



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

# Papel do imunorreceptor CD300a na inflamação articular em camundongos

Bruno Vinicius Santos Valiate

Orientador: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira

Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB-UFMG

Belo Horizonte

Abril de 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

# Papel do imunorreceptor CD300a na inflamação articular em camundongos

Tese de doutorado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito necessário à conclusão do doutorado.

Bruno Vinicius Santos Valiate

Orientador: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira

Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB-UFMG

Belo Horizonte

Abril de 2017

"Não extinga a sua inspiração e a sua imaginação,  
não se torne um escravo do seu modelo."

Vincent van Gogh

## Agradecimentos

Quero agradecer a todos que, de alguma forma, colaboraram para que eu realizasse esse trabalho:

- ao meu orientador, Mauro Teixeira, por me abrir as portas, pela confiança depositada, pelos ensinamentos, discussões, pelas oportunidades e pelas assistências na pelada de segunda;
- meus pais por todo apoio, incentivo, presença e confiança;
- à minha irmã Bárbara, minha melhor amiga, pela presença constante e por me ajudar a ser uma pessoa melhor;
- aos familiares que, apesar de perguntarem quando vou parar de estudar e trabalhar, me apoiam e incentivam;
- ao professor Flávio Amaral, pelos ensinamentos, discussões, colaboração e por estar sempre de portas abertas (literalmente), disposto a ajudar;
- aos professores Fred, Caio, Vanessa, Dani, Landa e Tarcília pelas discussões científicas e conhecimentos compartilhados;
- ao Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG, pela oportunidade.
- à Francesca e Laila, da Universidade de Jerusalém, por fornecerem meu objeto de estudo, os camundongos CD300a<sup>-/-</sup>;
- à Ilma, a técnica que faz o laboratório existir com organização;
- à Frank, a técnica que auxiliou os experimentos de citometria;
- aos amigos do grupo Imunofarmacologia, onde fui recebido por braços, latinhas e corações abertos: Elisão, Bráulio, Thiago baiano, Paquito, Aninha, Izabela, Lu ex-Sandy, Marina, Rebeca, Juliana, Nathália, Vivian Louise, Calango, Amandinha, Flávia, Rosália, Lívia, Renata, Pollyana, Katherine, Alesandra e especialmente aos que me ajudaram diretamente na realização desse trabalho: Dai, Rodrigo Pendejo, Celso, Ana Carol e Carol;
- aos amigos de república, com os quais tive experiências que sempre levarei na vida: Vinição, Ariel, Lianny, Eduardo, Diego, Thálice, Francisco e Tati;

- ao grupo de maracatu Bombos de Iroko e seus integrantes, que me ajudaram a crescer como pessoa sócio-política;
- à amiga Rebecca Leite, por estar sempre perto, apesar da distância, e por ajudar a segurar essa barra que é gostar de ciência;
- aos outros amigos de outros laboratórios do ICB: Diego, Iara, Nathalia, Caio, Paula, Rodrigo, Mathias, Lica, Paloma, Lucão e Mamadeira;
- aos amigos da pelada de segunda, sem a qual, toda segunda teria mais cara de segunda;
- aos amigos de Viçosa que permaneceram presentes em minha vida: Douglas, Larissa, Angélica, Délio, Cristiano, Marcos, Marcus, Alysson, Lucas, Moia, Renan, Renato, Fernando, Guemael, Karen, Thiaguim, Pato, Henripes e Túlião;
- enfim, tenho minhas raízes e experiências e por mais que o muitos no meio científico desconsidere, agradeço à Deus.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIA – artrite induzida por antígeno

AR – artrite reumatoide

BCR – receptor de células B

BSA – albumina sérica bovina

ConA – concanavalina A

CD – *cluster of differentiation*

CXCR2 – receptor de quimiocina CXC 2

FCγR – receptor de cadeia FC gama

fMLP – N-Formilmetionina-leucil-fenilalanina

GPCR – receptor acoplado a proteína G

IFN-γ – interferon gama

Ig – imunoglobulina

IL-1β, IL-6, IL-10, IL-17 – interleucinas 1β, 6, 10 e 17

ITAM – imunorreceptor com motivo de ativação baseado em tirosina

ITIM – imunorreceptor com motivo de inibição baseado em tirosina

JAK – Janus cinase

LPS – lipopolissacarídeo

LTB4 – leucotrieno B4

MAPK – proteínas cinases ativadas por mitógenos

mBSA – albumina sérica bovina metilada

MPO – mieloperoxidase

NF-κB – fator nuclear κB

NK – *natural killer*

NLR – receptores do tipo Nod

PI3K – fosfatidilinositol 3-cinase

PTK – proteína tirosino-cinase

RPMI – meio de cultura Roswell Park Memorial Institute

SFB – soro fetal bovino

SHIP – inositol-fosfatase contendo domínio SH2

SHP – tirosino-fosfatase contendo domínio SH2

STAT – transdutor de sinais e ativador de transcrição

TCR – receptor de células T

TLR – receptores do tipo Toll

TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral alfa

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ativação do receptor A com motivo ITAM é inibida in trans pela ativação do receptor inibitório B contendo o motivo ITIM .....	21
Figura 2 – Representação esquemática do CD300a humano e murino mostrando os motivos intracelulares e a interação com os aminofosfolipídeos ligantes, bem como as fosfatases que são, por eles, ativadas .....	25
Figura 3 – Tipos celulares, citocinas e receptores de quimiocinas envolvidos no desenvolvimento da artrite reumatoide.....	28
Figura 4 - Animais CD300a <sup>-/-</sup> recrutam maior quantidade de células para a cavidade sinovial, quando comparados aos animais WT.....	45
Figura 5 - Animais CD300a <sup>-/-</sup> apresentam aumento nos parâmetros inflamatórios mensurados no tecido periarticular quando comparados aos animais WT.....	46
Figura 4 - Animais CD300a <sup>-/-</sup> apresentam maior infiltrado inflamatório no tecido sinovial quando comparados aos animais WT.....	48
Figura 5 – O receptor CD300a está envolvido no início da resposta inflamatória no modelo de artrite induzida por antígeno.....	50
Figura 8 – Não há diferença entre a capacidade hipernociceptiva de animais WT e CD300a <sup>-/-</sup> .....	51
Figura 9 – O processo de imunização não interfere no fenótipo observado nos animais CD300a <sup>-/-</sup> .....	52
Figura 10 – Esplenócitos de animais CD300a <sup>-/-</sup> apresentam perfil mais inflamatório quando comparados aos animais WT.....	54
Figura 11 – Macrófagos CD300a <sup>-/-</sup> estimulados com LPS produzem maiores níveis de citocinas inflamatórias quando comparados a macrófagos selvagens.....	55

Figura 12 – Neutrófilos presentes na cavidade sinovial inflamada apresentam maior expressão do receptor CD300a.....	57
Figura 13 – O receptor CD300a participa do controle da migração de neutrófilos in vitro.....	59
Figura 14 – O receptor CXCR2 de neutrófilos sofre dessensibilização quando previamente estimulados com seu ligante, CXCL1.....	61
Figura 15 – Publicações com a palavra-chave “rheumatoid arthritis” de 1996 a 2016. Dados baseados em buscas no PubMed.....	62
Figura 16 – Pontos de intervenção de receptores inibitórios na resposta de ativação celular.....	72

## Resumo

A artrite reumatoide, que acomete aproximadamente 1% da população mundial, sobretudo mulheres, é uma doença autoimune crônica, de caráter inflamatório. A manutenção da homeostase exige um refinado balanço entre sinais de ativação e inibição da resposta inflamatória, a fim de se evitar dano tecidual e inflamação crônica. Os receptores responsáveis por mediar os sinais de inibição geralmente possuem, em sua porção citoplasmática, motivos denominados ITIM que, quando fosforilados, recrutam e ativam fosfatases que vão atuar desfosforilando diversas moléculas que levam sinais de ativação. O receptor CD300a é um exemplar de receptores inibitórios e é expresso tanto em células de linhagem linfóide quanto células de linhagem mieloide. Com o intuito de se estudar a participação do CD300a na artrite, utilizou-se o modelo de artrite induzida por antígeno (AIA) e animais deficientes para o gene do CD300a. Animais selvagens e nocautes foram imunizados pela via intradérmica, cada um, com 500 µg de mBSA em 100 µL de emulsão contendo volumes iguais de solução salina e adjuvante completo de Freund. 14 dias após a imunização, os animais foram desafiados com 10 µg de mBSA em 10 µL de salina na cavidade da articulação fêmur-tibial. No tempo de 24 horas após o desafio, foram avaliados parâmetros inflamatórios. Quando comparados aos animais selvagens, os animais CD300a<sup>-/-</sup> apresentaram aumento na quantidade total de células (polimorfonucleares em sua maioria), CXCL1, IL-6 e atividade de MPO. Não foi observada participação do CD300a na resolução do modelo. Os macrófagos CD300a<sup>-/-</sup> são mais ativados que os selvagens, produzindo maiores quantidades de CXCL1 e IL-6. Os neutrófilos CD300a<sup>-/-</sup> apresentaram maior capacidade de responder a agentes quimiotáticos que neutrófilos selvagens, mas tal diferença não pôde ser explicada pelo processo de dessensibilização dos GPCRs. Além de não haver diferença na resposta de linfócitos B entre os animais selvagens e CD300a<sup>-/-</sup>, os esplenócitos dos animais nocautes são mais ativados, produzindo, basalmente, maior quantidade de IFN-γ, IL-17 e menor quantidade de IL-10. Com os resultados obtidos é possível afirmar que o CD300a possui relevância no controle da inflamação no modelo de AIA e pode ser uma importante molécula na busca de alvos que modulam a resposta inflamatória exacerbada.

Palavras-chave: CD300a, inflamação, artrite, regulação

## Abstract

Rheumatoid arthritis is an inflammatory autoimmune disease that affects around 1% of the world population, and is more common in women. The maintenance of homeostasis requires balance between activation and inhibition of inflammatory signals in order to avoid tissue damage and chronic inflammation. The receptors that mediate the inhibition signals have ITIM motifs in their cytoplasmic portion, that when phosphorylated, recruit and activate phosphatases that act by dephosphorylating diverse molecules that act as activation signals. Receptor CD300a is an example of inhibitory receptor and expressed in both, lymphoid and myeloid cells. Our aim was to study receptor CD300a in arthritis. We used an antigen induced arthritis (AIA) model and mice lacking the CD300a gene. WT and KO mice were immunized intradermally with 500  $\mu\text{g}$  of mBSA in 100 $\mu\text{L}$  of a saline/FCA (1:1) emulsion. After 14 days, the mice were challenged with 10  $\mu\text{g}$  of mBSA in 10  $\mu\text{L}$  of saline, directly into the tibiofemoral articular cavity. After 24 hours, the inflammatory parameters were analyzed. When compared to the WT mice, CD300a<sup>-/-</sup> mice presented an increased number of total cells, mainly polymorphonuclear leukocytes, besides an increased level of CXCL1, IL-6 and MPO activity. We didn't find a role for CD300a in the resolutive process of our model. CD300a<sup>-/-</sup> macrophages were more activated than the WT ones as they produced higher quantities of CXCL1 and IL-6. CD300a<sup>-/-</sup> neutrophils presented an increased capacity to respond to chemotactic agents compared to WT neutrophils, but it cannot be explained by GPCRs desensitization process. Besides not having any difference in the response of B cells from CD300a<sup>-/-</sup> and WT mice, the splenocytes from the CD300a<sup>-/-</sup> mice are more activated, thus producing an increased amount of IFN- $\gamma$  and IL-17, while secreting less amount of IL-10. Our results show that CD300a has an important role in the control of the inflammatory response in an AIA model, and that it can be an important therapeutic target that regulates exacerbated inflammation.

Key words: CD300a, inflammation, arthritis, regulation.

# Sumário

1. Introdução .....	14
1.1. Inflamação .....	14
1.2. Regulação da resposta inflamatória por ITAM e ITIM.....	18
1.3. CD300a .....	22
1.4. Artrite reumatoide .....	26
2. Justificativa.....	30
3. Objetivos.....	31
3.1. Objetivo Geral .....	31
3.2. Objetivos específicos.....	31
4. Material e métodos.....	32
4.1. Animais .....	32
4.2. Indução da artrite experimental.....	32
4.3. Avaliação da migração de células .....	33
4.4. Contagem total dos leucócitos.....	33
4.5. Contagem diferencial dos leucócitos .....	34
4.6. Processamento do tecido periarticular .....	34
4.7. Ensaio bioquímico da MPO .....	35
4.9. Ensaio de Imunoadsorção Ligado a Enzima (ELISA) para dosagem de citocinas .....	36
4.10. Ensaio de Imunoadsorção Ligado a Enzima (ELISA) para dosagem de IgG anti-mBSA.....	37
4.11. Avaliação de hipernocicepção - teste de pressão crescente na pata de camundongo.....	38
4.12. Isolamento e cultura de esplenócitos.....	39
4.13. Extração de neutrófilos derivados da medula óssea .....	39
4.14. Ensaio de quimiotaxia.....	40
4.16. Isolamento de macrófagos peritoneais residentes.....	42
4.17. Análises Estatísticas .....	43
5. Resultados .....	44
5.1. O tecido periarticular e o lavado sinovial de animais CD300a <sup>-/-</sup> apresentam parâmetros inflamatórios aumentados, quando comparados aos animais selvagens .....	44
5.2. O receptor CD300a não está relacionado ao processo de resolução no modelo de artrite induzida por antígeno.....	49
5.3. A ausência do receptor CD300a não altera os níveis de hipernocicepção mecânica nos animais com AIA.....	51

5.4. O processo de imunização não é responsável pela diferença de fenótipo observado.....	52
5.5. Os esplenócitos de animais CD300a <sup>-/-</sup> apresentam perfil mais inflamatório que esplenócitos de animais selvagens .....	53
5.6. Macrófagos deficientes para o receptor CD300a expressam maiores níveis de mediadores inflamatórios quando comparados a macrófagos selvagens .....	55
5.7. A expressão do CD300a em neutrófilos na cavidade sinovial de animais com AIA é aumentada e sugere importância do receptor .....	56
5.8. O receptor CD300a participa do controle da migração de neutrófilos sob diferentes estímulos .....	58
5.9. A dessensibilização do receptor CXCR2 dá indícios de participação, porém não explica a maior capacidade quimiotática dos neutrófilos CD300a <sup>-/-</sup> .....	60
6. Discussão .....	62
7. Conclusão .....	73
8. Referências .....	74

# 1. Introdução

## 1.1. Inflamação

Rubor, tumor, calor, dor e perda de função: desde o a Roma antiga até hoje em dia, este conjunto de sinais é conhecido como inflamação. A resposta inflamatória é objeto de constante estudo e a cada dia os horizontes se ampliam para melhor compreender o processo inflamatório a fim de intervir ajudando a cura e/ou o prognóstico de várias doenças.

Inflamação é uma resposta protetora adaptativa iniciada por fatores exógenos como microorganismos, agentes químicos irritantes e moléculas externas, bem como fatores endógenos sintetizados por células como resultado de dano tecidual, morte celular ou metabolismo debilitado (Carlberg et al. 2016).

Respostas inflamatórias locais ou sistêmicas têm como objetivo eliminar o estímulo desencadeador promovendo a reparação do tecido afetado e, em caso de infecção, estabelecer uma memória imune que permitirá ao hospedeiro responder de forma mais rápida e mais específica em um futuro reencontro com o agente (Fullerton & Gilroy 2016; Kotas & Medzhitov 2015). Medzhitov resume inflamação como uma reação biológica frente à perturbação na homeostase tecidual (Medzhitov 2008). A inflamação é desencadeada por receptores de reconhecimento padrão do hospedeiro do sistema imune inato como o receptores do tipo Toll (TLRs), do tipo RIG-I (RLRs) e do tipo NOD (NLRs) que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos e a danos teciduais (Barton 2008). Este reconhecimento inicial da infecção é mediado por células residentes como macrófagos, mastócitos, células dendríticas e células linfoides inatas (células linfoides sem rearranjo de receptores) e desencadeia uma série de cascatas de sinalização que culmina na ativação de fatores de transcrição

como o fator nuclear kB (NF-kB), o fator regulatório de interferon (IRF) e a proteína ativadora-1 (AP-1), que induzem a expressão de genes que codificam uma gama de citocinas e quimiocinas inflamatórias, peptídeos antimicrobianos, fatores do complemento e interferon (Medzhitov 2008; Spits et al. 2013; Liu & Cao 2016). Estes mediadores têm como principal e imediato efeito promover um exsudato inflamatório, levando, graças à microcirculação, proteínas plasmáticas e leucócitos (neutrófilos em sua maioria) até o tecido afetado. O endotélio ativado se torna propício para que se inicie o processo de recrutamento dos neutrófilos, que começa com o rolamento, seguido da firme adesão à superfície endotelial e culmina na transmigração. Este processo deve-se às moléculas de adesão como as selectinas, presentes nas células endoteliais, e as integrinas e receptores de quimiocinas presentes nos leucócitos (Medzhitov 2008; Pober & Sessa 2007).

Quando chegam ao sítio de inflamação, os neutrófilos se tornam ativados tanto por contato direto com o patógeno/tecido danificado ou através da ação de citocinas secretadas por células residentes. Na tentativa de eliminar o agente causador da inflamação, os neutrófilos liberam grânulos com conteúdos tóxicos, que inclui espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, proteinase 3, catepsina G e elastase (Nathan 2006). Estas potentes moléculas efetoras não fazem discriminação entre alvos microbianos e do hospedeiro, dessa forma são inevitáveis os danos teciduais (Nathan 2002).

A função primeira da inflamação é remover o estímulo nocivo, proteger o hospedeiro de danos adicionais, iniciar o processo de cicatrização e restaurar o tecido danificado até que o mesmo reconstitua sua função fisiológica normal (Mino & Takeuchi 2013). Sob condições padrões, uma resposta aguda de sucesso se baseia na chegada de leucócitos ao sítio de inflamação, remoção do

estímulo nocivo e restabelecimento da homeostase com a infiltração de fibroblastos que liberam metaloproteinases de matriz (MMPs) para remodelamento tecidual (Rohani & Parks 2015). Em geral, a imunidade inata inicia uma inflamação aguda em minutos e, após dar fim ao estímulo desencadeador, a resposta inflamatória resolve em horas ou no máximo em três dias (Franceschi & Campisi 2014).

De modo contrário à inflamação aguda, a inflamação crônica persiste por semanas, meses ou até mesmo por anos, levando à degeneração tecidual e à enfermidade. Isso envolve uma disfunção no processo de resolução da inflamação (Carlberg et al. 2016). Por muitos anos pensava-se que inflamação aguda e crônica eram dirigidas por causas diferentes, células e mediadores inflamatórios diferentes e resultava em efeitos bastante diferentes. Entretanto já é aceito que os processos são interligados, de forma que defeitos nos mecanismos da inflamação aguda e sua resolução dirigem a inflamação crônica (Lo et al. 1999). Apesar de não existir um mecanismo exato e universal para a inflamação crônica, alguns fatores de predisposição são conhecidos, onde a susceptibilidade genética se encontra como um dos principais. Polimorfismos nos genes que codificam as citocinas IL-17, IL-6 e IL-1 $\beta$  estão diretamente relacionados a doenças crônicas como asma, psoríase, doença cardíaca reumática e periodontite (Nasef et al. 2017). Foi identificada uma relação entre a doença de Crohn e polimorfismos de base única (SNPs) nas proteínas que compõe a via JAK-STAT (Ferguson et al. 2010).

Além dos fatores genéticos, alterações no ambiente também podem impactar ambos, o início e a manutenção da inflamação crônica. Exemplos de fatores ambientais são infecções, estresse e dieta.

Humanos vivem em constante interação com uma miríade de microrganismos no ambiente. Ativação imune local devido a perda da função de barreira, invasão de patógenos ou liberação de mediadores endógenos, seguido por dano tecidual e comprometimento funcional pode levar a inflamação e doença crônicas (Nasef et al. 2017). O colapso da mucosa intestinal causado pelo vírus HIV resulta em uma exposição crônica a produtos microbianos, como LPS (Brenchley et al. 2006). Essa exposição leva ao recrutamento constante de neutrófilos e estes exercem papel crucial também na inflamação crônica (Soehnlein et al. 2017). Em infecções virais, bacterianas, fúngicas e por protozoários pode acontecer de células dendríticas darem origem a um subtipo conhecido como células dendríticas inflamatórias que se diferenciam a partir de monócitos e estão presentes principalmente durante infecção e inflamação crônicas (León et al. 2007).

