

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Morfologia

Tese de Doutorado

TÍTULO:

**Estudo da resposta inflamatória na artrite
induzida por antígeno e o papel de mediadores
endógenos na sua resolução: importância das espécies
reativas de oxigênio**

Tese apresentada ao colegiado do curso de pós-graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Biologia Celular.

Fernando Lopes

Orientadora:

Vanessa Pinho da Silva - *professora associada do departamento de Morfologia-
ICB/UFMG*

Belo Horizonte – Janeiro de 2013

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Resolução da Resposta Inflamatória, Núcleo de Estudo em Inflamação, do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, contando com apoio financeiro do CNPq e da CAPES

**Dedico este trabalho aos meus pais, à Fernanda, minha esposa, e aos meus
filhos, Pedro e Duda.**

Agradecimentos

- À professora Vanessa Pinho pela chance dada a mim de aprender ciências.
- Ao professor Mauro Teixeira pela organização e direção do Núcleo de Estudo em Inflamação.
- A todos os integrantes do Núcleo de Estudo em Inflamação, que direta e indiretamente contribuíram com esse trabalho.
- Aos integrantes do Laboratório de Resolução da Resposta Inflamatória pelo agradável convívio e amizade.
- Ao William Gonçalves pela grande ajuda na execução dos experimentos.
- Às professoras Landa Sousa e Daniela Sachs pela colaboração e discussões.

Lista de Abreviaturas

AIA	Antigen-induced arthritis
AR	Artrite reumatoide
Bak	Bcl-2 homologous antagonist killer
Bax	BCL2-Associated Protein X
BcL-2	B-Cell Lymphoma-2
BcLxl	B-cell lymphoma-extra large
Bid	BH3 interacting domain death agonist
BSA	Bovin serum albumin
cAMP	Cyclic Adenosine mono phosphate
Caspase	Cysteine-aspartic proteases
CC	Chemokine
CCL1-28	Chemokine ligant 1-28
CD31	Cluster of differentiation 31
CFA	Complete Freud Adjuvant
CX ₃ C	Chemokine (C-X3-C motif)
CX ₃ CL1	Chemokine (C-X3-C motif) ligant 1
CXC	Chemokine (C-X-C motif)
CXCL-1	Chemokine (C-X-C motif) ligant 1
CXCL1-16	Chemokine (C-X-C motif) ligante 1-16
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERK1/2	Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2
HRP	Horseradish Peroxidase
IASP	International Association for the Study of Pain
IκB	Ikappa B
IKK	Ikappa B kinase
IL-1β	Interleucin 1 beta
JNK	Jun N-terminal Kinase
LPS	Lipopolisacarídeo
mBSA	Methilate Bovin Serum Albumin
MMP	Metaloproteinase
MPO	Mioloperoxidase
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen
OVA	Ovalbumin
PDE4	Phosphodiesterase inhibitor-4
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
SAPHO	Synovitis, Acne, Pustulosis, Hyperostosis, Osteitis (syndrome)

SOCS-2	Suppressor Of Cytokine Signaling-2
SOD	Superóxido dismutase
TNFR	Tumoral necrose factor receptor
TNF- α	Tumoral necrose factor alfa
XCL1	Chemokine (C motif) ligand 1
XCL2	Chemokine (C motif) ligand 2

Lista de Figuras

Figura 1. Mecanismo de recrutamento de leucócitos através do endotélio.

Figura 2: Espécies reativas de oxigênio e suas enzimas formadoras

Figura 3: Cinética da resposta inflamatória, de vias de transdução de sinal e de quimiocinas na AIA.

Figura 4: Espécies reativas de oxigênio influenciam na resolução da resposta inflamatória por aumentar a apoptose e inibir vias de transdução de sinal, levando a diminuição de quimiocinas e inibindo a hipernocicepção.

Figura 5. Inibição farmacológica e sequência de ativação das vias de transdução de sinal importantes para a sobrevivência de neutrófilos.

Figura 6. H_2O_2 induz apoptose e inibe vias de transdução de sinal em neutrófilos humanos.

Figura 7: Resolução da resposta inflamatória na AIA não dependente de lipoxinas.

Figura 8. Modelo da resolução da resposta inflamatória induzida por SOD/ H_2O_2 durante a AIA

