T, Iigou H, Yagita H *et al*. The effect of anti-adhesion molecule antibody on the development of collagen-induced arthritis. **Cellular Immunology**. 1992; 142: 326-37.

Kemp AS, Brown S, Brooks PM, Neoh SH. Migration of blood and synovial fluid neutrophils obtained from patients with rheumatoid arthritis. **Clinical and Experimental Immunology**. 1980; 39: 240-6.

Koch AE, Kunkel SL, Harlow LA, Mazarakis DD, Haines GK, Burdick MD *et al*. Epithelial neutrophil activating peptide-78: a novel chemotactic cytokine for neutrophils in arthritis. **Journal of Clinical Investigation**. 1994; 94 (3): 1012-8.

Kownatzki E, Kapp A, Uhrich S. Modulation of human neutrophilic granulocyte functions by recombinant human necrosis factors, and recombinant human lymphotoxin. Promotion of adherence, inhibition of chemotactic migration and superoxide anion release from adherent cells. **Clinical and Experimental Immunology**. 1988; 74: 143-8.

Lee YH, Woo JH, Rho YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Meta-analysis of the combination of TNF inhibitors plus MTX compared to MTX monotherapy, and the adjusted indirect comparison of TNF inhibitors in patients suffering from active rheumatoid arthritis. **Rheumatology International**. 2008; 28: 553-9.

Ley K, Tedder TF. Leukocyte interactions with vascular endothelium. New insights into selectin-mediated attachment and rolling. **Journal of Immunology**. 1995; 155: 525-8.

Littler AJ, Buckley CD, Wordsworth P, Collins I, Martinson J, Simmons DL. A distinct profile of six soluble adhesion molecules (ICAM-1, ICAM-3, VCAM-1, E-selectin, L-selectin and P-selectin) in rheumatoid arthritis. **British Journal of Rheumatology**. 1997; 36:164-9.

Lun SWM, Wong CK, Tam LS, Li EK, Lam CWK. Decreased ex vivo production of TNF- α and IL-8 by peripheral blood cells of patients with rheumatoid arthritis after infliximab therapy. **International Immunopharmacology**. 2007; 7:1668-77.

Luster AD. Chemokines – Chemotactic cytokines that mediate inflammation. **The New England Journal of Medicine**. 1998; 338 (7): 436-45.

Mäkinen H, Hannonen P, Sokka T. Definitions of remission for rheumatoid arthritis and review of selected clinical cohorts and randomised clinical trials for the rate of remission. **Clinical and Experimental Rheumatology**. 2006; 24 (6 Supl. 43): 22-8.

Maksymowych WP, Blackburn WD Jr, Tami JA, Shanahan WR Jr. A randomized, placebo controlled trial of an antisense oligodeoxynucleotide to intercellular adhesion molecule-1 in the treatment of severe rheumatoid arthritis. **The journal of Rheumatology**. 2002; 29: 447-53.

Matsushima K, Baldwin ET, Mukaida N. Interleukin-8 and MCAF: novel leukocyte recruitment and activating cytokines. **Chemical Immunology**. 1992; 51: 236-65.

Miller MD, Krangel MS. Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. **Critical reviews in immunology**. 1992; 12 (1-2): 17-46.

Montecucco F, Steffens S, Burger F, da Costa A, Bianchi G, Bertolotto M *et al.* Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) induces integrin CD11b/CD18 (Mac-1) up-regulation and migration to the CC chemokine CCL3 (MIP-1alpha) on human neutrophils through defined signalling pathways. **Cellular Signalling**. 2008; 20(3): 557-68.

Nada R, Datta U, Deodhar SD, Sehgal S. Neutrophil function in rheumatoid arthritis. **Indian Journal of Pathology & Microbiology**. 1999; 42: 283-9.

Otsuka Y, Nagano K, Hori K, Oh-Ishi JI, Hayashi H, Watanabe N, Niitsu Y. Inhibition of neutrophil migration by tumor necrosis factor. **Journal of Immunology**. 1990; 145: 2639-43.