O estresse crônico pode levar a várias doenças crônicas através da ativação, mediada por inflamação, do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal e do sistema nervoso simpático (Tian et al. 2014). Estudos mostram que pessoas submetidas a estresse crônico causado por baixo status socioeconômico possuem expansão seletiva de monócitos inflamatórios imaturos no sangue periférico causado por alterações na via  $\beta$ -adrenérgica (Powell et al. 2013). Pessoas que perdem entes queridos apresentam maior morbidade e letalidade, além de elevados níveis de IL-6 (Buckley et al. 2011). Com relação à dieta desbalanceada, além de alimentos que podem causar inflamação crônica, dietas com deficiência em vitaminas e minerais são conhecidas por contribuir para condições pró-inflamatórias (Nasef et al. 2017).

## **1.2. Regulação da resposta inflamatória por ITAM e ITIM**

Respostas biológicas, e as funções celulares, geralmente são controladas e sustentadas por um equilíbrio entre sinais positivos e negativos. No sistema imune isso é bastante evidente, pois para manter a integridade do organismo, este necessita ser controlado por um refinado balanço de sinais a fim de evitar exacerbação ou supressão demasiada das respostas. O descontrole dos sinais de ativação pode levar à autorreatividade e à inflamação exacerbada, ao passo que o descontrole dos sinais inibitórios pode levar à imunossupressão (Ravetch & Lanier 2000). O contínuo acúmulo e ativação dos leucócitos marca a inflamação crônica e sugere disfunção dos mecanismos regulatórios negativos. Abordagens clínicas que visam modular a inflamação têm focado na inibição da produção de mediadores pró-inflamatórios e na supressão do início da resposta inflamatória, como por exemplo as vias de sinalização que levam à produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (Hanada & Yoshimura 2002). Entre os mecanismos existentes para se tentar alcançar essa homeostase, há a ação de vários receptores, geralmente de superfície, que possuem, de forma geral, capacidades ativadoras e inibitórias (Gergely et al. 1999).

Uma característica comum que identifica receptores como membros da classe inibitória é sua habilidade em atenuar sinais de ativação iniciadas por outros receptores que contém, geralmente, motivo de ativação de imunorreceptor baseado em tirosina (ITAM). Sinais desencadeados por receptores contendo ITAM são contrabalanceados por sinais negativamente equivalentes, oriundos de receptores que possuem motivo de ativação de imunorreceptor baseado em tirosina (ITIM) (Ravetch & Lanier 2000). O motivo ITAM, descrito pela primeira vez no início de 1995, é caracterizado pela

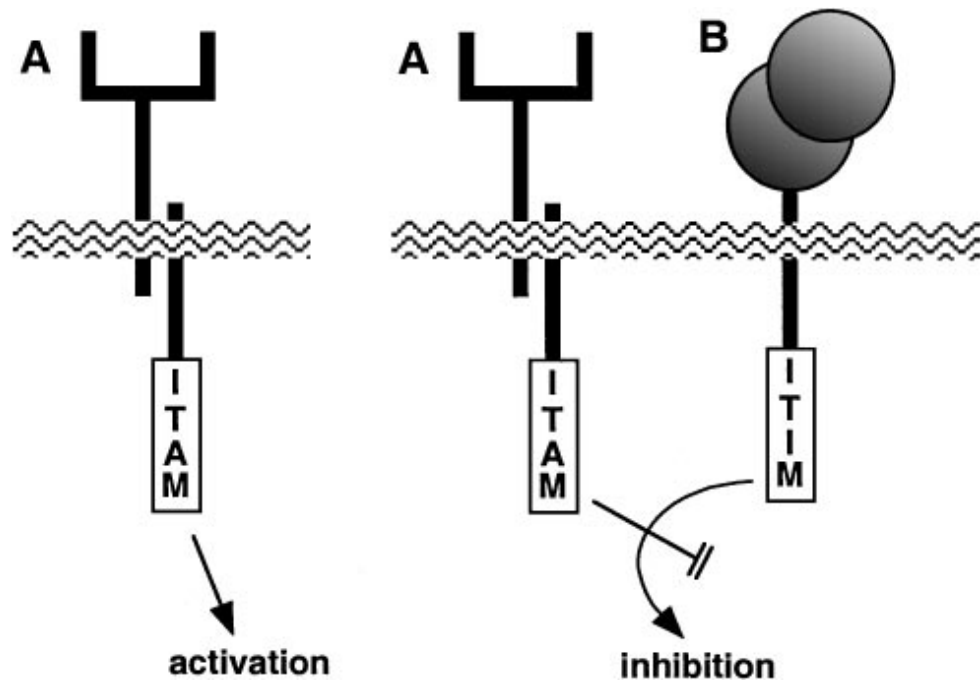
seqüência consenso YxxL/I(X<sub>6-8</sub>)YxxL/I (onde x representa um aminoácido qualquer) (Cambier 1995). No final do mesmo ano, Daëron e colaboradores observaram que a ativação celular dependente dos receptores de células B (BCR), T (TCR) e de receptores Fcγ (ambos contendo ITAM) era inibida por meio de coligação com o receptor FcγIIb. Uma sequência aminoacídica inibitória na porção intracelular do receptor FcγIIb (V/LxYxxL/V) era conhecida e, devido sua analogia estrutural com o domínio ITAM, foi forjado o termo ITIM (Daëron et al. 1995).

A família de receptores que contém ITAM inclui, principalmente, as cadeias CD3γ, CD3δ, CD3ε e ζ associadas ao TCR; cadeias Igα e Igβ associadas ao BCR; alguns receptores de porção Fc, como FcεRI, FcγRI e FcγRIII, e várias moléculas transmembranas codificadas por vírus (Barrow & Trowsdale 2006). Em geral o evento que sucede a interação dos receptores contendo ITAM com seus ligantes é a ativação de proteínas cinases da família Src, que fosforila ambos os resíduos de tirosina do motivo ITAM que, por sua vez, leva ao recrutamento e ativação de proteínas tirosino-cinases (PTKs) como Syk e ZAP-70 (Billadeau & Leibson 2002). As PTKs, ativadas via ITAM, recrutam e fosforilam uma variedade de moléculas iniciando uma cascata de eventos bioquímicos, envolvendo principalmente proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK) e fator nuclear κB (NF-κB), que levam à proliferação, diferenciação e ativação celular (Isakov 1998; Ivashkiv 2009).

O receptor FcγIIb foi o primeiro descoberto e permanece como melhor exemplo estudado de um receptor que contém o motivo ITIM (Ravetch & Lanier 2000). Desde a descoberta do motivo ITIM no FcγRIIb, a família de receptores

inibitórios vem crescendo com a chegada de membros como receptores do tipo Ig de células NK (KIR) e Siglec, entre outros (Long n.d.; Walter et al. 2008).

Após a interação do receptor inibitório com seu ligante, os resíduos de tirosina contidos nos motivos ITIM são fosforilados por cinases da família Src, como a Lck, e servem como sítio de ancoragem, recrutando e ativando fosfatases citosólicas que possuem o domínio de homologia Src 2 (SH2), como a tirosino-fosfatase contendo domínio SH2 (SHP)-1, SHP-2 e inositol-fosfatase contendo domínio SH2 (SHIP) (Ravetch & Lanier 2000). A fosforilação do ITIM e o recrutamento de fosfatases pode ocorrer tanto por meio de co-ligação do receptor de ativação com o inibitório, quanto por interação do ligante unicamente com o receptor inibitório, a depender do receptor. Neste último caso, pode acontecer do receptor inibitório ter associado a ele, na porção intracelular, cinases da família Src, como os receptores KIR-Ls que são constitutivamente associados à cinase Lck em células NK. Dessa forma, a ativação do KIR-L por seu ligante é suficiente para que a Lck seja ativada e fosforile os motivos ITIM (Binstadt et al. 1996). A especificidade da ligação do domínio SH2 ao ITIM deriva da presença de dois resíduos de aminoácidos hidrofóbicos dispostos simetricamente, na posição Y-2 e Y+2. De modo sintético, as fosfatases ativadas via ITIM irão se tornar aptas para intervir, *in trans*, nas cascatas de sinalização dependentes de fosforilação por PTKs, regulando-as negativamente (Cantoni et al. 1999; Daëron et al. 2008) (Figura 1).



(Long 1999)

**Figura 1 - Ativação do receptor A com motivo ITAM é inibida in trans pela ativação do receptor inibitório B contendo o motivo ITIM.**

O mecanismo da fosforilação do ITIM e do recrutamento das fosfatases, bem como as consequências desse recrutamento, diferem dependendo do receptor e da fosfatase. A inibição mediada pelo recrutamento de SHIP ocorre nas etapas iniciais de uma resposta de ativação, desligando todos os eventos subsequentes, incluindo mobilização de cálcio, liberação de citocinas, ativação transcricional e proliferação celular (Daëron et al. 2008). Coligação do FcγRIIb com o BCR leva ao recrutamento de SHIP, pelo FcγRIIb, e anula a ativação do BCR por meio da hidrólise do fosfatidilinositol-trifosfato (PIP3) de membrana (Ono et al. 1996). Receptores que recrutam SHP-1 e SHP-2 podem intervir tanto nas etapas iniciais quanto nas distais em uma cascata de sinalização de ativação. SHP-1 e SHP-2 intervêm no desenvolvimento de células progenitoras, crescimento celular, inflamação e quimiotaxia, modulando sinais celulares que

envolvem cinase fosfatidilinositol-3 (PI3K), Akt, cinase Janus-2 (JAK2), MAPK, NF- $\kappa$ B entre outras (Chong & Maiese 2007).

Os recentes estudos envolvendo imunorreceptores contendo ITAM ou ITIM têm rompido com alguns paradigmas. Em algumas circunstâncias, o motivo ITAM pode mediar inibição e o motivo ITIM pode propagar sinal de ativação. Uma explicação para essa sinalização permutada é a presença de determinados resíduos de aminoácidos próximos ao motivos (Barrow & Trowsdale 2006). Outro fato interessante nessa ambiguidade de respostas, é a presença de motivos ITIM dentro de motivos ITAM, os chamados *closet*-ITIM. Sob fosforilação parcial do ITAM, o *closet*-ITIM pode mediar uma resposta inibitória e, em outros contextos, após uma desejada resposta de ativação mediada pelo ITAM, o *closet*-ITIM pode desligar a sinalização prevenindo ativação crônica (Ganesan et al. 2003; Barrow & Trowsdale 2006).

### **1.3. CD300a**

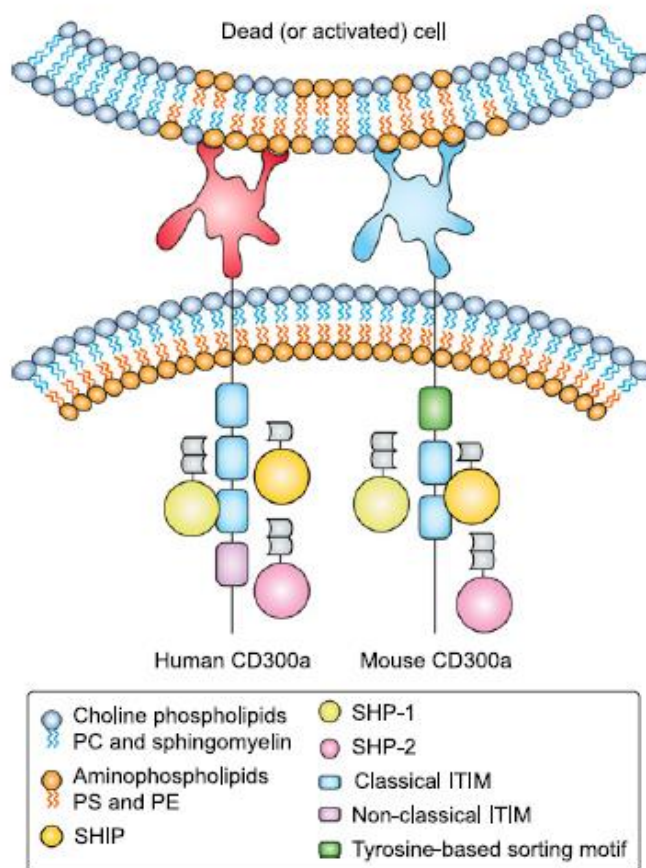
A família CD300 de imunorreceptores inclui receptores ativadores e inibitórios. Em humanos há sete membros, localizados no cromossomo 17 e em camundongos os membros são nove e se localizam no cromossomo 11, região sintética do cromossomo 17 humano (Borrego 2013). Os integrantes da família CD300 de receptores são glicoproteínas transmembranas do tipo I com um único domínio extracelular do tipo IgV contendo duas pontes dissulfeto e com a região próxima à membrana estendida e rica em prolinas, serinas e treoninas que ligam o domínio Ig ao transmembrana (Clark et al. 2009). Somente CD300a e CD300f possuem uma porção citoplasmática longa contendo motivos ITIM, enquanto os outros membros possuem a porção citoplasmática curta contendo resíduos de

aminoácidos carregados que permitem a associação com outras moléculas transmembrana, como a proteína DAP12, DAP10 e cadeias de receptores Fc. A “ovelha negra” da família é o CD300g, que é codificado por um gene mapeado a certa distância do complexo principal e não possui características moleculares que sugerem um potencial ativador ou inibitório (Borrego 2013; Clark et al. 2009).

O CD300a destaca-se dentro da família porque há fortes evidências de que seu gene vem sofrendo seleção positiva, o que sugere uma grande significância do receptor na manutenção de funções celulares importantes (Nielsen et al. 2005; Bustamante et al. 2005). Tanto células de linhagem linfóide quanto mieloide apresentam expressão do receptor (Clark et al. 2009). No que diz respeito à linhagem linfóide, CD300a é expresso na superfície de todas as células NK (Cantoni et al. 1999) e em alguns subtipos de células B e T (Clark et al. 2007; Silva et al. 2011). Células T CD4<sup>+</sup> imaturas expressam baixos níveis do CD300a, enquanto as células efetoras e de memória podem ser divididas em CD300<sup>+</sup> e CD300a<sup>-</sup>, e células T regulatórias são CD300a<sup>-</sup>. Células de memória CD300a<sup>-</sup> apresentam proliferação ligeiramente menor que células de memória CD300<sup>+</sup> (Clark et al. 2007; Narayanan et al. 2010). Em células T CD8<sup>+</sup> a expressão do CD300a é relacionada a um fenótipo mais citotóxico, sugerindo que o CD300a é expresso principalmente em células efetoras e de memória, enquanto células T CD8<sup>+</sup> imaturas expressam baixos níveis do receptor (Xu et al. 2012). Na linhagem mieloide, CD300a é detectado na superfície de células dendríticas plasmocitoides e mieloides, monócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e mastócitos (Udayanga et al. 2016; Sabato et al. 2012; Munitz et al. 2006; Alvarez et al. 2008).

O CD300a humano difere do murino na quantidade de motivos ITIM. Enquanto o exemplar humano possui três motivos clássicos e um não-clássico (SxYxxI), o murino possui dois clássicos e um outro motivo de triagem baseado em tirosina (YVNL) (Figura 2) (Zenarruzabeitia et al. 2015). Foram descritos dois ligantes para o CD300a, a fosfatidilserina e a fosfatidiletanolamina (Nakahashi-Oda, Tahara-Hanaoka, Honda, et al. 2012; Simhadri et al. 2012), aminofosfolipídeos que são expostos do lado extracelular da membrana plasmática como “eat-me signal” de células apoptóticas, servindo como sinal para sua fagocitose (Park et al. 2007).

Após interação com o ligante e consequente ativação do receptor, as tirosinas contidas nos motivos ITIM intracelulares do CD300a são fosforiladas por cinases da família Src, como a Lck e recrutam fosfatases (DeBell et al. 2012). Até o momento foram descritas três fosfatases recrutadas e ativadas pelo CD300a: SHP-1, SHP-2 e SHIP. O tipo celular e o estímulo determinam qual dessas fosfatases será ativada (Cantoni et al. 1999; Munitz et al. 2006; Bachelet et al. 2005). Na tentativa de se descobrir qual dessas fosfatases é a mais requerida para a transmissão do sinal inibitório do CD300a, experimentos utilizando animais knockout para as diferentes fosfatases, bem como ensaios de imunoprecipitação foram realizados. SHP-1 se mostrou mais fiel à função de levar adiante a missão inibitória do CD300a (Nakahashi-Oda, Tahara-Hanaoka, Shoji, et al. 2012; DeBell et al. 2012).



Zenarruzabeitia et al, 2015

**Figura 2 - Representação esquemática do CD300a humano e murino mostrando os motivos intracelulares e a interação com os aminofosfolipídeos ligantes, bem como as fosfatases que são, por eles, ativadas.**

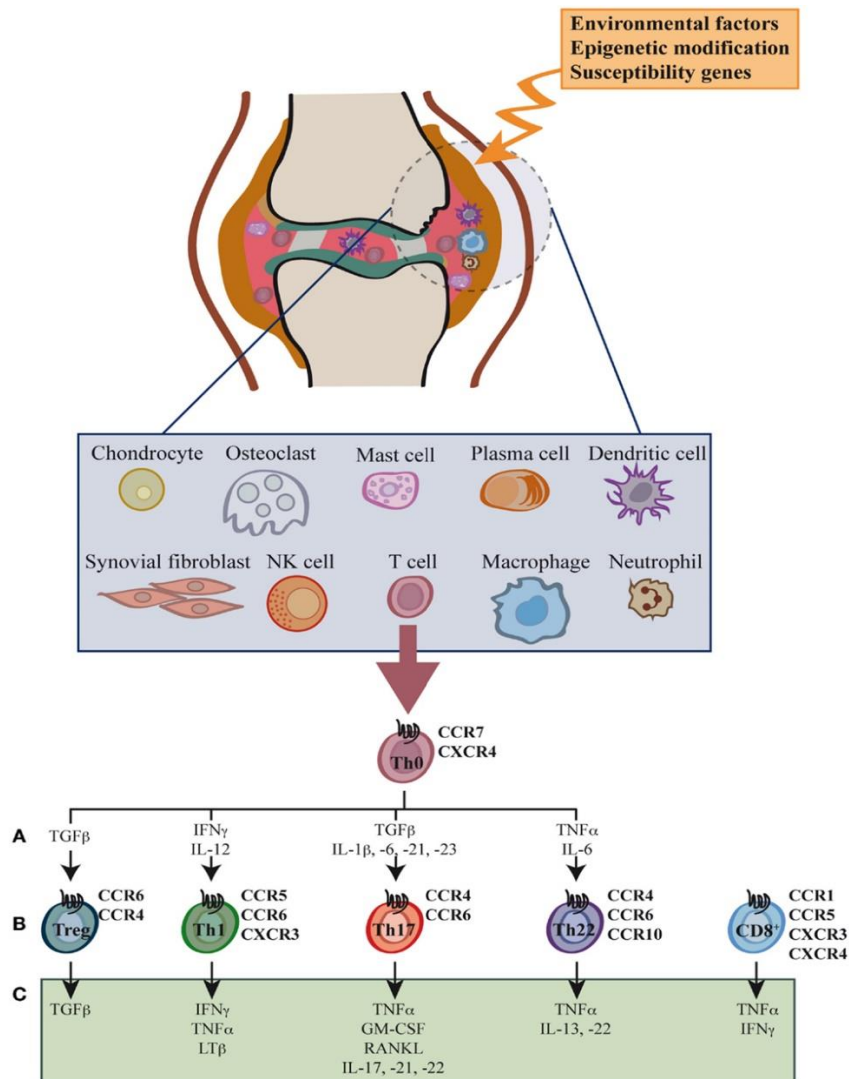
Em mastócitos o bloqueio do CD300a com anticorpos monoclonais revelou um aumento expressivo da produção de mediadores inflamatórios (Bachelet et al. 2005) enquanto a ligação de um anticorpo bi-específico para CD300a e a porção Fab de IgE anulou a sinalização gerada pelo FcεRI impedindo, assim, a resposta alérgica (Bachelet et al. 2005; Bachelet et al. 2006). De forma semelhante, em eosinófilos, a ativação do CD300a por ligação cruzada com anticorpo monoclonal inibiu a transmigração dependente de eotaxina e a liberação de citocinas inflamatórias (Munitz et al. 2006). Ligação cruzada do

CD300a ainda mostrou inibir citotoxicidade mediada por célula NK (Cantoni et al. 1999) e proliferação de linfócitos B (Silva et al. 2011). Como tudo é questão de equilíbrio e não existe algo que seja, por completo, bom ou ruim, o receptor inibitório também pode agir de forma negativa quando ativado. Partículas virais de West Nile, Chikungunya e Dengue Virus ligam-se ao CD300a e ajudam na fase de penetração do vírus na célula, facilitando e exacerbando a infecção (Carnec et al. 2015). Ainda foi demonstrado que a interação de fosfatidilserina com o CD300a em células dendríticas inflamatórias aumenta a resposta Th2 e a inflamação alérgica das vias aéreas em modelo de imunização com OVA mais hidróxido de alumínio (Miki et al. 2015).