Sumário

Introdução	12
Inflamação.....	12
Recrutamento de leucócitos	13
Quimiocinas	16
Artrite Reumatóide.....	17
Resolução da resposta inflamatória e apoptose	20
Espécies reativas de oxigênio	24
Vias de sinalização celular e sua relevância para resolução da resposta inflamatória.....	28
Objetivos	30
Objetivo geral:	30
Objetivos específicos I: Estudar resposta inflamatória gerada pela artrite induzida por antígeno	30
Objetivos Específicos II: Estudar o papel de mediadores endógenos, com foco na produção de ROS na resolução da resposta inflamatória	30
Material e Métodos detalhados	32
Animais	32
Drogas e reagentes	32
Modelo de Artrite Induzida por Antígeno	32
1-Procedimento de imunização, desafio com mBSA	32
2-Quantificação de neutrófilos na cavidade articular induzida por mBSA	33
Medida da hipernocicepção: Teste de pressão crescente no joelho de camundongo	33
Atividade da mieloperoxidase.....	34
Contagem total dos leucócitos	35
Contagem diferencial dos leucócitos	35
Dosagem de H ₂ O ₂ por quimioluminescência	36
Técnica histológica	36
Tratamento com SOD, H ₂ O ₂ , Catalase, Z-VAD, SB 203580, UO-126 e LY 294002.....	37
Determinação de quimiocinas e citocinas por ELISA	37
Avaliação da apoptose	37
1-Characterização morfológica da apoptose: Caracterização morfológica foi realizada.....	37
2-Characterização bioquímica da apoptose: Medida do número de células apoptóticas.....	37
Western blot	38
Cultura de neutrófilos humanos	38
Análises estatísticas	39

Resultados	40
Cooperative role of tumour necrosis factor- α , interleukin-1 β and neutrophils in a novel behavioural model that concomitantly demonstrates articular inflammation and hypernociception in mice	41
Resolution of Neutrophilic Inflammation by H ₂ O ₂ in Antigen-Induced Arthritis:	54
Resultados ainda não publicados	65
Cinética da resposta inflamatória, da produção de espécies reativas de oxigênio, de vias de transdução de sinal e de quimiocinas na AIA	65
Espécies reativas de oxigênio influenciam na resolução da resposta inflamatória por inibir vias de transdução de sinal	67
Inibição farmacológica e sequência de ativação das vias de transdução de sinal importantes para a sobrevivência de neutrófilos	69
Resolução da resposta inflamatória da AIA não dependente de lipoxinas	70
H ₂ O ₂ induz apoptose e inibe vias de transdução de sinal em neutrófilos humanos	72
Discussão	75
Conclusão.....	79
Referências:.....	80

Resumo

Durante uma resposta inflamatória existe um importante acúmulo (chegada e permanência no sítio inflamado) de leucócitos, produção de mediadores inflamatórios e, conseqüente, comprometimento da função do órgão envolvido. Os neutrófilos são células efetoras da resposta imune inata e são os mais abundantes leucócitos nas articulações de camundongos com artrite induzida por antígeno. Neste estudo avaliamos as características inflamatórias durante a artrite induzida por antígeno em camundongos e os mecanismos que influenciam a hipernocicepção durante a AIA. Além disso, avaliamos a importância de mediadores endógenos, como ênfase em espécies reativas de oxigênio e vias de sinalização intracelular para a apoptose de neutrófilos e suas relevâncias para a resolução da resposta inflamatória: eliminação de neutrófilos e controle da hipernocicepção. Primeiramente, demonstramos que durante a AIA existe um acúmulo de neutrófilos associado à produção local de TNF- α , IL-1 β e CXCL-1 e hipernocicepção. O próximo passo foi avaliar a importância da resolução da resposta inflamatória para o controle da AIA. Assim, demonstramos que a produção de espécies reativas de oxigênio precede a resolução natural da resposta inflamatória, observado 48 horas após o desafio com antígeno. Além disso, foi observado que em camundongos deficientes em gp91phox ou tratados com catalase ou apocinina apresentam um atraso na resolução da resposta inflamatória. O aumento de espécies reativas de oxigênio, gerado farmacologicamente, adianta a resolução da resposta inflamatória por inibir vias de transdução de sinal, como a PI3K, a ERK1/2 e a P38, como também a ativação de NF-kB, estes ligados a sobrevivência de leucócitos em sítios inflamatórios. O adiantamento no tempo da resolução da resposta inflamatória diminui a produção das quimiocinas CCL1, CCL5 e CXCL1, que contribui para a preservação de estruturas comumente acometidas pela artrite induzida por antígeno, como também a redução da hipernocicepção. A inibição farmacológica dessas vias também foi capaz de adiantar a resolução da resposta inflamatória. Neutrófilos humanos também adiantam a apoptose quando cultivados com H₂O₂, por este inibir vias de sobrevivência celular. A modulação da produção de espécies reativas de oxigênio pode representar uma nova estratégia para controlar a inflamação neutrofílica nas articulações.