Postigo AA, Garcia-Vicuña R, Diaz-Gonzalez F, Arroyo AG, De Landázuri MO, Chi-Rosso G *et al.* Increased binding of synovial T lymphocytes from rheumatoid arthritis to endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). **Journal of Clinical Investigation**. 1992; 89: 1445-52.

Prevoo ML, van't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts: development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**. 1995; 38: 44-8.

Rosen SD, Bertozzi CR. The selectins and their ligands. **Current Opinion in Cell Biology**. 1994; 6(5): 663-73.

Schmittgen TD, Zakrajsek BA. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**. 2000; 46: 69-81.

Schmouder RL, Streiter RM, Walz A, Kunkel SL. Epithelial-derived neutrophil-activating factor-78 production in human renal tubule epithelial cells and in renal allograft rejection. **Transplantation**. 1995; 59(1): 118-24.

Sfikakis PP, Charalambopoulos D, Vaiopoulos G, Mavrikakis M. Circulating P- and L-selectin and T-lymphocyte activation and patients with autoimmune rheumatic diseases. **Clinical rheumatology**. 1999; 18: 28-32.

Shalaby M, Agarwall B, Rinderknecht E, Svedersky L, Finkle B, Palladino M. Activation of human polymorphonuclear neutrophil function by interferon-gamma and tumor necrosis factors. **Journal of Immunology**. 1985; 135: 2069-73.

Simmonds RE, Foxwell BM. NF-kB and its relevance to arthritis and inflammation. **Rheumatology**. 2008; 47: 584-90.

Smalley, DM, Ley K. L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. 2005; 9(2): 255-66.

Stanczyk J, Kowalski ML, Grzegorzczuk J, Szkudlinska B, Jarzebska M, Marciniak M, Synder M. Rantes and chemotactic activity in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Mediators of Inflammation**. 2005; 6: 343-8.

Streiter RM, Kasahara K, Allen RM, Standiford TJ, Rolfe MW, Becker FS, *et al.* Cytokine-induced neutrophil-derived interleukin-8. **The American Journal of Pathology**. 1992; 141(2): 397-407.

Sweeney SE, Firestein GS. Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. 2004; 36: 372-8.

Symmons D, Mathers C, Pflieger B. The global burden of rheumatoid arthritis in the year 2000. **Global Burden of disease**, WHO, 2000.

Tarrant TK, Patel DD. Chemokines and leukocyte trafficking in rheumatoid arthritis. **Pathophysiology**. 2006; 13: 1-14.

Taylor PC, Chu CQ, Plater-Zyberk C, Maini RN. Transfer of type II collagen-induced arthritis from DBA/1 to severe combined immunodeficiency mice can be prevented by blockade of Mac-1. **Immunology**. 1996; 88: 315-21.

Taylor PC, Peters MA, Paleolog E, Chapman PT, Elliott MJ, McCloskey R, *et al.* Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**. 2000; 43 (1): 38-47.

Tobón GJ, Youinou P, Saraux A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: rheumatoid arthritis. **Journal of autoimmunity**. 2010; 1-5.

Toetsch S, Olwell P, Prina-Mello A, Volkov Y. The evolution of chemotaxis assays from static models to physiologically relevant platforms. **Integrative Biology**. 2009; 1: 170-81.

Torsteinsdóttir I, Arvidson NG, Hällgren R, Håkansson L. Enhanced expression of integrins and CD66b on peripheral blood neutrophils and eosinophils in patients with rheumatoid arthritis, and the effect of glucocorticoids. **Scandinavian Journal of Immunology**. 1990; 50(4): 433-9.

Van der Heijde DM, van 't Hof MA, van Riel PL, Theunisse LA, Lubberts EW, van Leeuwen MA *et al.* Judging disease activity in clinical practice in rheumatoid arthritis: first step in the development of a disease activity score. **Annals of the Rheumatic diseases**. 1990; 49 (11): 916-20.