#### **1.4. Artrite reumatoide**

Artrite reumatoide (AR), a mais comum das artropatias, é uma doença autoimune crônica de caráter inflamatório que acomete principalmente as articulações sinoviais de 0,5 a 1% da população mundial, sendo a maioria mulheres. A AR está associada a alto grau de morbidez, tornando-se, então, um enorme problema econômico e social resultando na diminuição da expectativa de vida e incapacidade motora do paciente (Gabriel 2001), além de gerar um gasto anual de aproximadamente \$16 bilhões, incluindo as despesas sócio-econômicas diretas, como custo com despesas médicas, e custos indiretos, como a queda de produtividade e redução da qualidade de vida do paciente (Dunlop et al. 2003). Com a progressão da doença, causada pelo desbalanço da regulação da resposta inflamatória, hiperplasia sinovial, angiogênese e formação de pannus são induzidos e sem o tratamento apropriado estes processos vão levando a uma irreversível destruição das articulações e dos ossos. Na AR a

inflamação se desencadeia na cavidade sinovial e é caracterizada pela presença de infiltrado celular contendo granulócitos, células NK, linfócitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e B e macrófagos na cavidade, levando a uma intensa produção de quimiocinas, e citocinas inflamatórias que vão contribuir com a manutenção e progressão da doença (Figura 3) (Spector 1990; Harris & Harris 1990; Mellado et al. 2015). Na membrana sinovial estão presentes os sinoviócitos (que podem ser do tipo fibroblastos ou do tipo macrófagos) células responsáveis pela secreção do líquido que reduz o atrito da cartilagem articular (líquido sinovial), e que também auxiliam na manutenção da inflamação secretando citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ . No contexto de AR, os sinoviócitos proliferam ativamente causando erosão da cartilagem e do osso (Sakaguchi & Sakaguchi 2005). O papel crítico das citocinas produzidas pelos diversos tipos celulares envolvidos na patogênese da AR evidencia um caminho na busca por novos alvos terapêuticos. São bem estabelecidos os tratamentos que focam nas vias de sinalização do TNF- $\alpha$  (Hess et al. 2011; Kievit et al. 2008) e da IL-6 (Sweiss et al. 2014; Lazzerini et al. 2016), dadas as funções cruciais dessas duas citocinas, que podem ser consideradas pivôs da doença (McInnes & Schett 2007). Entrando no time de citocinas alvo, encontram-se também a IL-1 $\beta$ , GM-CSF e IL-17 (Noack & Miossec 2017).



Mellado e cols, 2015

**Figura 3 - Tipos celulares, citocinas e receptores de quimiocinas envolvidos no desenvolvimento da artrite reumatoide.**

As primeiras pistas que levaram os cientistas a considerarem a AR como autoimune foram os fatores reumatoides, que são auto-anticorpos. Aproximadamente 80% dos pacientes são soropositivos para os fatores reumatoides e sua detecção pode prever um curso mais agressivo e destrutivo da doença (Firestein 2003). O potencial patogênico dos fatores reumatoides reside na possibilidade de formação de imuno-complexos que podem fixar o complemento e liberar fatores quimiotáticos como a proteína C5a que recrutam

células inflamatórias, principalmente neutrófilos, que quando ativados secretam enzimas proteolíticas capazes de prejudicar o tecido (Firestein 2003). As células-chave para o início da doença são os linfócitos T CD4<sup>+</sup>, essenciais para a produção de auto-anticorpos pelos linfócitos B (Sakaguchi & Sakaguchi 2005), sendo a doença mantida, principalmente pela presença contínua de neutrófilos (Cascão et al. 2010).

Para melhor se compreender os processos que levam à patogênese da AR, fez-se necessário o estudo em modelos animais. Em 1977, Brackertz e colaboradores mostraram que alguns modelos murinos de artrite induzida por antígeno (AIA), devido a semelhanças histopatológicas e imunes, podem ser úteis ferramentas na investigação dos mecanismos celulares e moleculares da AR (Brackertz et al. 1977; Crossley et al. 1987). O modelo de AIA é dependente de células T (Pohlers et al. 2004; Yoshino & Yoshino 1992), mas os neutrófilos estão envolvidos e são importantes em sua patogênese e manutenção (Grespan et al. 2008). Um dos modelos de AIA mais estudados, é o induzido por soroalbumina bovina metilada (mBSA), onde os animais são imunizados com adjuvante completo de Freund emulsificado com mBSA e posteriormente desafiados com mBSA. O modelo de AIA induzida por mBSA possui respaldo devido à reprodução de parâmetros que caracterizam a AR, como tipos celulares, citocinas e quimiocinas envolvidos, confirmados por diversos estudos (Brackertz et al. 1977; Wong et al. 2006; Santos et al. 2008; Boe et al. 1999).

## 2. Justificativa

O processo inflamatório é de suma relevância na manutenção da integridade do hospedeiro, participando da defesa contra infecções e lesões. Todavia, uma vez iniciada, indevidamente regulada e não finalizada, a inflamação pode causar danos teciduais, levar à processos fibróticos, doenças auto-imune, câncer e inflamação crônica, como é o caso da artrite reumatoide (Medzhitov 2008). Diversos estudos buscam novos alvos terapêuticos com o fim de intervir no processo inflamatório e ajudar a restauração da homeostase. Nos últimos anos os receptores inibitórios tem ganhado espaço e visibilidade no cenário de controle de respostas inflamatórias (Ravetch & Lanier 2000), fato que os colocam como objeto de estudos que buscam novos alvos terapêuticos. Dentre os receptores inibitórios, o CD300a merece destaque por vir sofrendo seleção positiva em humanos (Bustamante et al. 2005) e, em pouco tempo de estudo, estar envolvido no controle de diversas doenças (Silva et al. 2011; Udayanga et al. 2016; Carnec et al. 2015; MUNITZ et al. 2006). Dessa maneira, acredita-se que o estudo do envolvimento do receptor CD300a no modelo de artrite induzida por antígeno pode fornecer bases que podem ser úteis na modulação da resposta celular a fim de se evitar uma inflamação exacerbada não apenas no modelo estudado, mas também em outras doenças inflamatórias.

## **3. Objetivos**

### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar a participação do imunorreceptor CD300a na resposta inflamatória em modelo de artrite induzida por antígeno.

### **3.2. Objetivos específicos**

- Avaliar parâmetros inflamatórios em animais selvagens e CD300a<sup>-/-</sup> tais como: a) quantidade de células no lavado intra-articular; b) atividade mieloperoxidase tecidual; c) quantificação de quimiocinas e citocinas e d) histologia;
- Verificar o envolvimento do CD300a no processo da resolução inflamatória;
- Avaliar a expressão do CD300a nas células do infiltrado sinovial;
- Verificar o papel do CD300a nos principais tipos celulares envolvidos no modelo de AIA.

## **4. Material e métodos**

### **4.1. Animais**

Foram usados camundongos machos com aproximadamente 25 gramas, de background BALB/c com idade entre 8 e 10 semanas. Os animais selvagens foram obtidos do Biotério Central da UFMG e os animais CD300a<sup>-/-</sup> do biotério mantido pelo nosso grupo de pesquisa (Laboratório de Imunofarmacologia). Todos os animais foram mantidos no ciclo claro-escuro de 12-12 horas, com livre acesso a água e ração. Os procedimentos envolvendo manuseio de animais foram feitos conforme protocolos aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) sob o protocolo de pesquisa número 192/2012.

### **4.2. Indução da artrite experimental**

Modelo experimental de artrite foi induzido pela injeção intra-articular de albumina de soro bovino metilada (mBSA) (AIA) em animais previamente imunizados com emulsão de mBSA e adjuvante completo de Freund (COELHO *et al.*, 2008). Esse modelo, que representa de forma aguda a lesão articular, foi utilizado para avaliação dos efeitos obtidos com os tratamentos propostos. Todos os animais foram anestesiados com solução de cetamina (150 mg/kg), xilazina (10 mg/kg) diluído em PBS estéril para a realização de todos os procedimentos cirúrgicos. Camundongos BALB/c selvagens e CD300a<sup>-/-</sup> foram imunizados por via intradérmica na base da cauda com 500 µg de albumina sérica bovina metilada (mBSA; Sigma) em 100 µl de uma emulsão de solução salina e volume equivalente de adjuvante completo de Freund (CFA; Sigma). O desafio com antígeno foi realizado 14 dias após a imunização, sendo que cada animal recebeu uma injeção de mBSA (10µg mBSA em 10 µL solução salina

estéril) na articulação fêmur-tibial traseira. Os parâmetros inflamatórios foram avaliados 24 horas após o desafio, quando ocorre o pico da resposta inflamatória nesse modelo. A cavidade articular do joelho foi lavada com albumina sérica bovina (BSA 3%) (2 x 5 µl) e tecidos periarticulares removidos para avaliação da atividade de MPO (mieloperoxidase).

#### **4.3. Avaliação da migração de células**

Após 24h do desafio, os camundongos foram anestesiados com uma mistura de cetamina 150 mg/kg e xilazina 10 mg/kg e eutanasiados. Para avaliar a migração de leucócitos para a cavidade articular, foi realizado um lavado intra-articular. Este procedimento consistiu em injetar 10 µL de uma solução de albumina bovina 3% na cavidade articular, lavando-a três vezes para que uma amostra das células presentes no interior da cavidade fosse coletada juntamente com a solução de albumina recapturada com uma pipeta. Este lavado de células da articulação foi diluído em 90 µL de albumina bovina 3% para a posterior contagem total e diferencial dos leucócitos.

#### **4.4. Contagem total dos leucócitos**

Alíquotas de 20 µL do lavado articular foram diluídas em 40 µL de solução Turk, sendo a contagem total dos leucócitos realizada em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio óptico (aumento de 100x) e contador manual. O número total de leucócitos foi utilizado para cálculo da percentagem dos diferentes leucócitos encontrados no lavado articular a partir da contagem/discriminação por visualização de lâminas preparadas por citocentrifugação sob microscópio óptico.

#### **4.5. Contagem diferencial dos leucócitos**

As lâminas para contagem diferencial foram preparadas por citocentrifugação de uma alíquota de 80 µL do lavado articular (citospin; Shandon Lipshaw Inc., Pittsburgh, Pennsylvania, USA). As lâminas foram coradas segundo a técnica de coloração de May-Grumwald e Giemsa e examinadas sob microscópio óptico, objetiva de imersão em óleo (aumento de 1.000x), usando os critérios morfológicos padrões para diferenciar os tipos celulares. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos x 10<sup>4</sup>/ cavidade articular.

#### **4.6. Processamento do tecido periarticular**

Para avaliar o acúmulo de neutrófilos no tecido periarticular de camundongos, foi utilizado o método de quantificação da atividade da mieloperoxidase (MPO) como descrito previamente (RUSSO *et al.*, 2009). Resumidamente, o tecido periarticular removido foi pesado e processado com solução de extração de citocinas (conforme descrição na seção anterior). Após homogeneização e centrifugação, o sobrenadante foi coletado e estocado para quantificação de citocinas. O componente residual (sedimento) foi ressuspensionado em tampão 1 (NaCl 0,1 M, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,02 M, Na<sub>2</sub> EDTA 0,015 M – pH 4,7) na proporção de 1,9 mL para cada 100 mg de tecido e submetido à homogeneização e centrifugação (10.000 g, 10 minutos). O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspensionado em NaCl 0.2% gelado seguido por NaCl 1.6% com glicose 5% gelada (1,5 mL para cada 100 mg de tecido). Realizou-se nova centrifugação 10.000 g por 10 minutos. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em tampão 2 (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 M, HETAB 0,5% p/v – pH

5,4) e homogenizado por 30 segundos. Todo o volume contido em cada amostra foi congelado e descongelado três vezes seguidas em nitrogênio líquido. Posteriormente, as amostras foram submetidas à nova centrifugação (10.000 g, 15 minutos) e o sobrenadante coletado para ensaio de MPO.

#### **4.7. Ensaio bioquímico da MPO**

As amostras do tecido periarticular foram diluídas (1:3). Em seguida, as amostras foram adicionadas à placa de 96 poços (25 µl/poço). Tetramethylbenzine (TMB - 1.6 mM em dimetilsulfóxido) foi adicionado à cada poço 25 µl/poço e a placa foi incubada a 37°C por 5 minutos. Foi adicionado 100 µl/poço de água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -0,002%) e novamente a placa foi incubada a 37°C durante 5 minutos. A reação é interrompida pela adição de 100 µl ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - 1M). A atividade da MPO das amostras foi detectada por colorimetria em um leitor de ELISA (450 nm). Os resultados foram expressos como número total de neutrófilos (Unidades Relativas) por comparação da O.D. do sobrenadante do tecido com neutrófilos de peritônio de camundongos processados da mesma maneira.

#### **4.8. Histologia**

O tecido articular foi coletado e acondicionado em cassetes para histologia que permaneceram por 48 horas em solução de formol tamponado 10%. Em seguida os cassetes foram transferidos para solução de EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) 14% para descalcificação óssea por 30 dias. Neste período foi feita a troca da solução de EDTA a cada 48 horas. O processamento foi realizado no Laboratório de Patologia Experimental da Faculdade de

Odontologia da UFMG onde o tecido foi submetido a passagens subsequentes em etanol em diferentes concentrações (80%, 90%, absoluto 1 e 2 – 30 minutos cada), xilol (1 e 2 – 20 a 30 minutos cada) e incluído em parafina. Foram realizados cortes em micrótomo e confecção de duas lâminas por corte. Um corte foi corado com Hematoxilina de Harris (20 segundos) e Eosina (8 segundos). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico e foram observados os seguintes parâmetros: gravidade da hiperplasia sinovial (0-3), intensidade e extensão do infiltrado (0-4) e reabsorção óssea (0-2).

#### **4.9. Ensaio de Imunoadsorção Ligado a Enzima (ELISA) para dosagem de citocinas**

O ensaio de ELISA foi realizado conforme instruções do fabricante R&D System, Minneapolis, MN. O anticorpo de captura foi adicionado a placa de 96 poços (NUNC) e incubado por 16h a 4°C. Posteriormente, a placa foi lavada (3 vezes em tampão de lavagem - PBS contendo 0,05% de Tween-20) e bloqueada por 2h com PBS contendo 1% de BSA à temperatura ambiente. Após a incubação, a placa foi lavada e as amostras (diluídas 3x em PBS 1x contendo 0,1% BSA) e a curva padrão foram adicionadas à placa e incubadas por 16h a 4°C. No dia seguinte, a placa foi lavada e incubada na presença de anticorpos de detecção. Após 2h, a placa foi lavada e a esta foi adicionada uma solução contendo estreptavidina ligada à enzima peroxidase. Após 20min, a placa foi novamente lavada e incubada com tampão contendo ortofenildiamina (OPD) por 10-20 minutos. A reação de foi interrompida adicionando-se solução 1M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A densidade óptica foi quantificada em comprimento de onda de 490nm com o espectrofotômetro SpectraMax Plus Microplate Reader (Molecular

Devices), e os resultados expressos em pg/mL com base na concentração da curva padrão.

#### **4.10. Ensaio de Imunoadsorção Ligado a Enzima (ELISA) para dosagem de IgG anti-mBSA**

O soro de animais, selvagens e CD300a<sup>-/-</sup>, não imunizados, imunizados e não desafiados e imunizados e desafiados foi utilizado para o ensaio de ELISA. 50 µL de mBSA a 2 µg/mL foi adicionado à placa de 96 poços (NUNC) e incubado por 16h a 4°C. Posteriormente, a placa foi lavada (3 vezes em tampão de lavagem - PBS contendo 0,05% de Tween-20) e bloqueada por 2h com PBS contendo 1% de leite em pó à temperatura ambiente. Após a incubação, a placa foi lavada e as amostras (diluídas 100 vezes em PBS contendo 0,1% de leite em pó) foram adicionadas à placa e incubadas por 16h a 4°C. No dia seguinte, a placa foi lavada e incubada na presença de anticorpos anti-IgG total. Após 2h, a placa foi lavada e a esta foi adicionada uma solução contendo estreptavidina ligada à enzima peroxidase. Após 20min, a placa foi novamente lavada e incubada com tampão contendo ortofenildiamina (OPD) por 10-20 minutos. A reação foi interrompida adicionando-se solução 1M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A densidade óptica foi quantificada em comprimento de onda de 490nm com o espectrofotômetro SpectraMax Plus Microplate Reader (Molecular Devices), e os resultados expressos em absorvância.

#### **4.11. Avaliação de hipernocicepção - teste de pressão crescente na pata de camundongo**

Os experimentos foram realizados utilizando o teste de pressão com um analgesímetro eletrônico (Insight Equipamentos, São Paulo, Brazil), que consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força (g). O aparelho é calibrado para registrar uma força máxima de 150 g, mantendo a precisão de 0,1 g até a força de 80 g. O contato do transdutor de pressão à pata é realizado através de uma ponteira descartável de polipropileno com 0,5 ou 4,15 mm<sup>2</sup> de diâmetro que é adaptada a ele. Os animais são alocados em caixas de acrílico, medindo 12 x 10 x 17 cm, cujo assoalho é uma rede de malha igual a 5 mm<sup>2</sup> constituída de arame não maleável de 1 mm de espessura, durante 15 minutos antes do experimento para adaptação ao ambiente. Espelhos são posicionados 25 cm abaixo das caixas de experimentação para facilitar a visualização da região plantar das patas dos animais. O experimentador deve aplicar, por entre as malhas da rede, uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do camundongo até que o animal produza uma resposta caracterizada como sacudida (“flinch”) da pata estimulada. Os estímulos são repetidos por até seis vezes, em geral até o animal apresentar 3 medidas similares com uma clara resposta de “flinch” após a retirada da pata.

A intensidade de hipernocicepção foi quantificada a pressão (em gramas) obtida até o momento do do “flinch”.

#### **4.12. Isolamento e cultura de esplenócitos**

Camundongos selvagens e CD300a<sup>-/-</sup> foram imunizados e desafiados 14 dias depois. 24 horas após o desafio os baços dos animais foram coletados e macerados em meio RPMI incompleto, centrifugados a 1200 g, 10 minutos a 4°C. As hemácias foram lisadas acrescentando 900 µL de água de injeção seguido de acréscimo de 100 µL de PBS 10x. As amostras foram novamente submetidas aos mesmos parâmetros de centrifugação. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de RPMI suplementado com 10 % de SFB. As células foram contadas em microscópio óptico e plaqueadas na quantidade de quantidade de 10<sup>6</sup> células por poço e incubados a 37°C com RPMI e concanavalina A (2 µg/mL). Após 48 horas de incubação, o volume de cada poço foi coletado e centrifugado a 1200 g, 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi, então, coletado e utilizado para dosagem das citocinas IFN-γ, IL-17 e IL-10.

#### **4.13. Extração de neutrófilos derivados da medula óssea**

Camundongos selvagens e CD300a<sup>-/-</sup> foram anestesiados e eutanasiados. Em capela de fluxo laminar, os ossos do fêmur e da tíbia foram removidos de forma a se manterem intactos e limpos, e todo o tecido em volta foi removido com ajuda de tesoura e gazes estéreis. Durante o procedimento os ossos foram colocados em placas de Petri contendo PBS estéril e mantidas no gelo.

Em seguida, as epífises foram cortadas com cuidado e os ossos de cada animal lavados com 5 mL de PBS estéril com ajuda de uma seringa acoplada a uma agulha de 22 G (EMBRAMAC, Campinas, SP, Brasil). A solução de PBS contendo células da medula foi coletada em tubos de 50 mL, centrifugada a 1200 g, 10 minutos a 4°C e suspensas em 6 mL de meio RPMI incompleto. As células foram cuidadosamente adicionadas em tubos de 15 mL contendo

gradiente duplo de separação formado pela adição sequencial de 3 mL de Histopaque 1077 e 3 mL de Histopaque 1119 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Os tubos foram centrifugados à 1200 g por 30 minutos e em temperatura ambiente. A camada inferior de células polimorfonucleares foi coletada com o auxílio de pipeta Pasteur e as células lavadas em meio RPMI-1640. Em seguida, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI e a viabilidade celular foi avaliada pela técnica de exclusão com azul de Tripán (Merck, USA). A contagem total foi realizada adicionando 10  $\mu$ L das células em 90  $\mu$ L de solução de Turk e as células foram contadas em câmara de Neubauer. Para avaliar a pureza das células isoladas, foi realizada a contagem diferencial de lâminas preparadas a partir de 20  $\mu$ L da solução de células diluídas em 80  $\mu$ L de BSA 3% e citocentrifugadas (Citospin, Shandon Lpishaw Inc, Pittsburg, Pennsylvania, USA) a 250 rpm por 5 minutos. A lâmina foi corada em kit panótico rápido (Laborclin, Paraná) e observada em microscópio óptico (objetiva de 100X em óleo de imersão). Apenas as amostras com viabilidade de 95% e pureza acima de 90% foram consideradas para os ensaios.