Van Gestel AM, Prevoo ML, van't Hof MA, van Rijswijk MH, van de Putte LB, van Riel PL. Development and validation of the European League Against Rheumatism response criteria for rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**. 1996; 39: 34-40.

Van Gestel AM, Haagsma CJ, Van Riel PL. Validation of rheumatoid arthritis improvement criteria that include simplified joint counts. **Arthritis & Rheumatism**. 1998; 41: 1845-50.

Van Riel PL; Fransen J. DAS28: a useful instrument to monitor infliximab treatment in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**. 2005; 7: 189-90.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**. 2002; 3(7): 1-12.

Verri Jr WA, Souto FO, Vieira SM, Almeida SCL, Fukada SY, Xu D *et al*. IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy. **Annals of the Rheumatic Diseases**. 2010; 1-7.

Vestweber D. Ligand specificity of selectins. **Journal of Cellular Biochemistry**. 1996; 61 (4): 585-91.

Volin MV. Soluble adhesion molecules in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Current Pharmaceutical Design**. 2005; 11: 633-53.

Vollmer KL, Alberts JS, Carper HT, Mandell GL. Tumor necrosis factor-alpha decreases neutrophil chemotaxis to N-formyl-1-methionyl-1-leucyl-1-phenylalanine: analysis of single cell movement. **Journal of Leukocyte Biology**. 1992; 52: 630-6.

Walz A, Burgener R, Car B, Baggiolini M, Kunkel SL, Strieter RM. Structure and neutrophil-activating properties of a novel inflammatory peptide (ENA-78) with homology to interleukin 8. **The Journal of Experimental Medicine**. 1991; 174 (6): 1355-62.

Watts GM, Beurskens FJ, Martin-Padura I, Ballantyne CM, Klickstein LB, Brenner MB, *et al*. Manifestations of inflammatory arthritis are critically dependent on LFA-1. **Journal of Immunology**. 2005; 174: 3668-75.

Wipke BT, Allen PM. Essential Role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. **The journal of Immunology**. 2001; 167: 1601-8.

Wong SH, Lord JM. Factors underlying chronic inflammation in rheumatoid arthritis. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**. 2004; 52: 379-388.

Yusuf-Makagiansar H, Anderson ME, Yakovleva TV, Murray JS, Siahaan TJ. Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. **Medicinal Research Reviews**. 2002; 22 (2): 146-67.

Zarbock A, Ley K. Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. **The American journal of Pathology**. 2008; 172(1): 1-7.



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)
(Controles Sadios)**

Título da Pesquisa: “Propriedades adesivas e quimiotáticas dos neutrófilos em pacientes com artrite reumatóide e o papel dos nucleotídeos cíclicos nestas alterações”

Pesquisadora Responsável: Venina Marcela Dominical

Orientadora: Dra. Nicola Amanda Conran Zorzetto

Coorientador: Dr. Fernando Ferreira Costa

Objetivo da pesquisa: entender melhor o papel das neutrófilos, que são as células mais abundantes no líquido sinovial e sangue periférico de pacientes com artrite reumatóide. Esse conhecimento será importante para melhor entendermos a doença, e com isso, possibilitar novas formas de tratamento.

Nossos pesquisadores já comprovaram que os neutrófilos (células brancas do sangue) e as hemácias (células vermelhas do sangue) atuam nos processos de entupimento dos vasos sanguíneos (veias e artérias) que resultam nos estados inflamatórios que causam as dores. Estes neutrófilos, por estarem aumentados em pessoas com artrite reumatóide, causam as dores nas juntas e queremos estudar de que maneira isso acontece.

Mesmo você não tendo a doença, estamos pedindo sua colaboração para a realização dessa pesquisa, atuando no grupo de indivíduos controles nas análises de sangue periférico. Sua participação **não** é obrigatória e caso não queira participar, isso **não** mudará em nada o seu acompanhamento no Hemocentro e no Hospital das Clínicas da UNICAMP.

Se você concordar em participar, leia atentamente o que está escrito abaixo e assine as duas vias desse termo de consentimento. Uma cópia será entregue a você.

Para participar da pesquisa será necessária sua autorização para que a pesquisadora possa ver sua pasta médica e também será necessária uma coleta de 7 ml de sangue. Os riscos dessa coleta são os mesmos de uma coleta para qualquer exame deste tipo: a dor da picada da agulha e algumas vezes um hematoma (ou mancha roxa) no local. Essa coleta será realizada em uma veia do braço por um profissional treinado e que já faz o seu exame de rotina antes de todas as suas consultas no

ambulatório do hemocentro da Unicamp. Mesmo depois de coletar o sangue, se decidir sair da pesquisa basta avisar aos pesquisadores e todos os seus dados serão retirados da pesquisa.

As suas informações serão mantidas em sigilo pelo pesquisador e o material coletado será descartado (jogado fora) após a observação dos neutrófilos. Seus dados serão utilizados apenas para esta pesquisa e quando os resultados forem publicados não será revelado seu nome ou outras informações que possam identificar o paciente.

Você não terá nenhuma vantagem em participar dessa pesquisa e não haverá nenhum resultado de exame. Tudo será apenas para ajudar a medicina a conhecer melhor a Artrite Reumatóide.

Se tiver qualquer dúvida sobre sua participação no estudo você poderá procurar pela pesquisadora **Venina Marcela Dominical** (Fone: (19) 8199-6984), pela **Dra. Nicola Amanda Conran Zorzetto** (Fone: (19) 3521-8734) ou pelo **Dr. Fernando Ferreira Costa** (Fone: (19) 3521-8734), que são orientadores dessa pesquisa. Qualquer reclamação sobre a pesquisa pode ser feita ao **Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP**, Fone: (19) 3521-8936.

Consentimento de Participação

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo de consentimento e recebi as orientações necessárias e esclarecimentos das minhas dúvidas. Entendi o objetivo da pesquisa, como participarei, para que serão utilizadas as minhas informações e os riscos dessa participação. Com todas estas informações, aceito participar desta pesquisa.

Nome ou INICIAIS: _____

Idade _____ anos Número doador: _____

Assinatura do paciente (ou responsável)

Data

Nome e assinatura do pesquisador

Data



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)
(Paciente)

Título da Pesquisa: “Propriedades adesivas e quimiotáticas dos neutrófilos em pacientes com artrite reumatóide e o papel dos nucleotídeos cíclicos nestas alterações”

Pesquisadora Responsável: Venina Marcela Dominical

Orientadora: Dra. Nicola Amanda Conran Zorzetto

Coorientador: Dr. Fernando Ferreira Costa

Objetivo da pesquisa: entender melhor o papel dos neutrófilos, que são as células mais abundantes no líquido sinovial e sangue periférico de pacientes com artrite reumatóide. Esse conhecimento será importante para melhor entendermos a doença, e com isso, possibilitar novas formas de tratamento.

Nossos pesquisadores já comprovaram que os neutrófilos (células brancas do sangue) e as hemácias (células vermelhas do sangue) atuam nos processos de entupimento dos vasos sanguíneos (veias e artérias) que resultam nos estados inflamatórios que causam as dores. O processo de acúmulo de células na junta inflamada da artrite reumatóide ainda não é entendido, mas sabe-se que os neutrófilos estão em grande quantidade no sangue destes pacientes e podem ser alguns dos responsáveis em causar as dores nas juntas, e queremos estudar de que maneira isso acontece.

Como você tem a doença, estamos pedindo sua colaboração para a realização dessa pesquisa. Sua participação **não** é obrigatória e caso não queira participar, isso **não** mudará em nada o seu acompanhamento no Hospital das Clínicas da UNICAMP.

Se você concordar em participar, leia atentamente o que está escrito abaixo e assine as duas vias desse termo de consentimento. Uma cópia será entregue a você.