#### **4.14. Ensaio de quimiotaxia**

A quimiotaxia foi realizada em câmara de 48 poços (Câmara de Boyden, Neuro Probe, Cabin John, USA), utilizando uma membrana de policarbonato (Neuro Probe, Cabin John, USA) com poros de 5  $\mu$ m de diâmetro conforme protocolo descrito por Pinho et al. 2007. Na parte inferior da câmara foram adicionados 28,5  $\mu$ L de meio de cultura RPMI 1640-BSA 0,01% contendo os estímulos quimiotáticos CXCL1 (30ng/mL), fMLP ( $10^{-7}$ M) e LTB4 ( $10^{-8}$ M). Como controle negativo, foi utilizado apenas o meio RPMI 1640-BSA 0,01%. Na parte

superior da câmara foi adicionado  $5 \times 10^4$  células em um volume total de 50  $\mu\text{L}$ . A câmara foi incubada por 60 minutos a  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ . Após incubação, a membrana de policarbonato foi removida cuidadosamente, lavada em PBS e fixada e corada em kit panótico rápido (Laborclin, Paraná).

O número de células migradas para a parte inferior da membrana foi contado em 5 campos aleatórios em microscópio óptico (objetiva de 100X em óleo de imersão). Os resultados foram expressos como a média do número de células por campo. As células que migraram em direção aos estímulos quimiotáticos foram consideradas como migração direcionada e as células que migraram em direção ao RPMI como migração randômica ou aleatória (controle).

#### **4.15. Citometria de fluxo**

Primeiro será descrito como as amostras foram obtidas e depois os passos em comum, que foram aplicados a todas, mesmo em experimentos diferentes.

Obtenção das amostras:

- Foi realizado lavado sinovial, conforme já descrito, de animais selvagens imunizados e desafiados com salina e com mBSA. As amostras controle consistem em *pool* de quatro lavados e as amostras de animais desafiados com mBSA, em *pool* de dois lavados.

- Foram coletados 100  $\mu\text{L}$  de sangue de animais selvagens em tubos contendo heparina. As hemácias foram lisadas acrescentando 900  $\mu\text{L}$  de água de injeção seguido de acréscimo de 100  $\mu\text{L}$  de PBS 10x.

- Neutrófilos foram isolados da medula óssea de animais selvagens e CD300a<sup>-/-</sup>, conforme já descrito, e 10<sup>6</sup> células foram incubadas com RPMI ou com CXCL1 (20 ng/mL) por 45 minutos a 37 °C.

Passos comuns:

As amostras foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos a 4 °C. O *pellet* foi ressuspendido em 100 µL de PBS com 0,5% de BSA e 0,05% de azida sódica (wash B), e foram adicionados os anticorpos CD300a, Gr1, Ly6G e CXCR2 (eBiosciences, BD Pharmingen), a depender do experimento, nas concentrações adequadas e incubadas por 30 minutos a 4°C sobre abrigo da luz. Após a incubação, as amostras foram novamente centrifugadas e lavadas duas vezes com wash B. Depois de lavadas, as amostras foram fixadas em PBS/formol 4% v/v e a leitura foi realizada no citômetro FACS Canto II (BD Biosciences). Os dados foram analisados com o software BD FACSDiva e FlowJo para a obtenção das porcentagens representativas de cada população celular analisada.

#### **4.16. Isolamento de macrófagos peritoneais residentes**

Foi feita a coleta das células através da lavagem peritoneal utilizando 5 mL de PBS gelado. Logo após a obtenção as células foram contadas e plaqueadas a 10<sup>6</sup> células por poço em meio RPMI suplementado com 10 % de SFB a 37 °C em atmosfera contendo 5 % CO<sub>2</sub> por 2 horas. Após este período foi feita a lavagem das placas com PBS para remoção das células não aderidas e foi acrescentado novo volume de meio RPMI suplementado com 10 % de SFB, acrescido de 1 µg/mL de LPS ou salina. Os macrófagos foram incubados por 24 horas a 37 °C em atmosfera contendo 5 % CO<sub>2</sub>. Após o tempo de incubação, o

sobrenadante foi recolhido e diluído 3 vezes para ser utilizado no ensaio de ELISA.

#### **4.17. Análises Estatísticas**

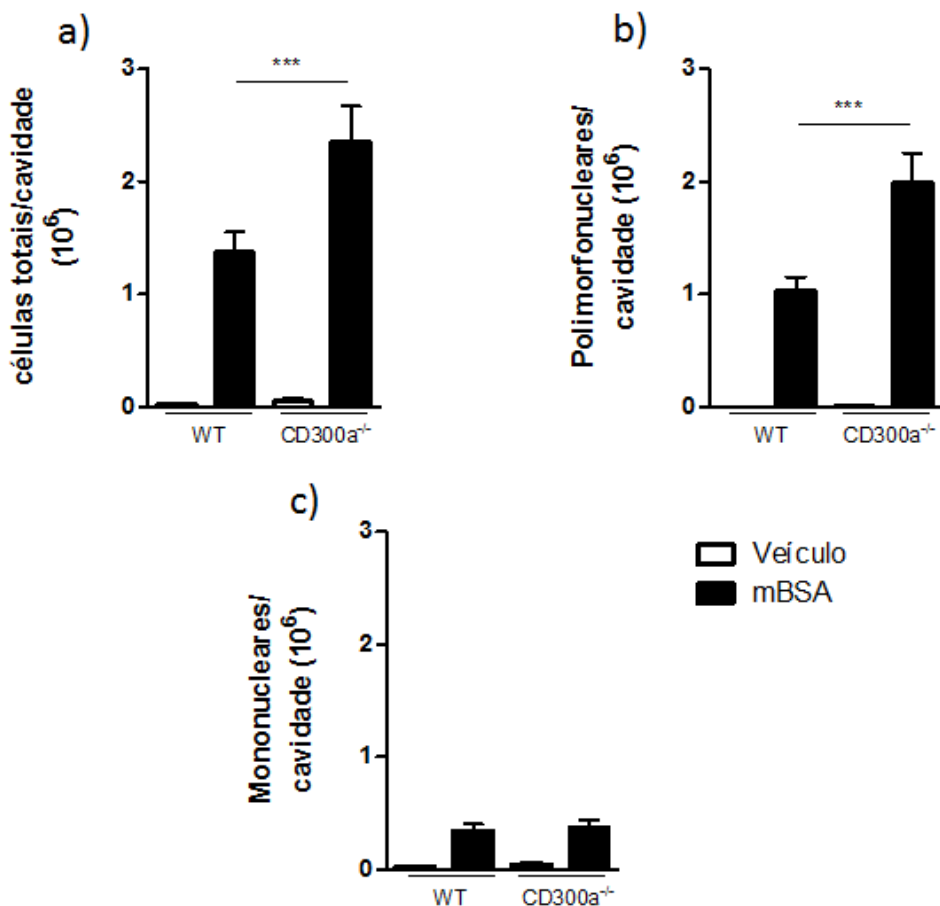
A análise estatística foi realizada com o software Prisma. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. A análise da diferença entre dois grupos foi realizada pelo teste t-student. A análise da diferença entre dois ou mais grupos quando as amostras obedeciam a distribuição normal foi realizado ANOVA seguida do pós-teste Student-Newman-Keuls. A significância estatística foi estabelecida em  $p < 0,05$ .

## 5. Resultados

### 5.1. O tecido periarticular e o lavado sinovial de animais CD300a<sup>-/-</sup> apresentam parâmetros inflamatórios aumentados, quando comparados aos animais selvagens

O modelo de AIA agudo é caracterizado por infiltrado neutrofílico na cavidade articular e produção de quimiocinas, que tem, principalmente, os neutrófilos como alvo. Geralmente a quantidade de células mononucleares, principalmente macrófagos, é baixa nos animais desafiados (Edwards & Hallett 1997; Pinto et al. 2010). Segundo Coelho e colaboradores, no modelo agudo de artrite induzida por antígeno, 24 horas após o desafio ocorre o recrutamento de maior quantidade de neutrófilos tanto para a cavidade sinovial quanto para o tecido periarticular (Coelho et al. 2008). Baseado nesses dados, o tempo de 24 horas depois do desafio foi estipulado para análise dos parâmetros inflamatórios.

A esse tempo, observou-se que animais CD300a<sup>-/-</sup> apresentam maior infiltrado de células polimorfonucleares, neutrófilos em sua extensa maioria, na cavidade sinovial. A quantidade de células mononucleares é pouca e equivalente entre ambos os grupos de animais, selvagens e nocautes (Figura 4).

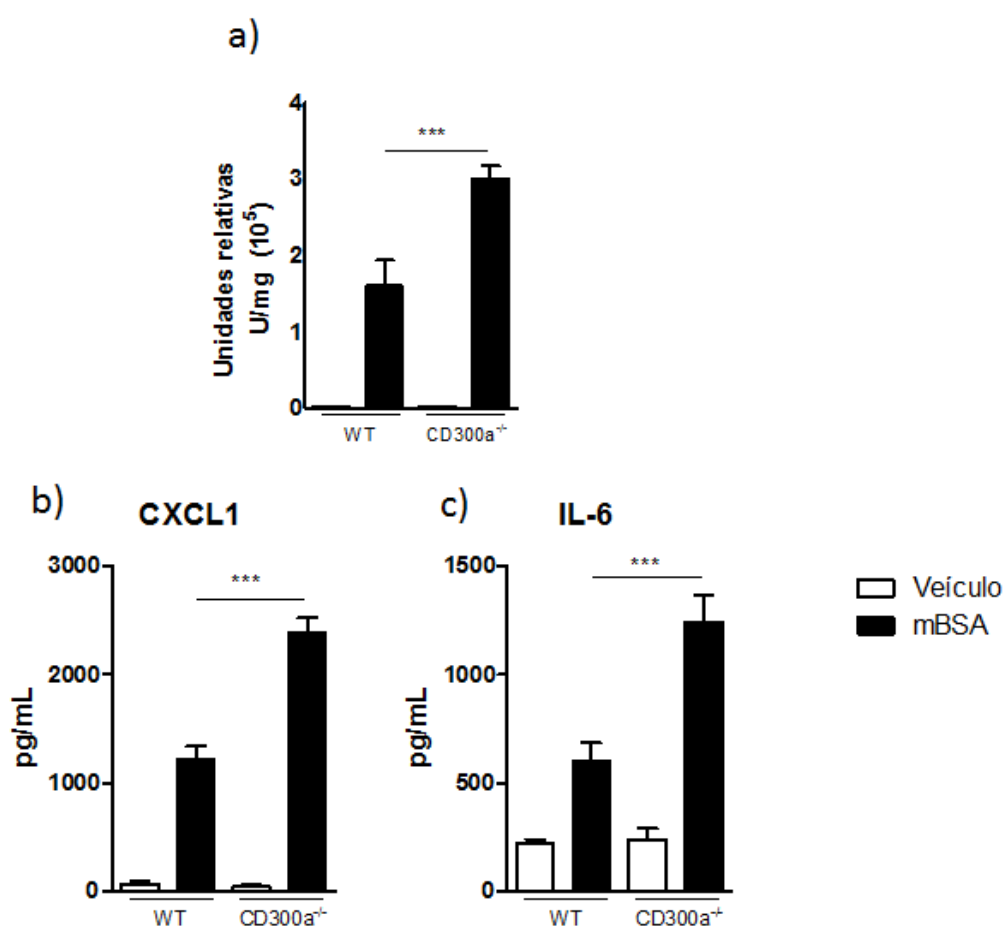


**Figura 4 - Animais CD300a<sup>-/-</sup> recrutam maior quantidade de células para a cavidade sinovial, quando comparados aos animais WT.** Camundongos selvagens e nocautes foram imunizados e, 14 dias depois, desafiados com mBSA ou com salina. 24 horas após o desafio foi realizado o lavado sinovial e, ao microscópio, foi feita a contagem total (a), contagem diferencial de células polimorfonucleares (b) e contagem diferencial de células mononucleares (c) no lavado sinovial. \*\*\*p<0,001 com relação ao grupo controle. Para cada experimento, n = 5-6 por grupo.

A atividade da enzima mieloperoxidase, presente em células mielóides, serve como medida indireta da população de polimorfonucleares (Huang et al. 2016). Na análise do tecido periarticular, através da medida da atividade de MPO, pode-se evidenciar, de forma semelhante à cavidade sinovial, maior infiltrado neutrofílico nos animais CD300a<sup>-/-</sup> quando comparados ao animais selvagens (Figura 5a). Quantificadas também no tecido periarticular, a

quimiocina CXCL1 e a citocina IL-6 apresentaram níveis superiores nos animais CD300a<sup>-/-</sup> quando comparados ao animais selvagens (Figura 5b, c).

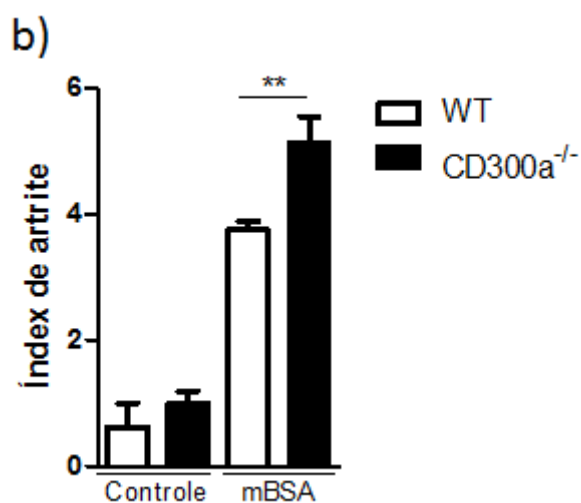
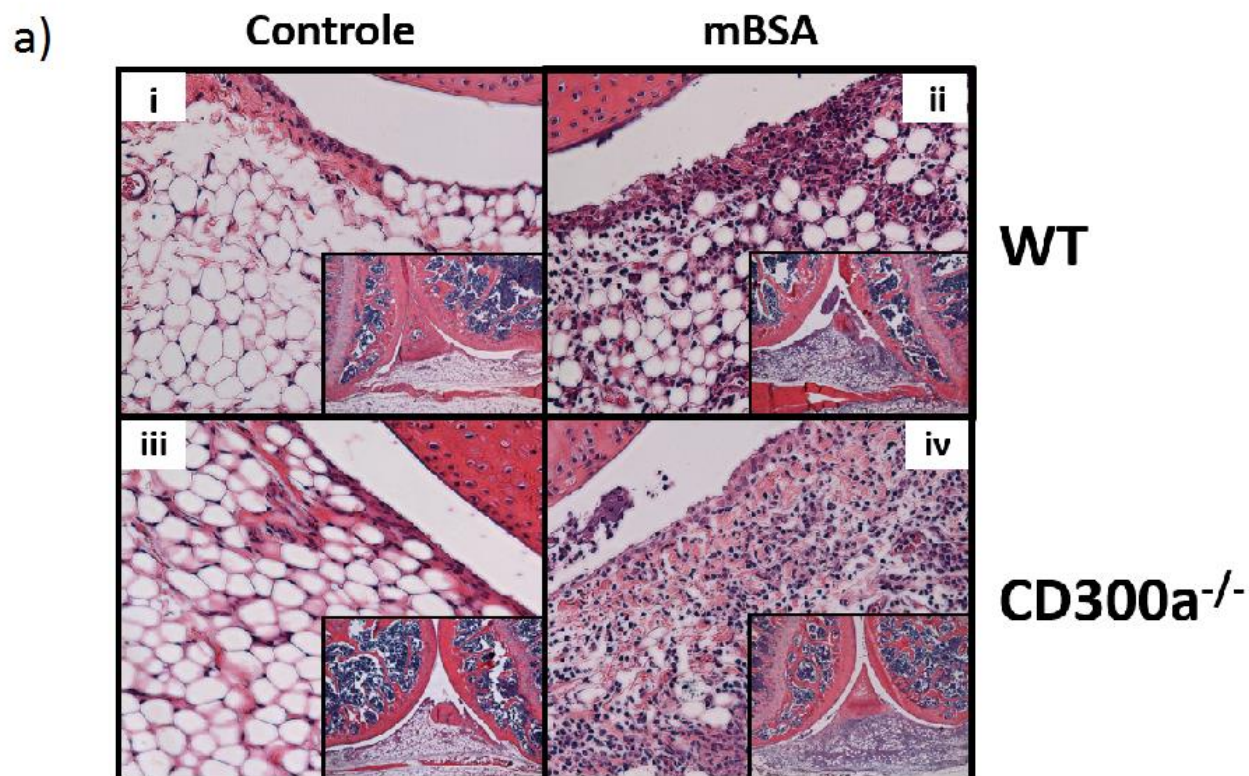
A presença de maior quantidade de células polimorfonucleares, tanto no lavado sinovial quanto no tecido periarticular, pode ser reflexo da maior produção da quimiocina CXCL1, uma das principais recrutadoras de neutrófilo (Kobayashi 2008).



**Figura 5 - Animais CD300a<sup>-/-</sup> apresentam aumento nos parâmetros inflamatórios mensurados no tecido periarticular quando comparados aos animais WT.** Camundongos selvagens e nocautes foram imunizados e, 14 dias depois, desafiados com mBSA ou com salina. 24 horas após o desafio o tecido periarticular foi coletado para medida da atividade de MPO (a), avaliação da quimiocina CXCL1 (b) e da citocina IL-6 (c). \*\*\*p<0,001 com relação ao grupo controle. Para cada experimento, n = 5-6 por grupo.

Também na análise histológica é possível confirmar o fenótipo observado. No tempo de 24 horas após o desafio, as articulações tíbio-femorais de animais selvagens e nocautes foram removidas para que o procedimento histológico pudesse ser executado. Os cortes, corados com hematoxilina e eosina, foram fotografados no aumento de 40 e 200 vezes (Figura 6a).

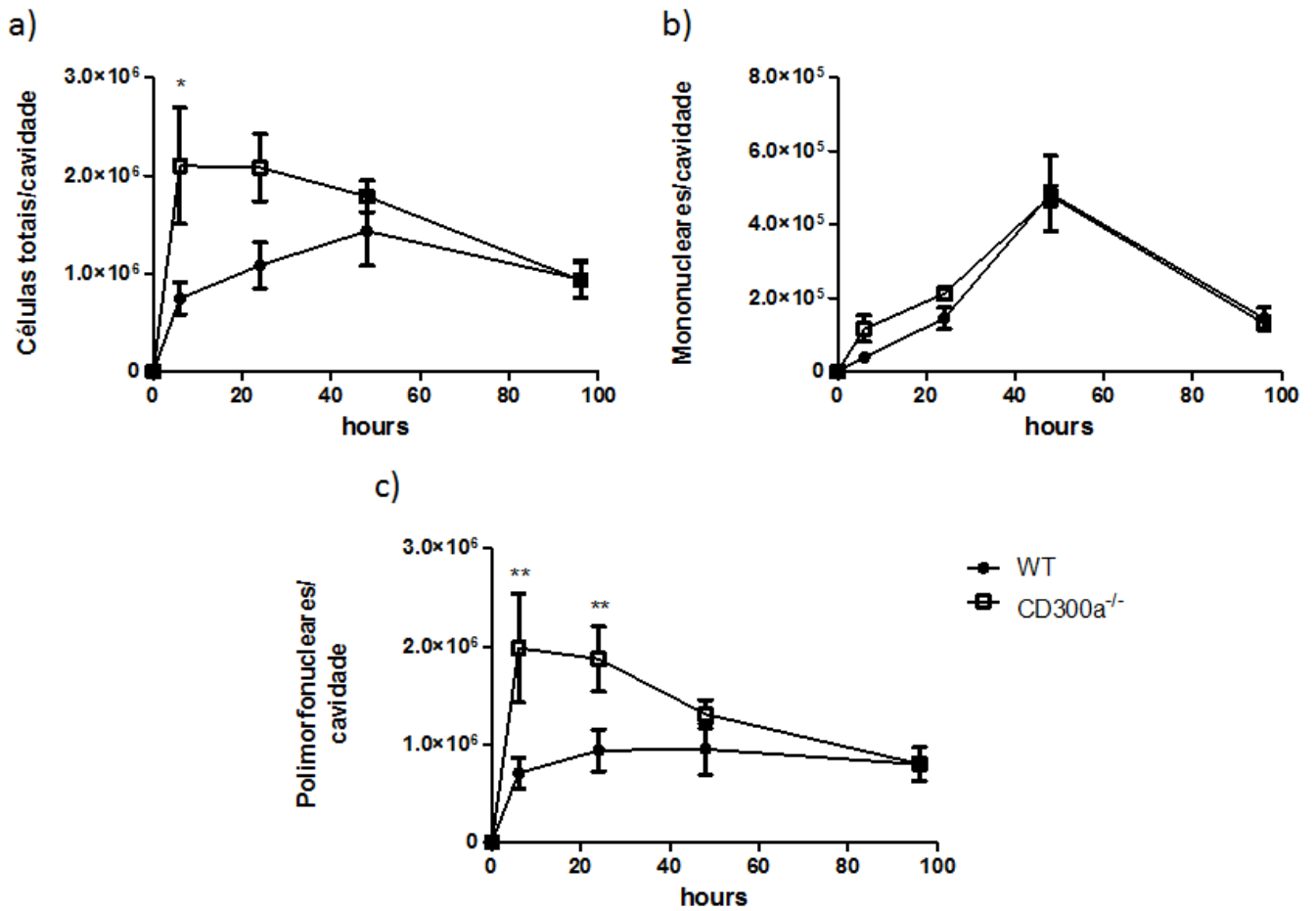
Observou-se infiltrado inflamatório no tecido sinovial com predomínio de células polimorfonucleares (neutrófilos) e hiperplasia da membrana sinovial que variou de leve a intensa de acordo com os diferentes grupos. Em algumas poucas amostras, oriundas de animais nocautes, observaram-se pontos de reabsorção óssea, bem como vasos hiperemiados e células no espaço sinovial. De forma geral, os parâmetros analisados foram mais intensos nos animais que não possuem o gene do receptor CD300a quando comparados aos animais selvagens. Estes parâmetros foram analisados e foi dado um *score* aos diferentes graus observados, sendo estes representados na figura 6b.