Para participar da pesquisa será necessária sua autorização para que a pesquisadora possa ver sua pasta médica para anotar e acompanhar seu tratamento (medicação e evolução da doença). Também será necessária uma coleta de 8 ml de sangue (2 frascos pequenos). Os riscos dessa coleta são os mesmos de uma coleta para qualquer exame de sangue que são: a dor da picada da agulha e algumas vezes um hematoma (ou mancha roxa) no local. A coleta de sangue será realizada em uma veia do braço por um profissional treinado e que já faz o seu exame de rotina antes de todas as suas

consultas no ambulatório do hemocentro da Unicamp. Mesmo depois de coletar o sangue, se decidir sair da pesquisa basta avisar aos pesquisadores e todos os seus dados serão retirados da pesquisa.

As suas informações serão mantidas em sigilo pelo pesquisador e o material coletado será descartado (jogado fora) após a observação dos neutrófilos. Seus dados serão utilizados apenas para esta pesquisa e quando os resultados forem publicados não será revelado seu nome ou outras informações que possam identificar o paciente.

Você não terá nenhuma vantagem em participar dessa pesquisa e não haverá nenhum resultado de exame. Tudo será apenas para ajudar a medicina a conhecer melhor a Artrite Reumatóide.

Se tiver qualquer dúvida sobre sua participação no estudo você poderá procurar pela pesquisadora **Venina Marcela Dominical** (Fone: (19) 8199-6984), pela **Dra. Nicola Amanda Conran Zorzetto** (Fone: (19) 3521-8734) ou pelo **Dr. Fernando Ferreira Costa** (Fone: (19) 3521-8734), que são orientadores dessa pesquisa. Qualquer reclamação sobre a pesquisa pode ser feita ao **Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP**, Fone: (19) 3521-8936.

Consentimento de Participação

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo de consentimento e recebi as orientações necessárias e esclarecimentos das minhas dúvidas. Entendi o objetivo da pesquisa, como participarei, para que serão utilizadas as minhas informações e os riscos dessa participação. Com todas estas informações, aceito participar desta pesquisa.

Nome _____

Idade _____ anos HC _____

Assinatura do paciente (ou responsável)

Data

Nome e assinatura do pesquisador

Data

ANEXO 3

Apresentação Semana de Pesquisa da FCM - UNICAMP

14/05/2009

8. PROPRIEDADES ADESIVAS E QUIMIOTÁTICAS DOS NEUTRÓFILOS EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATÓIDE; INFLUÊNCIA DE DIFERENTES TRATAMENTOS

Dominical, Venina Marcela; de Almeida, Camila Bononi; Penteado, Carla Franco ; Bértolo, Manoel Barros; Costa, Fernando Ferreira ; Conran, Nicola ;

9. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E VALOR PROTETOR DO HIDROGEL NO RECOBRIMENTO DAS ALÇAS INTESTINAIS NA GASTROSCÓPIA EXPERIMENTAL

Lanhellas, Frances Lilian Gon; Bueno, Márcia Pereira; Schmidt, Augusto Frederico; da Silva, Regiane ; de Oliveira, Marcelo Ganzarolli; Sbragia, Lourenço ;

10. PROSPECTIVE MINIMAL RESIDUAL DISEASE RESULTS FROM 77 CONSECUTIVE ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA PATIENTS.

Ganazza, Mônica Aparecida ; Assumpção, Juliana Godoy; Scrideli, Carlos Alberto ; Brandalise, Silvia Regina; Yunes, José Andrés ;

11. PROTECTIVE EFFECTS OF ADENINE NUCLEOTIDES ON PERMEABILITY TRANSITION IN BRAIN MITOCHONDRIA

Saito, Ângela ; Castilho, Roger Frigério;

12. QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS T CD4+ CD28NULL E T CD4+ CD28+ EM PACIENTES COM DOENÇA CORONARIANA E INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS

Téo, Fábio Haach; Oliveira, Rômulo Tadeu Dias; Mamoni, Ronei Luciano; Fernandes, Juliano de Lara; Coelho, Otávio Rizzi; Blotta, Maria Heloisa Souza Lima;