**Figura 6- Animais CD300a<sup>-/-</sup> apresentam maior infiltrado inflamatório no tecido sinovial quando comparados aos animais WT.** Secções representativas das articulações de joelhos de camundongos WT (i e iii) e CD300a<sup>-/-</sup> (ii e iv) coradas com eosina e hematoxilina (a). Nos retângulos maiores, aumento de 200X e nos retângulos menores, aumento de 40X. Em (i) e (iii) os animais foram desafiados com salina e em (ii) e (iv), com mBSA. Em (b), gráfico representativo do score artrítico levando em consideração os seguintes parâmetros: infiltrado neutrofílico, hiperplasia, hiperemia e reabsorção óssea. \*\*p<0,01 com relação ao grupo controle. n=4 por grupo.

## **5.2. O receptor CD300a não está relacionado ao processo de resolução no modelo de artrite induzida por antígeno**

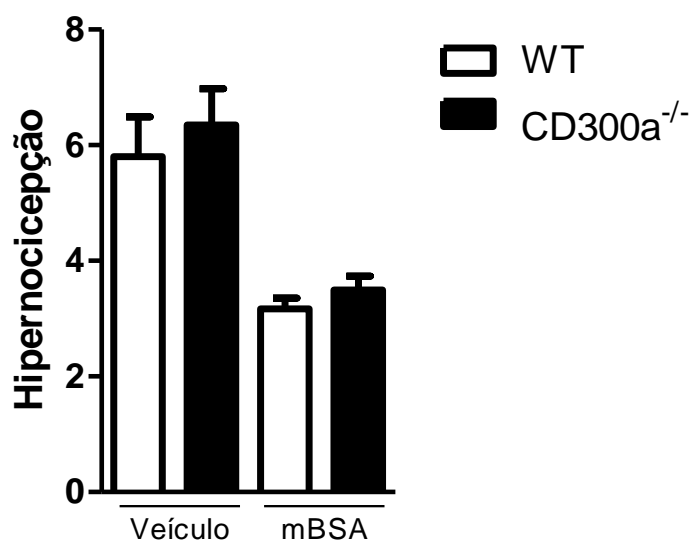
A fim de se comparar, avaliar a dinâmica do processo inflamatório e verificar se o receptor CD300a influencia na resolução da artrite induzida por mBSA foi realizada uma cinética. Camundongos selvagens e CD300a<sup>-/-</sup> foram imunizados e desafiados 14 dias depois. Nos tempos de 6, 24, 48 e 96 horas após o desafio, foi realizado o lavado sinovial para contagem das células ao microscópio. Os animais selvagens apresentaram aumento de células totais e de polimorfonucleares na cavidade sinovial já com 6 horas após o desafio, mantendo-se o número elevado até 24 horas. Comparado com o grupo de animais selvagens, no grupo CD300a<sup>-/-</sup> foi observado um abrupto aumento de células na cavidade sinovial no tempo de 6 horas, quantidade esta que se manteve praticamente inalterada no tempo de 24 horas. Na contagem diferencial, a curva de células totais se assemelha à curva de polimorfonucleares, clarificando que esse tipo celular é predominante dentro da população total (Figura 7). Apesar do início da cinética ser diferente entre os grupos, tendo o grupo deficiente em CD300a maior quantidade de células, no último tempo (96 horas) ambos os grupos se encontraram com a mesma quantidade de células, dado que sugere que o envolvimento do receptor CD300a no modelo de AIA se dá na fase inicial da inflamação.



**Figura 7 - O receptor CD300a está envolvido no início da resposta inflamatória no modelo de artrite induzida por antígeno.** Camundongos selvagens e nocautes foram imunizados e, 14 dias depois, desafiados com mBSA ou com salina. Nos tempos de 6, 24, 48 e 96 horas após o desafio foi realizado o lavado sinovial e, ao microscópio, foi feita a contagem total (a), contagem diferencial de células polimorfonucleares (b) e contagem diferencial de células mononucleares (c) no lavado sinovial. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  com relação ao grupo controle. Para cada experimento,  $n = 5-6$  por grupo.

### 5.3. A ausência do receptor CD300a não altera os níveis de hipernocicepção mecânica nos animais com AIA

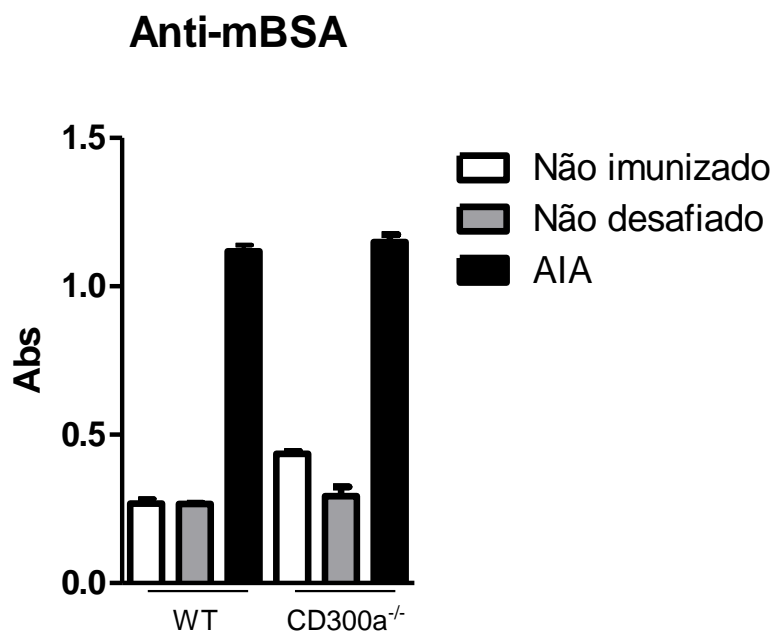
Para se verificar se os animais nocautes apresentam diferença na capacidade hipernociceptiva, animais selvagens e nocautes para CD300a foram imunizados, desafiados 14 dias depois e 24 horas após o desafio, os animais foram submetidos ao teste de pressão crescente na pata (Von Frey). Os valores adquiridos por meio do analgesímetro equivalem à pressão depositada, pelas patas dos animais, sobre o eletrodo, de forma que quanto maior o valor, maior a pressão e menor o incômodo dos animais com o a pressão aplicada. Apesar de, 24 horas após o desafio, a quantidade de células polimorfonucleares e neutrófilos no tecido periarticular dos animais nocaute serem maiores quando com parados aos animais selvagens, não foi encontrada diferença nos níveis de hipernocicepção entre os grupos (Figura 8).



**Figura 8 – Não há diferença entre a capacidade hipernociceptiva de animais WT e CD300a<sup>-/-</sup>.** Camundongos selvagens e nocautes foram imunizados e, 14 dias depois, desafiados com mBSA ou com salina. 24 horas após o desafio realizou-se o teste de Von Frey nos animais. Para cada experimento, n=5-6 por grupo.

#### 5.4. O processo de imunização não é responsável pela diferença de fenótipo observado

O sangue de animais selvagens e deficientes para CD300a com AIA e controles foi coletado com o objetivo de avaliar a quantidade de IgG total anti-mBSA por ELISA no soro, medida indireta da resposta dos linfócitos B. O soro coletado após centrifugação do sangue foi diluído 100 vezes para a realização do experimento. A imunização aumenta a produção de IgG total anti-mBSA nos animais, porém a ausência do CD300a não altera este parâmetro (Figura 9). O resultado confirma que o fenótipo observado não se deve a diferentes respostas humorais entre animais selvagens e nocautes.

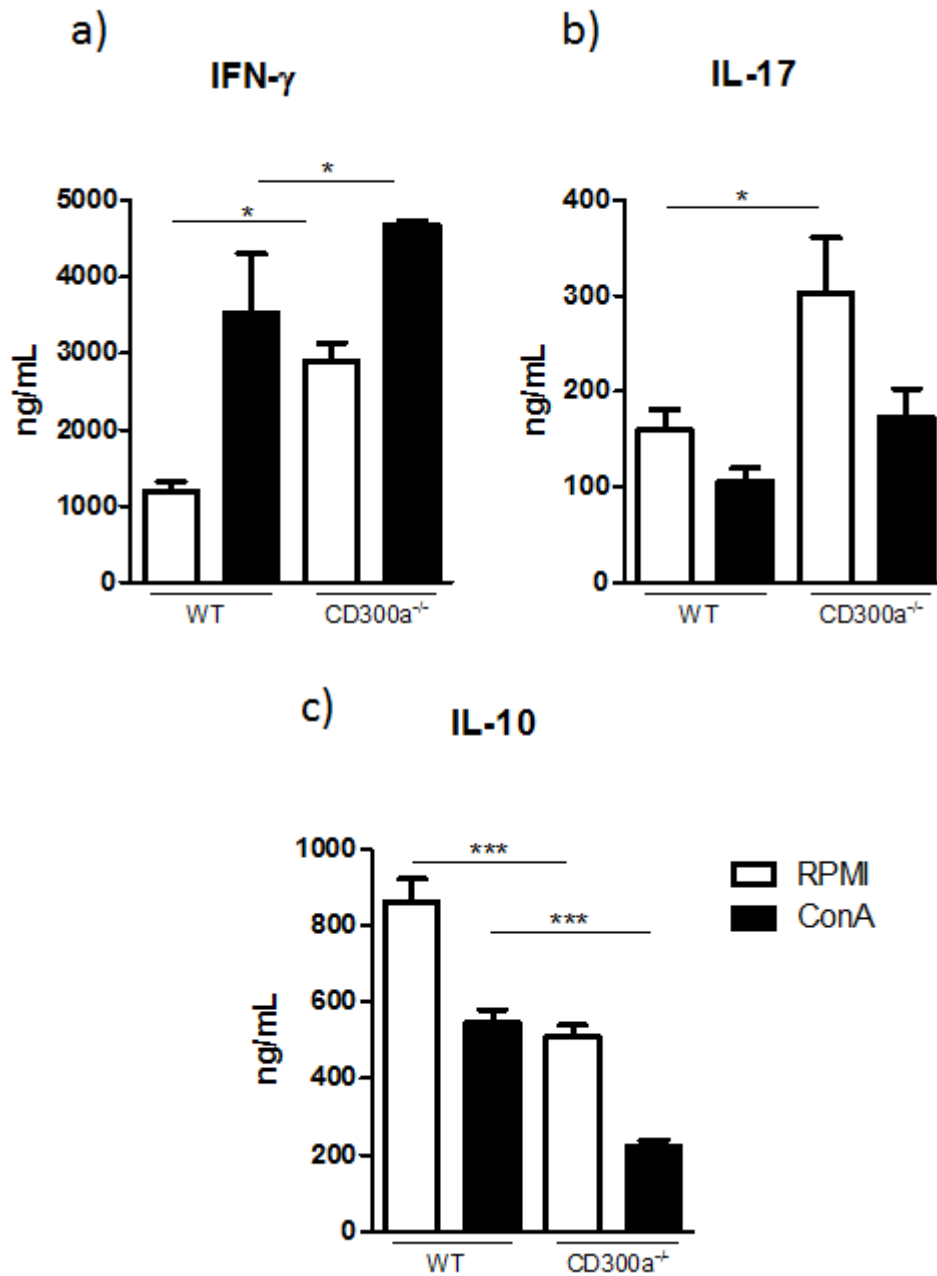


**Figura 9 – O processo de imunização não interfere no fenótipo observado nos animais CD300a<sup>-/-</sup>.** Camundongos selvagens e nocautes foram imunizados e, 14 dias depois, desafiados com mBSA ou com salina. 24 horas após o desafio, o sangue dos animais foi coletado e o soro, diluído 100 vezes, foi utilizado em ensaio de ELISA para detecção de IgG total anti-mBSA. Para cada experimento, n=5-6 por grupo.

### **5.5. Os esplenócitos de animais CD300a<sup>-/-</sup> apresentam perfil mais inflamatório que esplenócitos de animais selvagens**

Com o intuito de se conhecer o comportamento dos esplenócitos de animais nocautes quando submetidos ao modelo de AIA, animais selvagens e nocautes para CD300a foram imunizados e desafiados 14 dias depois. 24 horas após o desafio, os baços dos animais foram coletados e os esplenócitos separados, plaqueados na quantidade de 10<sup>6</sup> células por poço e incubados a 37°C por 48 horas com RPMI e concanavalina A (2 µg/mL). Foram dosadas as citocinas IFN-γ, IL-17 e IL-10.

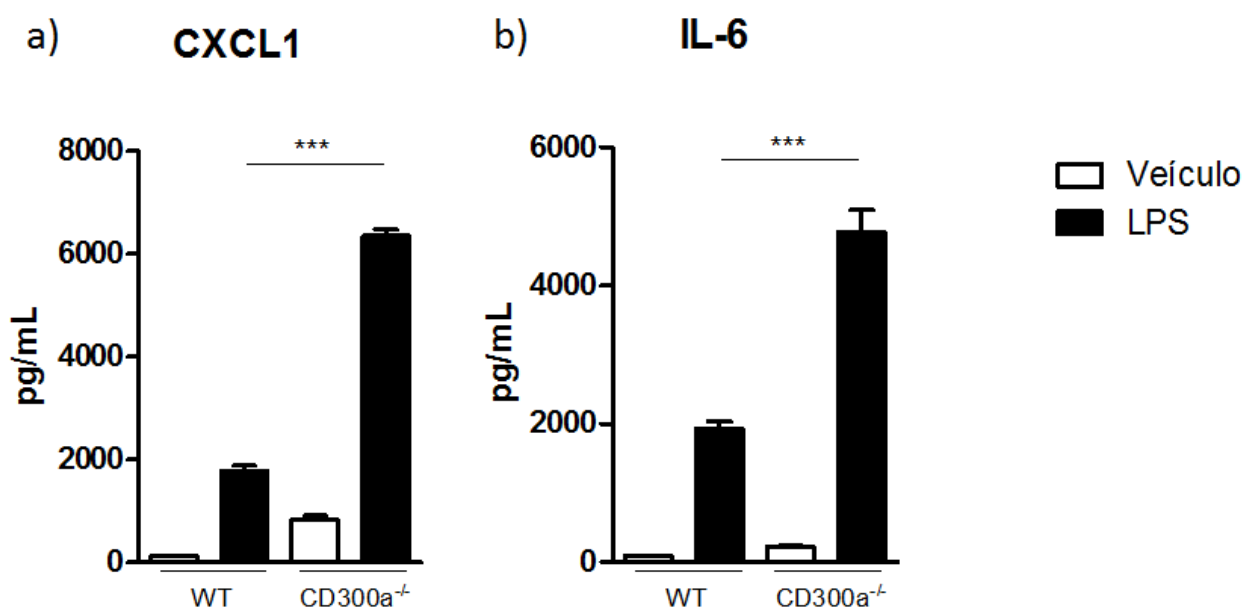
Embora os grupos controles, estimulados com RPMI, tenham apresentado altos níveis de expressão de todas as citocinas dosadas, os esplenócitos dos animais nocautes apresentaram um perfil mais inflamatório quando comparados aos esplenócitos de animais selvagens. A produção das citocinas IFN-γ e IL-17 pelas células nocautes foi maior do que a produção das mesmas pelas células selvagens, ao passo que a citocina anti-inflamatória IL-10 foi produzida em maior quantidade pelas células selvagens (Figura 10).



**Figura 10 – Esplenócitos de animais CD300a<sup>-/-</sup> apresentam perfil mais inflamatório quando comparados aos animais WT.** Camundongos WT e CD300a<sup>-/-</sup> foram imunizados e, 14 dias depois, desafiados com mBSA ou salina. 24 horas após o desafio, o baço dos animais foi removido e 10<sup>6</sup> esplenócitos foram plaqueados e estimulados com RPMI e concanavalina A (2  $\mu$ g/mL). Após 48 horas o sobrenadante foi coletado para dosagem de IFN- $\gamma$  (a), IL-17 (b) e IL-10 (c) por ELISA. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  com relação ao grupo controle. Para cada experimento,  $n = 5$  por grupo.

## 5.6. Macrófagos deficientes para o receptor CD300a expressam maiores níveis de mediadores inflamatórios quando comparados a macrófagos selvagens

Com o intuito de avaliar se os macrófagos também têm participação no fenótipo observado, macrófagos peritoneais residentes de animais selvagens e nocautes foram coletados e incubados a 37°C com 1 µg/mL de LPS por 24 horas. Após esse tempo, o sobrenadante da cultura foi recolhido e utilizado para dosagem da quimiocina CXCL1 (Figura 11a) e da citocina IL-6 (Figura 11b) por ELISA. Os macrófagos que não possuem o gene para o receptor CD300a produziram quantidades superiores de ambos mediadores inflamatórios, sugerindo a participação dos mesmos na inflamação exacerbada dos animais nocautes em relação aos animais selvagens.



**Figura 11 – Macrófagos CD300a<sup>-/-</sup> estimulados com LPS produzem maiores níveis de citocinas inflamatórias quando comparados a macrófagos selvagens.** Macrófagos peritoneais residentes de camundongos WT e CD300a<sup>-/-</sup> foram coletados e incubados a 37°C com 1 µg/mL de LPS por 24 horas. O sobrenadante foi utilizado para dosagem da quimiocina CXCL1 (a) e IL-6 (b).

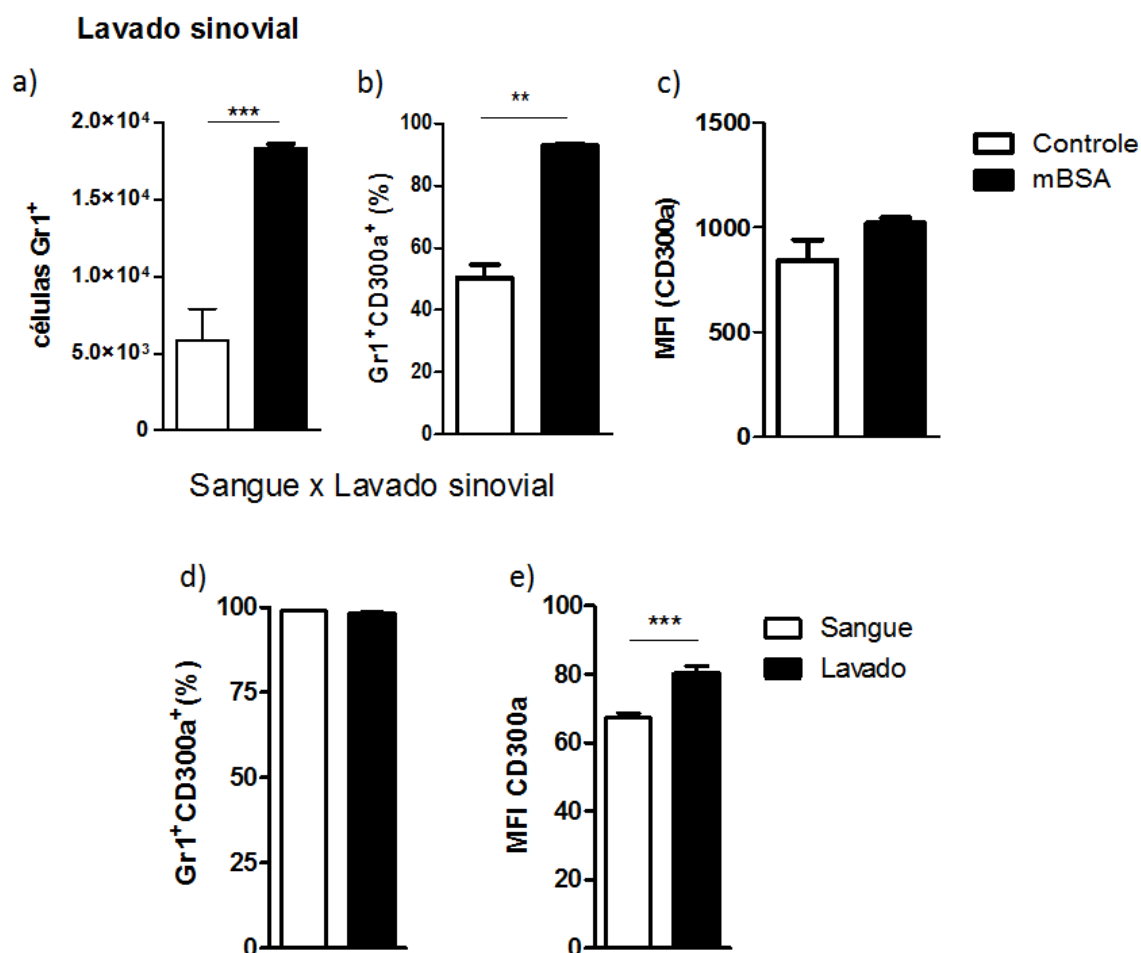
### **5.7. A expressão do CD300a em neutrófilos na cavidade sinovial de animais com AIA é aumentada e sugere importância do receptor**

Como observado na figura 7, o receptor CD300a está envolvido no início da resposta inflamatória no modelo de AIA. Nessa fase, os neutrófilos exercem grande importância na instauração do processo inflamatório e lesão tecidual (Coelho et al. 2008; Cunha et al. 2009; Weissmann & Korchak 1984). Para avaliar a expressão do CD300a nos neutrófilos no modelo de AIA, animais selvagens foram imunizados e desafiados, 14 dias depois, com mBSA. 24 horas após o desafio, foi realizado o lavado sinovial de animais controles e com AIA. O lavado foi utilizado para um experimento de citometria de fluxo onde foram usados anticorpos anti-CD300a e anti-Gr1. Foi feito um *gate* dentro da população de polimorfonucleares e nas células positivas para Gr1 foi analisada a expressão do CD300a. Para os animais controle, foi feito um *pool*, uma vez que estes apresentam quantidades mínimas de neutrófilos na cavidade sinovial. No lavado dos animais desafiados a quantidade de eventos positivos para Gr1 foi maior que nos animais controle, confirmando o dado observado na figura 4b. Dentro dessa população positiva, a porcentagem de neutrófilos que expressam o CD300a é maior entre os que se encontram no sítio de inflamação e também estes neutrófilos apresentam uma tendência de aumento na intensidade média de fluorescência (MFI) do CD300a (Figura 12a, b, c).