13. RARE RHCE PHENOTYPES IN SICKLE CELL DISEASE PATIENTS: IDENTIFICATION AND TRANSFUSION SAFETY

da Costa, Daiane Cobianchi; Credidio, Débora Castilho; Ribeiro, Karina Rosa; Guarnieri, Mara Heloisa ; Amaral, Daphne Renata Tavares; Castilho, Lilian ;

14. RECEPTORES DE INSULINA E SUA IMPLICAÇÃO NA RESTRIÇÃO DE CRESCIMENTO INTRA-UTERINO DA GASTROSCÓPIA EXPERIMENTAL

Bueno, Márcia Pereira; Guadagnini, Dioze ; Schmidt, Augusto Frederico; Ueno, Mirian ; Saad, Mario ; Barini, Ricardo ; Sbragia, Lourenço ;

bacteremia. A terapêutica empírica inicial foi adequada em 65,4% dos episódios de neutropenia, porém, 41% destes pacientes faleceram. Em 34,6% dos episódios em que houve inadequação da terapêutica empírica inicial, a mesma foi modificada após resultado das culturas, no entanto, 44,4% dos pacientes morreram. **Conclusão:** Concluiu-se que identificação e o tratamento precoce são fundamentais para a melhora da sobrevida e que outros fatores, além dos infecciosos podem ter contribuído para a mortalidade. Protocolos de classificação de risco, de diagnóstico e tratamento devem ser estabelecidos em cada serviço, respeitando a microbiota da população estudada.

0126

Chemotactic and adhesive properties of neutrophils from rheumatoid arthritis patients; influence of different treatments

VM Dominical¹, CB Almeida¹, FF Costa¹, MB Bértolo², N Conran¹
¹Universidade Estadual de Campinas – Hemocentro da Unicamp
²Universidade Estadual de Campinas – Depto. de Reumatologia do Hospital de Clínicas da Unicamp

Introduction: A key step in rheumatoid arthritis (RA) inflammatory process development is the recruitment of leukocytes to sites of inflammation. Aims: To understand the adhesive and chemotactic mechanisms of neutrophils in RA and to investigate the influence of different treatments. **Material and Methods:** Peripheral blood was collected from patients fulfilling the ACR criteria for RA and had active disease (defined as Disease Activity Score 28>3.2). Individuals were divided into 3 groups: therapy with methotrexate (MTX, 7.5 to 25mg/week), infliximab therapy (anti-TNF; 3mg/kg with/without MTX) and non-treated group (NT). Healthy individuals were used as controls (CON). Neutrophil (neu) adhesion assays were performed with fibronectin (FN) ligand; *in vitro* chemotactic assays were carried out using IL-8 chemoattractant. **Results:** No significant differences were found in neu adhesion to FN in the three RA groups compared to CON, although neu from NT and MTX patients demonstrated a slight but no significant increase in adhesive properties ($P>0.05$, $n\geq 14$; $16.4\pm 0.7\%$, $18.2\pm 1.7\%$, $18.6\pm 1.2\%$, $17.3\pm 1.5\%$, for CON, NT, MTX, anti-TNF, mean \pm SEM, respectively). When neu were stimulated with IL-8 (500ng/ml) all groups presented increase of adhesion, however, IL-8 stimulated NTneu demonstrated significantly increased adhesion compared to IL-8-stimulated CONneu ($n\geq 5$; $21.6\pm 2.4\%$, $32.3\pm 3.4\%$, $24.7\pm 2.4\%$, $24.1\pm 2.7\%$, adhesion with IL-8 for CON, NT, MTX, anti-TNF, mean \pm SEM, respectively). In chemotaxis assays, no significant differences were observed between groups, however a tendency towards increased migration was observed for the anti-TNF neu group under stimulus of IL-8 chemoattractant (5.8 ± 0.9 , 4.4 ± 0.9 , 5.6 ± 1.2 , 9.1 ± 2.8 , number of cells migrated $\times 10^3\pm$ SEM for CON, NT, MTX, anti-TNF, respectively). **Conclusion:** Neutrophils from non-treated RA patients appear to adhere more in the presence of inflammatory stimuli and treatment may diminish this adhesion. The tendency towards augmented chemotactic properties in neu from anti-TNF patients may indicate that removal of inflammatory mediators from the circulation of RA individuals may improve the chemotactic response of neutrophils. Further studies are required to understand how such an alteration in neutrophil migration may benefit RA patients.