Em outro experimento de citometria de fluxo, utilizando animais selvagens com AIA, 24 horas após o desafio, foi coletado sangue e lavado sinovial para análise da expressão do CD300a em neutrófilos, também usando os anticorpos anti-Gr1 e anti-CD300a. Apesar de não haver diferença entre a porcentagem de neutrófilos que expressam o receptor no sangue e no lavado, os neutrófilos

presentes na cavidade sinovial inflamada apresentam maior intensidade média de fluorescência (Figura 12d, e).

Esses resultados sugerem uma importância do receptor CD300a, já que em situações inflamatórias ele é mais expresso nos neutrófilos.

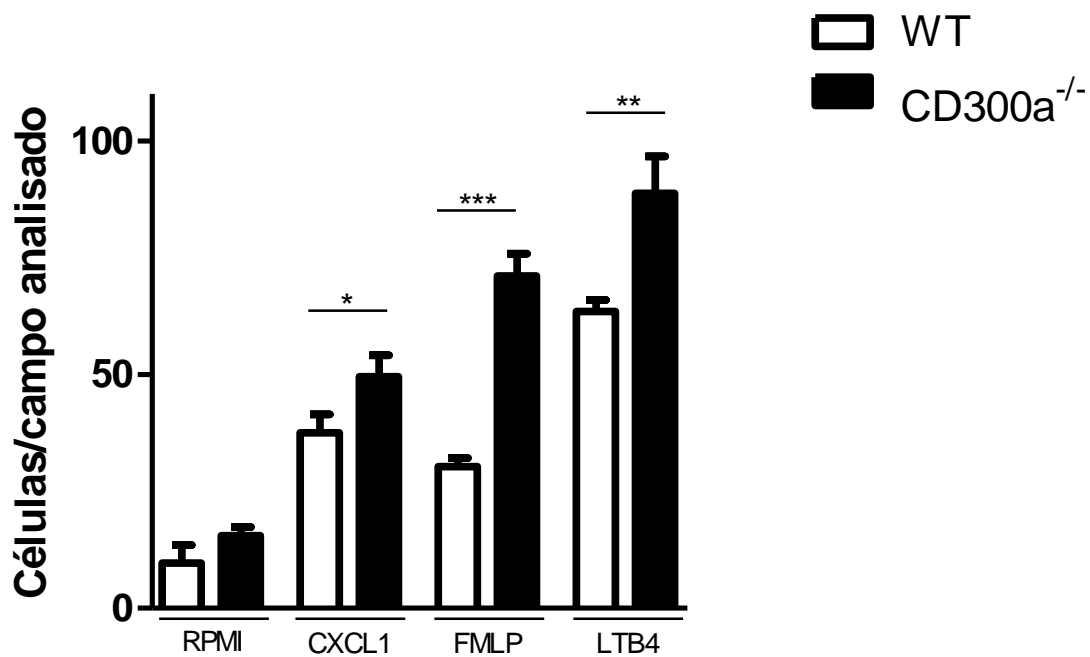


**Figura 12 – Neutrófilos presentes na cavidade sinovial inflamada apresentam maior expressão do receptor CD300a.** Camundongos selvagens foram imunizados e, 14 dias depois, desafiados com mBSA ou com salina. 24 horas após o desafio foi realizado o lavado sinovial, onde foi avaliada a expressão do CD300a em neutrófilos usando anticorpos anti-Gr1 e anti-CD300a. Foram avaliados e comparados os seguintes parâmetros: eventos Gr1 positivos (a), porcentagem de neutrófilos que expressam o CD300a (b) e intensidade média de fluorescência (c). Em outro experimento foi comparada a expressão do CD300a no sangue e no lavado sinovial (d), bem como a intensidade média de fluorescência (e). \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  com relação ao grupo controle. Para cada experimento,  $n = 5$  por grupo.

## **5.8. O receptor CD300a participa do controle da migração de neutrófilos sob diferentes estímulos**

Como a expressão do CD300a se mostrou importante em neutrófilos no processo inflamatório (Figura 12), foi avaliada a participação do imunorreceptor no processo de quimiotaxia. Para tal, foi realizado o ensaio de quimiotaxia em câmara de Boyden, onde neutrófilos foram avaliados quanto a habilidade de migrar através de uma membrana segundo um gradiente quimiotático. Para o experimento, neutrófilos foram isolados a partir da medula óssea de animais WT e CD300a<sup>-/-</sup> utilizando gradiente de Histopaque®. Foram testados três quimioatraentes: CXCL1 (30 ng/mL), fMLP (10<sup>-7</sup>M) e LTB4 (10<sup>-8</sup>M). Como controle de migração aleatória foi utilizado meio RPMI com 0,01% de BSA. Foram utilizadas 5x10<sup>4</sup> células e a membrana foi corada com panótico 1 hora após ser incubada.

Os neutrófilos CD300a<sup>-/-</sup> apresentaram uma maior taxa de migração em direção aos três quimioatraentes analisados quando comparados aos neutrófilos selvagens (Figura 13), dado que revela a participação do CD300a na regulação da transmigração de neutrófilos.



**Figura 13 – O receptor CD300a participa do controle da migração de neutrófilos in vitro.**

Neutrófilos isolados da medula óssea de animais WT e CD300a<sup>-/-</sup> foram submetidos ao ensaio de quimiotaxia na câmara de Boyden, conforme descrito na metodologia, sob os diferentes estímulos: CXCL1 (30 ng/mL), fMLP (10<sup>-7</sup>M) e LTB4 (10<sup>-8</sup>M). Após 1 hora de incubação a 37°C, a membrana foi corada em panótico e os neutrófilos migrados, contados ao microscópios. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 com relação ao grupo controle. Para cada experimento, n = 4 por grupo.

### **5.9. A dessensibilização do receptor CXCR2 dá indícios de participação, porém não explica a maior capacidade quimiotática dos neutrófilos CD300a<sup>-/-</sup>**

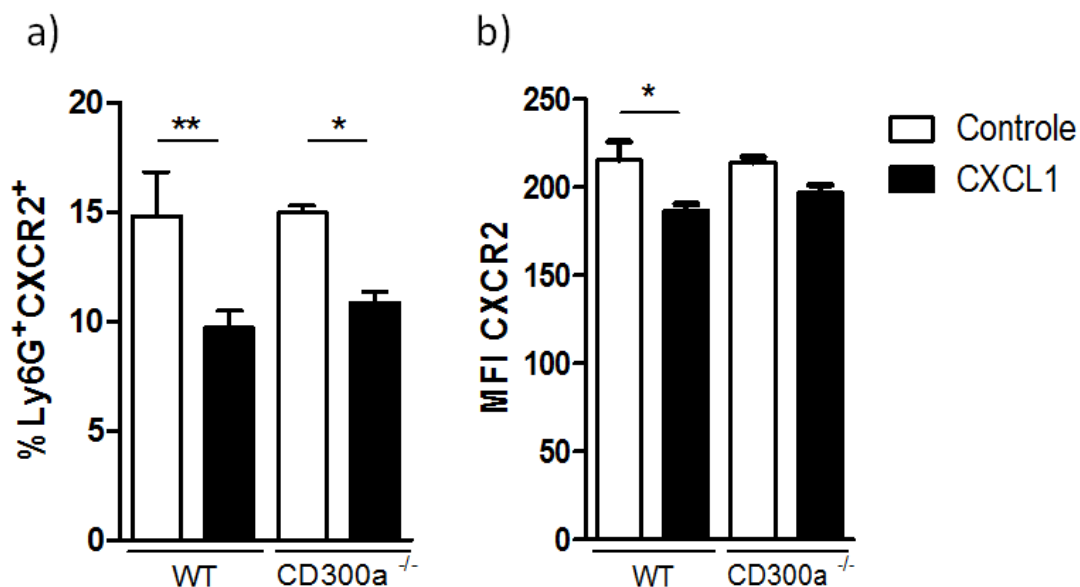
Como visto na figura 13, comparados aos neutrófilos selvagens, os neutrófilos que não expressam o gene do receptor CD300a apresentam aumento da capacidade quimiotática em direção ao gradiente de CXCL1, fMLP e LTB<sub>4</sub>. Os receptores para os três quimioatraentes testados são GPCRs (McLeish et al. 1989; Raghuwanshi et al. 2012). Após a interação dos GPCRs com seus ligantes e desencadeamento da resposta, estes sofrem dessensibilização, que consiste na internalização do receptor e posterior direcionamento à reciclagem ou à maquinaria de degradação, de forma a evitar superestimulação do ligante (Rajagopal & Shenoy 2017).

Com base nessa informação, foi verificado se a maior capacidade quimiotática dos neutrófilos CD300a<sup>-/-</sup> deve-se a alterações no mecanismo de dessensibilização do receptor CXCR2, o principal envolvido no recrutamento de neutrófilos no modelo de AIA (Grespan et al. 2008). Para tal, neutrófilos selvagens e CD300a<sup>-/-</sup> foram isolados da medula óssea, e 10<sup>6</sup> células foram incubadas com CXCL1 (20ng/mL) por 45 minutos e marcados com anticorpos anti-Ly6G e anti-CXCR2 para análise por citometria de fluxo.

A dessensibilização foi avaliada comparando-se o percentual de neutrófilos que expressam o receptor CXCR2 com e sem o estímulo com seu ligante, CXCL1. O mesmo parâmetro foi utilizado pra avaliar a dessensibilização por meio da intensidade média de fluorescência do CXCR2.

Na primeira análise, considerando a porcentagem de neutrófilos que expressam o CXCR2 com ou sem estímulo, foi observada discreta

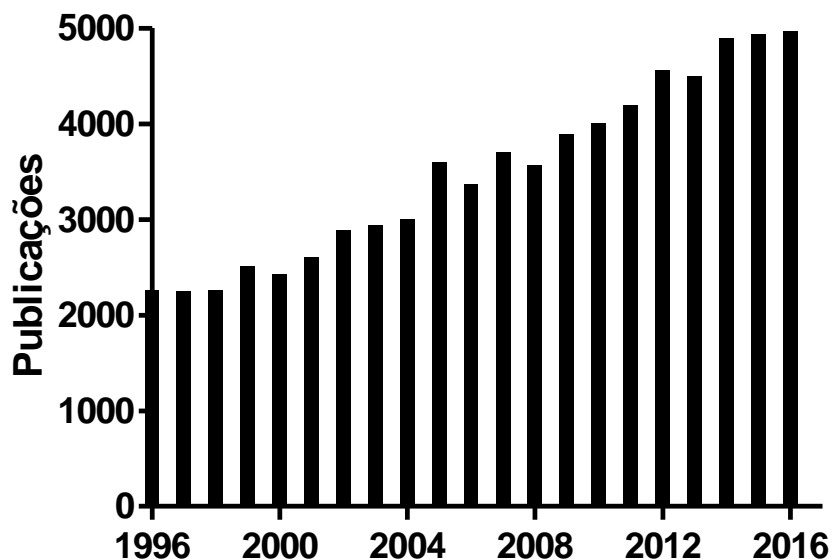
dessensibilização do CXCR2 tanto nos neutrófilos selvagens quanto nos CD300a<sup>-/-</sup> (Figura 14a). No entanto, quando analisada por meio da intensidade média de fluorescência do CXCR2, a dessensibilização foi observada timidamente nos neutrófilos selvagens (Figura 14b).



**Figura 14 – O receptor CXCR2 de neutrófilos sofre dessensibilização quando previamente estimulados com seu ligante, CXCL1.** 10<sup>6</sup> neutrófilos isolados da medula óssea de animais WT e CD300a<sup>-/-</sup> foram incubados com RPMI ou CXCL1 (20ng/mL) e, depois de 45 minutos, marcados com anticorpos anti-Ly6G e anti-CXCR2 para análise em citometria de fluxo. Para avaliação da dessensibilização foi levada em consideração a proporção de neutrófilos que expressam CXCR2 sem e com estímulo com CXCL1 (a) e a intensidade média de fluorescência do CXCR2 sem e com estímulo com CXCL1 (b).

## 6. Discussão

Em tempos de avanços em diversas áreas da ciência, diversos temas ainda permanecem à sombra do esclarecimento. Há dezenas de revistas que possuem como conteúdo principal estudos envolvendo a artrite reumatoide (AR). Segundo dados do PubMed, a cada ano as publicações que possuem como palavra-chave “rheumatoid arthritis” vêm crescendo (Figura 15), constatando a necessidade de se buscar novos conhecimentos e terapias para ajudar no tratamento e prevenção da doença.



**Figura 15 – Publicações com a palavra-chave “rheumatoid arthritis” de 1996 a 2016.**

**Dados baseados em buscas no PubMed.**

A regulação da resposta inflamatória é um ponto de extrema importância para melhor se compreender a AR, uma vez que é bem aceito que a resposta inflamatória desenfreada pode levar à inflamação crônica (Lo et al. 1999; Carlberg et al. 2016).

Diversas moléculas regulatórias são alvos de estudo no contexto de AR com o intuito de entender melhor a patogênese e desenvolvimento da doença para que novos e efetivos alvos terapêuticos sejam descobertos.

Há pouca literatura envolvendo o imunorreceptor CD300a, dado que sua primeira descrição data de 1999 (Cantoni et al. 1999). Embora recém descrito, o CD300a já se apresenta como molécula importante no contexto de sepsis (Udayanga et al. 2016), infecções por HIV (Silva et al. 2011) e DENV (Carnec et al. 2015) e doenças como asma (MUNITZ et al. 2006) e câncer (Jiang et al. 2015), onde, de forma geral, foi demonstrada a capacidade regulatória do receptor. O CD300a é expresso em células tanto de linhagem linfóide quanto mieloide (Clark et al. 2009), sendo ligeiramente mais estudado em células de linhagem mieloide, por apresentarem sólida expressão basal (Nakahashi-Oda, Tahara-Hanaoka, Shoji, et al. 2012; Alvarez et al. 2008; Udayanga et al. 2016; Munitz et al. 2006).

No presente estudo, utilizando camundongos CD300a<sup>-/-</sup>, o imunorreceptor CD300a foi, pela primeira vez, associado à artrite por intermédio do modelo de artrite induzida por antígeno.

No aspecto geral, os animais deficientes para o gene do CD300a apresentaram maior intensidade nos parâmetros inflamatórios quando comparados aos animais selvagens, revelando a participação do imunorreceptor na patogênese da artrite induzida por antígeno. Quando submetidos ao modelo de AIA, os animais CD300a<sup>-/-</sup> apresentaram maior infiltrado inflamatório, caracterizado pela presença massiva de polimorfonucleares na cavidade sinovial 24 horas após o desafio (Figura 4). No tecido periarticular dos animais nocautes também foi observado maior infiltrado inflamatório, bem como perda da

arquitetura sinovial, mostrada por meio da atividade enzimática da mieloperoxidase (Figura 5a) e pela análise histológica (Figura 6). A presença de maior quantidade de neutrófilos, tanto na cavidade sinovial quanto no tecido periarticular de animais CD300a<sup>-/-</sup>, parece ser resultado da maior produção da principal quimiocina responsável por recrutar essas células, CXCL1, (Coelho et al. 2008; Kolaczowska & Kubes 2013) dosada no homogenato do tecido periarticular (Figura 5b).

É bem estabelecida a relação entre a fagocitose de células apoptóticas, por meio da exposição da fosfatidilserina, e supressão da resposta pró-inflamatória, o que favorece o processo de resolução da inflamação (Fadok et al. 1998; Huynh et al. 2002). Com base nessa informação, além da descrição da fosfatidilserina como ligante do CD300a (Nakahashi-Oda, Tahara-Hanaoka, Honda, et al. 2012), levantou-se a questão do envolvimento do CD300a no processo de resolução da inflamação no modelo de AIA. Embora os animais CD300a<sup>-/-</sup> apresentem um quadro mais intenso de artrite nos tempos iniciais da inflamação, a resolução ocorre de forma pareada com os animais selvagens (Figura 7), o que sugere a não participação do CD300a no processo resolutivo do modelo de AIA.

A citocina IL-6 possui grande relevância na patogênese tanto da AR quanto do modelo de AIA, onde animais IL-6<sup>-/-</sup> se mostram resistentes (Hennigan & Kavanaugh 2008; Boe et al. 1999). IL-6 é muito bem conhecida principalmente por sua ação pró-inflamatória, porém estudos evidenciam também atividades regenerativas e anti-inflamatórias (Scheller et al. 2011). O recrutamento de leucócitos para sítios de inflamação tem associação com a IL-6, principalmente por sua participação no que diz respeito à produção de quimiocinas (Romano et

al. 1997). No tempo de 24 horas após o desafio em animais imunizados, a produção de IL-6 no tecido periarticular de animais nocautes se apresenta aumentada quando comparada a animais selvagens (Figura 5c). A IL-6 aumentada no animal nocaute pode ser responsável pela resolução pareada com os animais selvagens (Figura 7), uma vez que esta é a principal citocina responsável pela transição entre o recrutamento de neutrófilos e monócitos, por meio da alteração do perfil de quimiocinas secretadas de CXC para CC (Kaplanski et al. 2003; Scheller et al. 2011).

Os macrófagos possuem papel fundamental na produção moléculas inflamatórias, como CXCL1 e IL-6, na AR (Szekanecz & Koch 2007). Quando estimulados por LPS, macrófagos que não possuem o gene do CD300a se mostraram mais ativados, produzindo quantidades superiores de CXCL1 e IL-6 (Figura 11), dado que é suportado por Tanaka e colaboradores, que observaram maior produção de IL-6 por macrófagos CD300a<sup>-/-</sup> quando comparado com macrófagos selvagens (Tanaka et al. 2014). O perfil inflamatório destes macrófagos CD300a<sup>-/-</sup> realça a importância do receptor no controle da ativação dessas células. O descontrole causado pela ausência do CD300a, que leva à maior produção de moléculas pró-inflamatórias pelos macrófagos CD300a<sup>-/-</sup>, colabora para o maior influxo de neutrófilos na cavidade sinovial e tecido periarticular de animais com AIA.

O desencadeamento do processo inflamatório passa pela ativação de células endoteliais e o processo de transmigração dos neutrófilos, dependente de citocinas e quimiocinas, para o tecido afetado (Kruger et al. 2015). Uma vez no tecido, os neutrófilos podem apresentar ativação inapropriada e contribuir para o dano tecidual (Kolaczowska & Kubes 2013). A fim de se evitar uma

resposta exacerbada e danos ao hospedeiro, a ativação dos neutrófilos deve ser bem controlada e nesse ponto atuam os receptores inibitórios (Daëron et al. 2008), dos quais o CD300a é um exemplar. No modelo de AIA os neutrófilos recrutados para a cavidade sinovial inflamada apresentam expressão do CD300a aumentada. Isso é observado tanto quando se compara neutrófilos da cavidade desafiada com mBSA e salina (Figura 12b, c), quanto na comparação entre neutrófilos presentes no sangue e na cavidade inflamada (Figura 12e). O dado da Figura 12d revela que praticamente todos os neutrófilos de camundongos com AIA expressam o CD300a em algum nível, sendo que os neutrófilos que transmigram para a cavidade sinovial apresentam maior intensidade média de fluorescência (Figura 12e), corroborando o trabalho de Alvarez e colaboradores, onde foi observada uma sobreexpressão do CD300a em neutrófilos humanos sob estímulos inflamatórios (Alvarez et al. 2008). Ainda há, na literatura, a observação de que a expressão do CD300a é sobreexpressada em monócitos após a transmigração (Ghavampour et al. 2013). O aumento da expressão do CD300a nos neutrófilos que responderam ao estímulo inflamatório, junto com o suporte da literatura, sugere fortemente a participação do imunorreceptor no controle da resposta neutrofílica.

Além da expressão do CD300a nos neutrófilos sugerir sua participação na resposta da célula, o CD300a também se apresentou como peça importante na regulação da atividade quimiotática dos neutrófilos. No ensaio de quimiotaxia utilizando CXCL1, fMLP e LTB<sub>4</sub> como estímulos, os neutrófilos CD300a<sup>-/-</sup> migraram mais na direção do gradiente dos três agentes quimiotáticos testados (Figura 13). Munitz e colaboradores mostraram que a ativação do CD300a inibe a transmigração dependente de eotaxina de eosinófilos humanos (Munitz et al.

2006). Em 2013, Ghavampour e colaboradores mostraram que alguns genes são sobreexpressados em monócitos humanos após sua transmigração, entre esses genes está o CD300a (Ghavampour et al. 2013). Ainda no mesmo trabalho, confirmando e completando o dado de expressão gênica, foi mostrado que o CD300a regula a transmigração dos monócitos, inibindo-a quando o receptor é ativado. A literatura suporta o dado da figura 13, que mostra, pela primeira vez que o CD300a regula também a capacidade dos neutrófilos de responder a agentes quimiotáticos, estando, portanto, envolvido também na regulação da transmigração dos neutrófilos. Essa informação ajuda a explicar o fenótipo observado, uma vez que os animais CD300a<sup>-/-</sup> com AIA apresentam maior infiltrado de células polimorfonucleares na cavidade sinovial.

Em muitas células que respondem a estímulos quimiotáticos, os sinais que regulam o movimento celular são iniciados por receptores acoplados a proteína G (GPCRs) (Miller & Falke 2004). Quando interagem com seus ligantes na superfície celular, os GPCRs transduzem o sinal do meio extracelular para o citoplasma, ativando cascatas de sinalização que vão levar a respostas específicas, a depender do receptor e do ligante (Williams & Hill 2009). Embora a sinalização via GPCR seja essencial para o funcionamento celular normal, uma superestimulação ou sinalização contínua pode ter ação perniciosa para a célula, podendo levar à proliferação descontrolada, como no câncer. Por esse motivo, células saudáveis possuem um mecanismo muito bem regulado que leva à dessensibilização transiente do GPCR para que a fisiologia normal seja sustentada. A dessensibilização consiste na internalização do receptor e este pode ser degradado ou reexposto na superfície após certo tempo (Rajagopal & Shenoy 2017). Os três estímulos utilizados no ensaio de quimiotaxia são ligantes

de GPCRs. Quando neutrófilos selvagens e CD300a<sup>-/-</sup> foram estimulados com CXCL1 para identificar um possível papel da dessensibilização do CXCR2 na maior atividade quimiotática dos neutrófilos CD300a<sup>-/-</sup>, não foi encontrada diferença (Figura 14), embora tenha sido observada uma dessensibilização ligeiramente inferior do CXCR2 em neutrófilos CD300a<sup>-/-</sup> quando analisada a intensidade média de fluorescência (Figura 14b). Apesar de não explicar a maior atividade quimiotática dos neutrófilos CD300a<sup>-/-</sup>, é possível que se consiga uma resposta mais clara estimulando os neutrófilos por mais tempo, podendo ser observado um aumento da diferença entre a dessensibilização do CXCR2 em neutrófilo selvagens e nocautes.

Neutrófilos são responsáveis pela secreção de vários mediadores que podem afetar, direta ou indiretamente, a sensibilidade de neurônios aferentes primários e aumentar a hipernocicepção (Amann 2007), mas, embora os animais CD300a<sup>-/-</sup> apresentem maior influxo neutrofílico, não foi encontrada diferença entre a capacidade hipernociceptiva de animais nocautes e selvagens 24 horas após o desafio (Figura 8). Tal diferença pode não ter sido observada devido ao tempo em que o teste foi realizado, pois estando os animais muito sensíveis, a diferença entre os grupos não foi visualizada. Além disso, este dado de hipernocicepção não denota antagonismo, visto que a presença de neutrófilos possui correlação indireta com hipernocicepção e para que se estabelecesse uma relação direta, mediadores como prostaglandinas, leucotrienos e elastase deveriam ter sido dosados.

O CD300a é expresso em diferentes níveis em alguns subtipos de linfócitos B, incluindo plasmócitos (Silva et al. 2011), porém, por meio da dosagem de IgG anti-mBSA total sérica, não foi verificado componente da

resposta imune dependente de linfócito B no fenótipo observado nos camundongos CD300a<sup>-/-</sup> (Figura 9). Apesar de não haver diferença na quantidade de anticorpos anti-mBSA no soro de animais nocautes e selvagens, os esplenócitos de animais nocautes apresentaram perfil mais inflamatório que esplenócitos de animais selvagens, produzindo maiores níveis de IFN- $\gamma$  e IL-17, e menores níveis de IL-10 (Figura 10).

No âmbito molecular, levando-se em consideração as fosfatases ativadas pelo CD300a, determinadas vias podem estar sendo afetadas pela ativação do receptor. Existe um substancial corpo de evidências de que PI3K $\gamma$  exerce um importante papel nos eventos iniciais da transdução de sinais de GPCRs (como receptores de fMLP, C5a, IL-8, LTB4) que levam à migração de células do sistema imune inato (Stephens et al. 2008; Hawkins & Stephens 2015; Ferguson et al. 2007; Hirsch et al. 2000). Uma das fosfatases recrutadas e ativadas pelo CD300a é SHIP (DeBell et al. 2012), que atua desfosforilando PIP3 em PIP2, elementos *downstream* à via da PI3K $\gamma$  (Daëron et al. 1995). Dessa forma, no contexto estudado, a ativação de SHIP poderia levar à interrupção da cascata de sinalização da via de PI3K $\gamma$  e assim limitar a transmigração dos neutrófilos. Além de SHIP, outras fosfatases ativadas pelo CD300a, SHP-1 e SHP-2, exercem sua atividade desfosforilando uma gama de moléculas que podem estar envolvidas no fenótipo mais inflamatório observado nos animais nocautes. Conforme descrito na introdução, SHP-1 e SHP-2 intervêm no processo de inflamação e quimiotaxia, modulando sinais celulares que envolvem PI3K, Akt, JAK2, MAPK, NF- $\kappa$ B e até mesmo  $\beta$ -arrestinas, interferindo no processo de dessensibilização (Chong & Maiese 2007; Lodeiro et al. 2011). Como as três fosfatases descritas podem modular a via da PI3K, avaliar a ativação de Akt seria

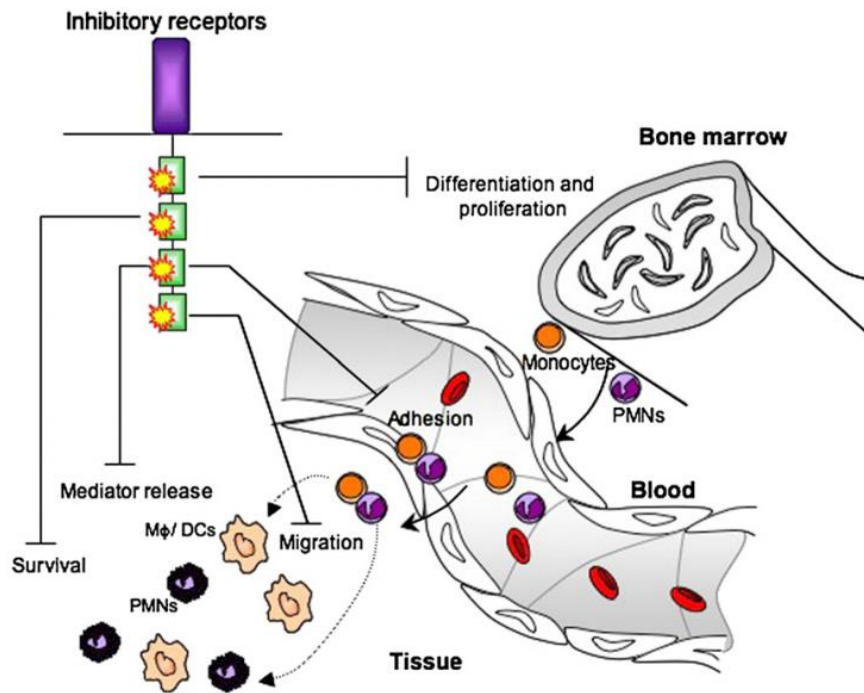
uma alternativa para se descobrir onde a ativação do CD300a interfere. Foram realizados experimentos com o intuito de analisar se a proteína Akt apresentava diferentes níveis de ativação (fosforilação) entre neutrófilos selvagens e nocautes, porém não foi possível detectar o resultado na técnica utilizada, *western blot*. Avaliar a fosforilação de Akt por outras técnicas ainda continua sendo a primeira alternativa para desvendar a principal via modulada pelo CD300a.

Ainda há a possibilidade do CD300a estar envolvido na regulação do fator de transcrição STAT3. Um dos maiores ativadores de STAT3 é a IL-6, citocina que, como visto, foi encontrada aumentada nos animais nocautes. A ligação da IL-6 ao seu receptor induz a homodimerização da subunidade transdutora de sinal gp130, que leva à ativação de Jak1 com consequente fosforilação e ativação de STAT3 (Garbers et al. 2015). Uma vez fosforilado, STAT3 pode regular genes que vão atuar em diferentes faces da resposta inflamatória, induzindo migração, sobrevivência e proliferação celular e produção de mediadores pró ou anti-inflamatórios (Nguyen-Jackson et al. 2010; Yu et al. 2014). A fosfatase SHP-2, uma das ativadas pelo CD300a, é responsável por regular a via Jak-STAT desfosforilando a tirosina 759 do gp130 e, dessa forma, inibindo a ativação de STAT3 e suas funções efetoras (Lehmann et al. 2003).

Apesar de bilhões de dólares serem gastos em pesquisas na área de imunologia, poucas drogas anti-inflamatórias efetivas têm surgido e existe uma urgente necessidade de novas drogas, uma vez que muitas doenças inflamatórias não respondem adequadamente aos medicamentos atuais (Mackay 2008). A modulação da migração celular é objeto de interesse na busca por terapias anti-inflamatórias e entre as moléculas-alvo incluem-se as

quimiocinas e seus receptores, moléculas de adesão e moléculas envolvidas na angiogênese (Castellani et al. 2007; Mackay 2008), tendo até mesmo estudos relacionando tais alvos com a artrite (Podolin et al. 2002). Historicamente, estudos em imunologia e em busca de terapias anti-inflamatórias se atém a vias que levam à ativação celular em resposta a antígenos e patógenos, entretanto nas últimas duas décadas, além de estudos que visam ativação celular, vias que podem conter a ativação celular e restaurar a homeostase têm ganhado espaço e importância (Cooper 2008).

A ativação de receptores inibitórios pode modular a resposta inflamatória em diversos pontos, como a liberação de mediadores, a migração, diferenciação e proliferação celular, entre outros (Figura 16) (Munitz 2010). Foi demonstrada inibição da sinalização via GPCR e receptor de citocinas pelo CD300a (Munitz et al. 2006) e no presente trabalho, o CD300a se apresentou como importante regulador na liberação de mediadores inflamatórios e na migração de neutrófilos.



Munitz, 2010

**Figura 16 – Pontos de intervenção de receptores inibitórios na resposta de ativação celular.**

Muito pouco ainda é conhecido e explorado em relação aos receptores inibitórios e sua importância na modulação de respostas celulares em doenças inflamatórias, ainda mais no que diz respeito ao CD300a, já que este ainda está despontando no cenário da pesquisa científica. A identificação do CD300a como importante elemento no controle da artrite induzida por antígeno em camundongos, além da importância em outras doenças já citadas, o coloca dentro do grupo de potenciais alvos terapêuticos. Um longo caminho, repleto de desafios, deve ser trilhado para que o CD300a seja efetivamente empregado como alvo terapêutico, mas o desafio atiza a motivação e inspiração.

## 7. Conclusão

O presente trabalho mostra, pela primeira vez, o envolvimento do imunorreceptor CD300a no modelo de artrite induzida por antígeno. Graças ao uso de animais CD300a<sup>-/-</sup>, o receptor foi identificado como importante regulador do infiltrado neutrofílico na cavidade sinovial e no tecido periarticular. O CD300a controla funções de macrófagos e de neutrófilos, modulando, respectivamente, a produção de mediadores inflamatórios e a capacidade de responder a agentes quimiotáticos, além de regular a ativação de esplenócitos. Este estudo abre portas para outros envolvendo o CD300a em outros modelos inflamatórios.

## 8. Referências

- Alvarez, Y. et al., 2008. The CD300a (IRp60) inhibitory receptor is rapidly up-regulated on human neutrophils in response to inflammatory stimuli and modulates CD32a (FcγRIIa) mediated signaling. *Molecular Immunology*, 45(1), pp.253–258. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17588661> [Accessed March 13, 2017].
- Amann, R., 2007. Neutrophils in Inflammatory Pain. In *Encyclopedia of Pain*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 1332–1334. Available at: [http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-540-29805-2\\_2714](http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-540-29805-2_2714) [Accessed April 3, 2017].
- Bachelet, I. et al., 2005. The inhibitory receptor IRp60 (CD300a) is expressed and functional on human mast cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175(12), pp.7989–95. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16339535> [Accessed March 13, 2017].
- Bachelet, I., Munitz, A. & Levi-Schaffer, F., 2006. Abrogation of allergic reactions by a bispecific antibody fragment linking IgE to CD300a. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 117(6), pp.1314–20. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674906009249> [Accessed March 13, 2017].
- Barrow, A.D. & Trowsdale, J., 2006. You say ITAM and I say ITIM, let's call the whole thing off: the ambiguity of immunoreceptor signalling. *European journal of immunology*, 36(7), pp.1646–53. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.200636195> [Accessed March 20, 2017].
- Barton, G.M., 2008. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *The Journal of clinical investigation*, 118(2), pp.413–20. Available at: <http://www.jci.org/articles/view/34431> [Accessed March 12, 2017].
- Billadeau, D.D. & Leibson, P.J., 2002. ITAMs versus ITIMs: striking a balance during cell regulation. *The Journal of clinical investigation*, 109(2), pp.161–8. Available at: <http://www.jci.org/articles/view/14843> [Accessed March 20, 2017].
- Binstadt, B.A. et al., 1996. Sequential involvement of Lck and SHP-1 with MHC-recognizing receptors on NK cells inhibits FcR-initiated tyrosine kinase activation. *Immunity*, 5(6), pp.629–38. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8986721> [Accessed March 21, 2017].
- Boe, A. et al., 1999. Interleukin 6 knock-out mice are resistant to antigen-induced experimental arthritis. *Cytokine*, 11(12), pp.1057–64. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466699905021> [Accessed March 23, 2017].
- Borrego, F., 2013. The CD300 molecules: an emerging family of regulators of the immune system. *Blood*, 121(11), pp.1951–1960. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23293083> [Accessed March 13, 2017].
- Brackertz, D. et al., 1977. Studies on antigen-induced arthritis in mice. II. Immunologic correlates of arthritis susceptibility in mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 118(5), pp.1639–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/300752> [Accessed March 23, 2017].
- Brenchley, J.M. et al., 2006. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nature medicine*, 12(12), pp.1365–71. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nm1511> [Accessed March 14, 2017].
- Buckley, T. et al., 2011. Haemodynamic changes during early bereavement: potential contribution to increased cardiovascular risk. *Heart, lung & circulation*, 20(2), pp.91–8. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1443950610016434> [Accessed March 14, 2017].
- Bustamante, C.D. et al., 2005. Natural selection on protein-coding genes in the human genome. *Nature*, 437(7062), pp.1153–1157. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16237444> [Accessed March 13, 2017].
- Cambier, J.C., 1995. New nomenclature for the Reth motif (or ARH1/TAM/ARAM/YXXL). *Immunology today*, 16(2), p.110. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0167569995801057> [Accessed March 20, 2017].
- Cantoni, C. et al., 1999. Molecular and functional characterization of IRp60, a member of the immunoglobulin superfamily that functions as an inhibitory receptor in human NK cells. *European journal of immunology*, 29(10), pp.3148–59. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10540326> [Accessed March 13, 2017].
- Carlberg, C., Ulven, S.M. & Molnár, F., 2016. Chronic Inflammation and Metabolic Stress. In *Nutrigenomics*. Cham: Springer International Publishing, pp. 121–137. Available at: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-30415-1\\_7](http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-30415-1_7) [Accessed March 14, 2017].
- Carnec, X. et al., 2015. The Phosphatidylserine and Phosphatidylethanolamine Receptor CD300a Binds Dengue Virus and Enhances Infection. J. U. Jung, ed. *Journal of virology*, 90(1), pp.92–102. Available at: <http://jvi.asm.org/lookup/doi/10.1128/JVI.01849-15> [Accessed March 13, 2017].
- Cascão, R. et al., 2010. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. *Autoimmunity reviews*, 9(8), pp.531–5. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568997210000030> [Accessed March 23, 2017].
- Castellani, M.L. et al., 2007. Anti-Chemokine Therapy for Inflammatory Diseases. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 20(3), pp.447–453. Available at:

- <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/039463200702000303> [Accessed April 4, 2017].
- Chong, Z.Z. & Maiese, K., 2007. The Src homology 2 domain tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: diversified control of cell growth, inflammation, and injury. *Histology and histopathology*, 22(11), pp.1251–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17647198> [Accessed March 21, 2017].
- Clark, G.J. et al., 2007. Novel human CD4+ T lymphocyte subpopulations defined by CD300a/c molecule expression. *Journal of leukocyte biology*, 82(5), pp.1126–35. Available at: <http://www.jleukbio.org/cgi/doi/10.1189/jlb.0107035> [Accessed March 13, 2017].
- Clark, G.J. et al., 2009. The CD300 family of molecules are evolutionarily significant regulators of leukocyte functions. *Trends in immunology*, 30(5), pp.209–17. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S147149060900060X> [Accessed March 13, 2017].
- Coelho, F.M. et al., 2008. The chemokine receptors CXCR1/CXCR2 modulate antigen-induced arthritis by regulating adhesion of neutrophils to the synovial microvasculature. *Arthritis & Rheumatism*, 58(8), pp.2329–2337. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18668539> [Accessed March 24, 2017].
- Cooper, M.D., 2008. Inhibition of immune cell function. *Immunological reviews*, 224(1), pp.7–10. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-065X.2008.00665.x> [Accessed April 4, 2017].
- Crossley, M.J., Spowage, M. & Hunneyball, I.M., 1987. Studies on the effects of pharmacological agents on antigen-induced arthritis in BALB/c mice. *Drugs under experimental and clinical research*, 13(5), pp.273–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2890505> [Accessed March 23, 2017].
- Cunha, T.M. et al., 2009. Treatment with DF 2162, a non-competitive allosteric inhibitor of CXCR1/2, diminishes neutrophil influx and inflammatory hypernociception in mice. *British Journal of Pharmacology*, 154(2), pp.460–470. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18362895> [Accessed March 28, 2017].
- Daëron, M. et al., 2008. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs: a quest in the past and future. *Immunological reviews*, 224(1), pp.11–43. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-065X.2008.00666.x> [Accessed March 13, 2017].
- Daëron, M. et al., 1995. The same tyrosine-based inhibition motif, in the intracytoplasmic domain of Fc gamma RIIB, regulates negatively BCR-, TCR-, and FcR-dependent cell activation. *Immunity*, 3(5), pp.635–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7584153> [Accessed March 20, 2017].
- DeBell, K.E. et al., 2012. Functional requirements for inhibitory signal

- transmission by the immunomodulatory receptor CD300a. *BMC Immunology*, 13(1), p.23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22537350> [Accessed March 13, 2017].
- Dunlop, D.D. et al., 2003. The costs of arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 49(1), pp.101–113. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12579600> [Accessed March 23, 2017].
- Edwards, S.W. & Hallett, M.B., 1997. Seeing the wood for the trees: the forgotten role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Immunology today*, 18(7), pp.320–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9238834> [Accessed March 24, 2017].
- Fadok, V.A. et al., 1998. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *The Journal of clinical investigation*, 101(4), pp.890–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9466984> [Accessed April 12, 2017].
- Ferguson, G.J. et al., 2007. PI(3)Ky has an important context-dependent role in neutrophil chemokinesis. *Nature Cell Biology*, 9(1), pp.86–91. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncb1517> [Accessed April 13, 2017].
- Ferguson, L.R. et al., 2010. Genetic factors in chronic inflammation: Single nucleotide polymorphisms in the STAT-JAK pathway, susceptibility to DNA damage and Crohn's disease in a New Zealand population. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 690(1–2), pp.108–115. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0027510710000394> [Accessed March 14, 2017].
- Firestein, G.S., 2003. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, 423(6937), pp.356–361. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature01661> [Accessed March 23, 2017].
- Franceschi, C. & Campisi, J., 2014. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 69 Suppl 1(Suppl 1), pp.S4-9. Available at: <https://academic.oup.com/biomedgerontology/article-lookup/doi/10.1093/gerona/glu057> [Accessed March 14, 2017].
- Fullerton, J.N. & Gilroy, D.W., 2016. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nature Reviews Drug Discovery*, 15(8), pp.551–567. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrd.2016.39> [Accessed March 12, 2017].
- Gabriel, S.E., 2001. The epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheumatic diseases clinics of North America*, 27(2), pp.269–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11396092> [Accessed March 23, 2017].