0127

Diagnóstico de Hanseníase Virchowiana pelo envolvimento da medula óssea: Relato de caso e revisão da literatura

LA Silva, MFA Oliveira, KIR Coelho, ME Marques, L Niêro-Melo, J Lastoria, MAC Domingues
 Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB)/ Unesp

A hanseníase é uma infecção crônica causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae*, que afeta principalmente pele e nervos periféricos; algumas vezes a hanseníase virchowiana (MHV) pode afetar tecido linfóide e medula óssea. Neste resumo, comenta-se o caso de um paciente, sem diagnóstico prévio de hanseníase, com numerosos bacilos na BMO. **Caso Clínico:** mulher, 36 anos, com anemia refratária ao tratamento clínico há 3 anos. Apresentava astenia, febre noturna, parestesia em membros inferiores e poliartralgia há 6 meses. Ao exame físico, exibiu hepatoesplenomegalia discreta e lesões cutâneas caracterizadas inicialmente como equimoses em membros inferiores. No hemograma, observou-se hemoglobina de 8,8 g/dL; hematócrito de 27,9% e linfopenia de 3900 células/mm³. Com as hipóteses clínicas de artrite reumatoide, doença linfoproliferativa e doença de Gaucher, o serviço de Hematologia da Faculdade de Medicina de Botucatu-Unesp (FMB) realizou biópsia e aspirado de MO. À microscopia, observou-se MO com celularidade global preservada e presença de acúmulos de células microvacuoladas, associadas a linfócitos maduros, eosinófilos e plasmócitos. Foram feitas as hipóteses diagnósticas morfológicas de doenças relacionadas à presença de células Gaucher-like (micobacteriose e doenças de depósito). A pesquisa de micobactérias pela coloração de Ziehl-Neelsen resultou positiva, revelando inúmeros bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR) no interior dos histiócitos vacuolados. O diagnóstico anatomopatológico na MO foi de micobacteriose. A paciente foi então investigada pela Moléstias Infecciosas da FMB que descartou tuberculose, no entanto observaram-se lesões cutâneas, posteriormente biopsiadas pelo serviço de Dermatologia da FMB. A biópsia revelou o infiltrado denso composto de histiócitos vacuolados na derme superficial, profunda e subcutânea. A pesquisa de BAAR revelou inúmeras globias no interior dos histiócitos vacuolados, semelhantes aos observados na MO. A conclusão anatomopatológica, nesta biópsia cutânea foi de MHV, com acometimento de MO. É citado na literatura, o envolvimento da MO na MHV, relacionado à alta carga bacilar nas lesões cutâneas e aos fenômenos autoimunes associados à doença. Associa-se também, aspectos clínicos como: maior tempo de evolução da doença, maior faixa etária, não sendo observado o acometimento da MO nas formas clínicas indeterminada e tuberculóide. As alterações hematológicas associadas são anemia e leucopenia. Em resumo, este caso, cujo diagnóstico de MHV foi realizado pela BMO, vem demonstrar a importância desse exame na MHV com anemia prolongada e leucopenia, podendo determinar o tratamento mais longo. Salienta-se que, no presente caso, o AMO não demonstrou células vacuoladas, tendo resultado inconclusivo.

0128 (Igual ao 0127)

0129

Diagnóstico do primeiro caso de leishmaniose visceral autóctone do Rio Grande do Sul após esplenectomia

LC Becker, LF Torelli, C Pithan, M Capra, V Provenzi, K Fassina, D Catelli, H Schuh, AC Fenili, T Reboredo, C Salvadori