- Ganesan, L.P. et al., 2003. The protein-tyrosine phosphatase SHP-1 associates with the phosphorylated immunoreceptor tyrosine-based activation motif of Fc gamma RIIa to modulate signaling events in myeloid cells. *The Journal of biological chemistry*, 278(37), pp.35710–7. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M305078200> [Accessed March 22, 2017].
- Garbers, C., Aparicio-Siegmund, S. & Rose-John, S., 2015. The IL-6/gp130/STAT3 signaling axis: recent advances towards specific inhibition. *Current Opinion in Immunology*, 34, pp.75–82. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0952791515000370> [Accessed April 17, 2017].
- Gergely, J., Pecht, I. & Sármay, G., 1999. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif-bearing receptors regulate the immunoreceptor tyrosine-based activation motif-induced activation of immune competent cells. *Immunology letters*, 68(1), pp.3–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10397150> [Accessed March 20, 2017].
- Ghavampour, S. et al., 2013. Transcriptional Profiling of Human Monocytes Identifies the Inhibitory Receptor CD300a as Regulator of Transendothelial Migration M. Kuwana, ed. *PLoS ONE*, 8(9), p.e73981. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24058511> [Accessed April 4, 2017].
- Grespan, R. et al., 2008. CXCR2-specific chemokines mediate leukotriene B4-dependent recruitment of neutrophils to inflamed joints in mice with antigen-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 58(7), pp.2030–40. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/art.23597> [Accessed March 23, 2017].
- Hanada, T. & Yoshimura, A., 2002. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 13(4–5), pp.413–421. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359610102000266> [Accessed March 20, 2017].
- Harris, E.D. & Harris, E.D., 1990. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *The New England journal of medicine*, 322(18), pp.1277–89. Available at: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199005033221805> [Accessed March 23, 2017].
- Hawkins, P.T. & Stephens, L.R., 2015. PI3K signalling in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(6), pp.882–897. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1388198114002583> [Accessed April 13, 2017].
- Hennigan, S. & Kavanaugh, A., 2008. Interleukin-6 inhibitors in the treatment of rheumatoid arthritis. *Therapeutics and clinical risk management*, 4(4), pp.767–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19209259> [Accessed March 30, 2017].
- Hess, A. et al., 2011. Blockade of TNF- $\alpha$  rapidly inhibits pain responses in the

- central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(9), pp.3731–6. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1011774108> [Accessed March 24, 2017].
- Hirsch, E. et al., 2000. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5455), pp.1049–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10669418> [Accessed April 13, 2017].
- Huang, J. et al., 2016. Methods for measuring myeloperoxidase activity toward assessing inhibitor efficacy in living systems. *Journal of leukocyte biology*, 99(4), pp.541–8. Available at: <http://www.jleukbio.org/cgi/doi/10.1189/jlb.3RU0615-256R> [Accessed March 24, 2017].
- Huynh, M.-L.N., Fadok, V.A. & Henson, P.M., 2002. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *The Journal of clinical investigation*, 109(1), pp.41–50. Available at: <http://www.jci.org/articles/view/11638> [Accessed April 12, 2017].
- Isakov, N., 1998. ITAMs: immunoregulatory scaffolds that link immunoreceptors to their intracellular signaling pathways. *Receptors & channels*, 5(5), pp.243–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9666518> [Accessed March 20, 2017].
- Ivashkiv, L.B., 2009. Cross-regulation of signaling by ITAM-associated receptors. *Nature Immunology*, 10(4), pp.340–347. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ni.1706> [Accessed March 20, 2017].
- Jiang, L. et al., 2015. Suppression of CD300A inhibits the growth of diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget*, 6(31), pp.31191–202. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26435477> [Accessed March 30, 2017].
- Kaplanski, G. et al., 2003. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends in immunology*, 24(1), pp.25–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12495721> [Accessed April 3, 2017].
- Kievit, W. et al., 2008. The effectiveness and medication costs of three anti-tumour necrosis factor alpha agents in the treatment of rheumatoid arthritis from prospective clinical practice data. *Annals of the rheumatic diseases*, 67(9), pp.1229–34. Available at: <http://ard.bmj.com/cgi/doi/10.1136/ard.2007.083675> [Accessed March 24, 2017].
- Kobayashi, Y., 2008. The role of chemokines in neutrophil biology. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 13, pp.2400–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17981721> [Accessed March 24, 2017].

- Kolaczowska, E. & Kubes, P., 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 13(3), pp.159–175. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23435331> [Accessed March 30, 2017].
- Kotas, M.E. & Medzhitov, R., 2015. Homeostasis, Inflammation, and Disease Susceptibility. *Cell*, 160, pp.816–827. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.010> [Accessed March 12, 2017].
- Kruger, P. et al., 2015. Neutrophils: Between Host Defence, Immune Modulation, and Tissue Injury C. Dehio, ed. *PLoS Pathogens*, 11(3), p.e1004651. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25764063> [Accessed April 3, 2017].
- Lazzerini, P.E. et al., 2016. Spotlight on sirukumab for the treatment of rheumatoid arthritis: the evidence to date. *Drug design, development and therapy*, 10, pp.3083–3098. Available at: <https://www.dovepress.com/spotlight-on-sirukumab-for-the-treatment-of-rheumatoid-arthritis-the-e-peer-reviewed-article-DDDT> [Accessed March 24, 2017].
- Lehmann, U. et al., 2003. SHP2 and SOCS3 contribute to Tyr-759-dependent attenuation of interleukin-6 signaling through gp130. *The Journal of biological chemistry*, 278(1), pp.661–71. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M210552200> [Accessed April 17, 2017].
- León, B., López-Bravo, M. & Ardavín, C., 2007. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania. *Immunity*, 26(4), pp.519–31. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761307002099> [Accessed March 14, 2017].
- Liu, J. & Cao, X., 2016. Cellular and molecular regulation of innate inflammatory responses. *Cellular & Molecular Immunology*, 13(6), pp.711–721. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27818489> [Accessed March 13, 2017].
- Lo, D. et al., 1999. Integrating innate and adaptive immunity in the whole animal. *Immunological reviews*, 169, pp.225–39. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10450520> [Accessed March 14, 2017].
- Lodeiro, M. et al., 2011. The SHP-1 protein tyrosine phosphatase negatively modulates Akt signaling in the ghrelin/GHSR1a system. *Molecular biology of the cell*, 22(21), pp.4182–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21900501> [Accessed April 13, 2017].
- Long, E.O., Negative signalling by inhibitory receptors: the NK cell paradigm. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2587243/pdf/nihms47673.pdf> [Accessed March 20, 2017].
- Long, E.O., 1999. REGULATION OF IMMUNE RESPONSES THROUGH

- INHIBITORY RECEPTORS. *Annual Review of Immunology*, 17(1), pp.875–904. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10358776> [Accessed March 20, 2017].
- Mackay, C.R., 2008. Moving targets: cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies. *Nature Immunology*, 9(9), pp.988–998. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ni.1210> [Accessed April 4, 2017].
- McInnes, I.B. & Schett, G., 2007. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Immunology*, 7(6), pp.429–442. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17525752> [Accessed March 24, 2017].
- McLeish, K.R. et al., 1989. Evidence that activation of a common G-protein by receptors for leukotriene B4 and N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine in HL-60 cells occurs by different mechanisms. *The Biochemical journal*, 260(2), pp.427–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2548477> [Accessed March 29, 2017].
- Medzhitov, R., 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), pp.428–435. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18650913> [Accessed March 12, 2017].
- Mellado, M. et al., 2015. T Cell Migration in Rheumatoid Arthritis. *Frontiers in immunology*, 6, p.384. Available at: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2015.00384/abstract> [Accessed March 23, 2017].
- Miki, H. et al., 2015. Involvement of CD300a Phosphatidylserine Immunoreceptor in Aluminum Salt Adjuvant-Induced Th2 Responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 194(11), pp.5069–76. Available at: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1402915> [Accessed March 13, 2017].
- Miller, A.F. & Falke, J.J., 2004. Chemotaxis Receptors and Signaling. In *Advances in protein chemistry*. pp. 393–444. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15500867> [Accessed April 4, 2017].
- Mino, T. & Takeuchi, O., 2013. Post-transcriptional regulation of cytokine mRNA controls the initiation and resolution of inflammation. *Biotechnology & genetic engineering reviews*, 29(1), pp.49–60. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02648725.2013.801236> [Accessed March 14, 2017].
- Munitz, A., 2010. Inhibitory receptors on myeloid cells: New targets for therapy? *Pharmacology & Therapeutics*, 125(1), pp.128–137. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19913051> [Accessed April 4, 2017].
- Munitz, A. et al., 2006. The inhibitory receptor IRp60 (CD300a) suppresses the effects of IL-5, GM-CSF, and eotaxin on human peripheral blood eosinophils. *Blood*, 107(5), pp.1996–2003. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16254138> [Accessed March 13, 2017].
- MUNITZ, A., BACHELET, I. & LEVISCHAFFER, F., 2006. Reversal of airway inflammation and remodeling in asthma by a bispecific antibody fragment linking CCR3 to CD300a. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 118(5), pp.1082–1089. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17088133> [Accessed March 30, 2017].
- Nakahashi-Oda, C., Tahara-Hanaoka, S., Shoji, M., et al., 2012. Apoptotic cells suppress mast cell inflammatory responses via the CD300a immunoreceptor. *The Journal of experimental medicine*, 209(8), pp.1493–503. Available at: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20120096> [Accessed March 13, 2017].
- Nakahashi-Oda, C., Tahara-Hanaoka, S., Honda, S., et al., 2012. Identification of phosphatidylserine as a ligand for the CD300a immunoreceptor. *Biochemical and biophysical research communications*, 417(1), pp.646–50. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X11022273> [Accessed March 13, 2017].
- Narayanan, S. et al., 2010. Human Th1 cells that express CD300a are polyfunctional and after stimulation up-regulate the T-box transcription factor eomesodermin. D. Unutmaz, ed. *PloS one*, 5(5), p.e10636. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0010636> [Accessed March 13, 2017].
- Nasef, N.A., Mehta, S. & Ferguson, L.R., 2017. Susceptibility to chronic inflammation: an update. *Archives of Toxicology*, 91(3), pp.1131–1141. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00204-016-1914-5> [Accessed March 14, 2017].
- Nathan, C., 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature reviews. Immunology*, 6(3), pp.173–82. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri1785> [Accessed March 13, 2017].
- Nathan, C., 2002. Points of control in inflammation. *Nature*, 420(6917), pp.846–852. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12490957> [Accessed March 13, 2017].
- Nguyen-Jackson, H. et al., 2010. STAT3 controls the neutrophil migratory response to CXCR2 ligands by direct activation of G-CSF-induced CXCR2 expression and via modulation of CXCR2 signal transduction. *Blood*, 115(16), pp.3354–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20185584> [Accessed April 17, 2017].
- Nielsen, R. et al., 2005. A scan for positively selected genes in the genomes of humans and chimpanzees. C. Tyler-Smith, ed. *PLoS biology*, 3(6), p.e170. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.0030170> [Accessed March 13, 2017].

- Noack, M. & Miossec, P., 2017. Selected cytokine pathways in rheumatoid arthritis. *Seminars in Immunopathology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28213794> [Accessed March 24, 2017].
- Ono, M. et al., 1996. Role of the inositol phosphatase SHIP in negative regulation of the immune system by the receptor FcγRIIB. *Nature*, 383(6597), pp.263–266. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8805703> [Accessed March 20, 2017].
- Park, D. et al., 2007. BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. *Nature*, 450(7168), pp.430–4. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature06329> [Accessed March 13, 2017].
- Pinho, V. et al., 2007. Tissue- and stimulus-dependent role of phosphatidylinositol 3-kinase isoforms for neutrophil recruitment induced by chemoattractants in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179(11), pp.7891–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18025236> [Accessed April 5, 2017].
- Pinto, L.G. et al., 2010. IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. *Pain*, 148(2), pp.247–56. Available at: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00006396-201002000-00013> [Accessed March 24, 2017].
- Pober, J.S. & Sessa, W.C., 2007. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 7(10), pp.803–815. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17893694> [Accessed March 13, 2017].
- Podolin, P.L. et al., 2002. A potent and selective nonpeptide antagonist of CXCR2 inhibits acute and chronic models of arthritis in the rabbit. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 169(11), pp.6435–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12444152> [Accessed April 4, 2017].
- Pohlars, D. et al., 2004. Anti-CD4 monoclonal antibody treatment in acute and early chronic antigen-induced arthritis: influence on T helper cell activation. *Clinical and experimental immunology*, 135(3), pp.409–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15008972> [Accessed March 23, 2017].
- Powell, N.D. et al., 2013. Social stress up-regulates inflammatory gene expression in the leukocyte transcriptome via β-adrenergic induction of myelopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(41), pp.16574–9. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1310655110> [Accessed March 14, 2017].
- Raghuwanshi, S.K. et al., 2012. The chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 couple to distinct G protein-coupled receptor kinases to mediate and regulate leukocyte functions. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 189(6), pp.2824–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22869904> [Accessed March 29,

2017].

- Rajagopal, S. & Shenoy, S.K., 2017. GPCR desensitization: Acute and prolonged phases. *Cellular Signalling*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089865681730030X> [Accessed March 29, 2017].
- Ravetch, J. V & Lanier, L.L., 2000. Immune inhibitory receptors. *Science (New York, N. Y.)*, 290(5489), pp.84–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11021804> [Accessed March 18, 2017].
- Rohani, M.G. & Parks, W.C., 2015. Matrix remodeling by MMPs during wound repair. *Matrix Biology*, 44–46, pp.113–121. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25770908> [Accessed March 14, 2017].
- Romano, M. et al., 1997. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity*, 6(3), pp.315–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9075932> [Accessed April 3, 2017].
- Sabato, V. et al., 2012. CD300a is expressed on human basophils and seems to inhibit IgE/FcεRI-dependent anaphylactic degranulation. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 82B(3), pp.132–138. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22173928> [Accessed March 13, 2017].
- Sakaguchi, S. & Sakaguchi, N., 2005. Animal models of arthritis caused by systemic alteration of the immune system. *Current Opinion in Immunology*, 17(6), pp.589–594. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16214319> [Accessed March 23, 2017].
- Santos, L.L. et al., 2008. Reduced arthritis in MIF deficient mice is associated with reduced T cell activation: down-regulation of ERK MAP kinase phosphorylation. *Clinical and experimental immunology*, 152(2), pp.372–80. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2249.2008.03639.x> [Accessed March 23, 2017].
- Scheller, J. et al., 2011. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(5), pp.878–888. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488911000425> [Accessed April 3, 2017].
- Silva, R. et al., 2011. CD300a is expressed on human B cells, modulates BCR-mediated signaling, and its expression is down-regulated in HIV infection. *Blood*, 117(22), pp.5870–80. Available at: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2010-09-310318> [Accessed March 13, 2017].
- Simhadri, V.R. et al., 2012. Human CD300a binds to phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine, and modulates the phagocytosis of dead cells.

- Blood*, 119(12), pp.2799–809. Available at:  
<http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2011-08-372425>  
 [Accessed March 13, 2017].
- Soehnlein, O. et al., 2017. Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. *Nature reviews. Immunology*. Available at:  
<http://www.nature.com/doi/10.1038/nri.2017.10> [Accessed March 14, 2017].
- Spector, T.D., 1990. Rheumatoid arthritis. *Rheumatic diseases clinics of North America*, 16(3), pp.513–37. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2217956> [Accessed March 23, 2017].
- Spits, H. et al., 2013. Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nature reviews. Immunology*, 13(2), pp.145–9. Available at:  
<http://www.nature.com/doi/10.1038/nri3365> [Accessed March 13, 2017].
- Stephens, L., Milne, L. & Hawkins, P., 2008. Moving towards a better understanding of chemotaxis. *Current biology : CB*, 18(11), pp.R485-94. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982208005344> [Accessed April 13, 2017].
- Sweiss, N. et al., 2014. Tocilizumab in the treatment of rheumatoid arthritis and beyond. *Drug Design, Development and Therapy*, 8, p.349. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24729685> [Accessed March 24, 2017].
- Szekanecz, Z. & Koch, A.E., 2007. Macrophages and their products in rheumatoid arthritis. *Current Opinion in Rheumatology*, 19(3), pp.289–295. Available at:  
<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00002281-200705000-00012> [Accessed March 30, 2017].
- Tanaka, T. et al., 2014. PPAR $\beta/\delta$  activation of CD300a controls intestinal immunity. *Scientific Reports*, 4, p.5412. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24958459> [Accessed April 4, 2017].
- Tian, R. et al., 2014. A possible change process of inflammatory cytokines in the prolonged chronic stress and its ultimate implications for health. *TheScientificWorldJournal*, 2014, p.780616. Available at:  
<http://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/780616/> [Accessed March 14, 2017].
- Udayanga, K.G.S. et al., 2016. Immunoreceptor CD300a on mast cells and dendritic cells regulates neutrophil recruitment in a murine model of sepsis. *International Immunology*, 28(12), pp.611–615. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27836913> [Accessed March 12, 2017].
- Walter, R.B. et al., 2008. ITIM-dependent endocytosis of CD33-related Siglecs: role of intracellular domain, tyrosine phosphorylation, and the tyrosine phosphatases, Shp1 and Shp2. *Journal of leukocyte biology*, 83(1), pp.200–11. Available at:

<http://www.jleukbio.org/cgi/doi/10.1189/jlb.0607388> [Accessed March 20, 2017].

- Weissmann, G. & Korchak, H., 1984. Rheumatoid arthritis. The role of neutrophil activation. *Inflammation*, 8 Suppl, pp.S3-14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6090313> [Accessed March 28, 2017].
- Williams, C. & Hill, S.J., 2009. GPCR Signaling: Understanding the Pathway to Successful Drug Discovery. In pp. 39–50. Available at: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-60327-317-6\\_3](http://link.springer.com/10.1007/978-1-60327-317-6_3) [Accessed April 4, 2017].
- Wong, P.K.K. et al., 2006. Interleukin-6 modulates production of T lymphocyte-derived cytokines in antigen-induced arthritis and drives inflammation-induced osteoclastogenesis. *Arthritis and rheumatism*, 54(1), pp.158–68. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/art.21537> [Accessed March 23, 2017].
- Xu, Y. et al., 2012. Peripheral CD300a+CD8+ T lymphocytes with a distinct cytotoxic molecular signature increase in pregnant women with chronic chorioamnionitis. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)*, 67(3), pp.184–97. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0897.2011.01088.x> [Accessed March 13, 2017].
- Yoshino, S. & Yoshino, J., 1992. Suppression of chronic antigen-induced arthritis in rats by a monoclonal antibody against the T cell receptor alpha beta. *Cellular immunology*, 144(2), pp.382–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1394449> [Accessed March 23, 2017].
- Yu, H. et al., 2014. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nature Publishing Group*, 14. Available at: <https://www.nature.com/nrc/journal/v14/n11/pdf/nrc3818.pdf> [Accessed April 17, 2017].
- Zenarruzabeitia, O. et al., 2015. The Biology and Disease Relevance of CD300a, an Inhibitory Receptor for Phosphatidylserine and Phosphatidylethanolamine. *The Journal of Immunology*, 194(11), pp.5053–5060. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25980030> [Accessed March 13, 2017].