Abstract

During inflammatory response there is an important accumulation (arrival and permanence at inflamed site) of leukocytes, production of inflammatory mediators and, consequently, loss of function of involved organ. Neutrophils are effector cells of innate immune response and are the most abundant leukocyte in joints of mice with antigen-induced arthritis. This study evaluated inflammatory characteristics during antigen-induced arthritis in mice and mechanisms that influence hypernociception during AIA. Furthermore, we evaluated the importance of endogenous mediators, such as emphasis on reactive oxygen species and intracellular signaling pathways for apoptosis of neutrophils and their relevance to resolution of inflammatory response: elimination of neutrophils and control hypernociception. First, we demonstrated that during the AIA there is an accumulation of neutrophils associated with local production of TNF- α , IL-1 β and CXCL-1 and hypernociception. The next step was to evaluate the importance of resolution of inflammatory response to control AIA. Thus, we demonstrated that production of reactive oxygen species precedes natural resolution of inflammatory response observed 48 hours after challenge with antigen. Furthermore, it was observed that in mice deficient in gp91^{phox} or treated with apocynin or catalase presented a delay in resolution of inflammatory response. Increased reactive oxygen species generated pharmacologically advancing the resolution of inflammatory response by inhibiting signal transduction pathways such as PI3K, ERK1/2 and p38, as well as activation of NF- κ B, linked to these survival leukocytes into inflammatory sites. Advance of time resolution of inflammatory response decreases production of chemokines CCL1, CCL5 and CXCL1, which contributes to preservation of structures commonly affected by antigen-induced arthritis, as well as reducing hypernociception. Pharmacological inhibition of these pathways was also able to advance the resolution of inflammatory response. Human neutrophil also advances apoptosis when cultured with H₂O₂, by this inhibits cell survival pathways. The modulation of production of reactive oxygen species may represent a new strategy to control neutrophilic inflammation in the joints.

Introdução

Inflamação

A lesão tecidual causada por agentes infecciosos, trauma, cirurgia, queimadura, infarto do tecido e câncer induz uma complexa sequência de eventos coletivamente conhecida como resposta inflamatória (ISOBE e col., 2012). A inflamação elimina o agente nocivo e desencadeia eventos que podem curar e reconstituir o tecido lesado (FIALKOW e col., 2007). O reparo começa logo nas fases iniciais da inflamação, entretanto, só finda quando a influência nociva for neutralizada. Em contrapartida, a resposta inflamatória e o reparo podem se tornar prejudiciais. A inflamação é, por exemplo, a base de várias doenças crônicas como a artrite reumatoide (MISHARIN e col., 2012), a aterosclerose (ELKHAWAD e col., 2012), a asma (MARTIN e col., 2012) e a fibrose pulmonar (JIANG e col., 2012), como também de reações de hipersensibilidade potencialmente fatais a picadas de insetos e toxinas (FYHRQUIST e col., 2012).

A resposta inflamatória apresenta duas reações principais: a vascular e a celular. As reações vasculares e celulares são mediadas por fatores químicos derivados de proteínas ou células plasmáticas que são produzidos ou ativados pelo estímulo inflamatório. Até mesmo as próprias células e tecidos necróticos podem desencadear a formação destes mediadores. A liberação destes mediadores quimiotáticos leva os leucócitos a uma sequência de eventos: a) no lúmen do vaso sanguíneo ocorre a marginalização, rolamento e adesão ao endotélio; b) transmigração através do

endotélio; e c) migração nos tecidos intersticiais em direção ao estímulo quimiotático (LAWRENCE e GILROY, 2007; GRIFFIN e col., 2012; SUBRAMANIAN e col., 2012).

Na maioria das inflamações agudas, os neutrófilos predominam no infiltrado inflamatório nas primeiras 24h. Após este período, o neutrófilo sofre um processo de morte programada conhecida como apoptose e, então, é fagocitado por macrófagos. Dependendo do tipo de resposta inflamatória e do seu tempo de duração outros leucócitos também podem ser encontrados no sítio inflamatório, como os eosinófilo, macrófagos e linfócitos que permanecem até uma semana, até que o agente agressor seja eliminado.

Recrutamento de leucócitos

O recrutamento de leucócitos durante a resposta inflamatória envolve três fundamentais etapas: captura e rolamento das células, adesão firme e transmigração. Essas etapas dependem de moléculas de adesão presentes no leucócito e no endotélio, que se encaixam de maneira complementar. A produção de fatores quimiotáticos como, por exemplo, as quimiocinas, também contribuem para o processo de recrutamento (SALMI e JALKANEN, 2012; CHEN e col., 2012).

Assim, o recrutamento de leucócitos para um sítio inflamatório obedece aos seguintes passos:

- Captura e rolamento: primeiramente, ocorre uma interação "frouxa" entre os leucócitos e as células endoteliais. Essa fase pode ser dividida em duas etapas:

captura (“*tethering*”) e rolamento (“*rolling*”) e é mediada pelas selectinas (P, E e L) e os ligantes de selectinas, proteínas que contêm carboidratos. Essa primeira etapa aproxima os leucócitos das células endoteliais e, conseqüentemente, dos eventos que estão ocorrendo no tecido. Uma vez rolando sobre as células endoteliais, os leucócitos podem ser ativados por agentes quimiotáticos.

- Ativação por fatores quimiotáticos: Os agentes quimiotáticos agem em receptores com sete domínios transmembrana (serpentinóides) acoplados à proteína G. Essa ativação leva ao aumento do número e, principalmente, da afinidade de integrinas expressas na superfície do leucócito com moléculas do endotélio.

- Adesão firme: A firme adesão e a posterior transmigração dos leucócitos são mediadas por integrinas. As integrinas são glicoproteínas heterodiméricas, aderentes, transmembrana, constituídas de cadeias α e β . As integrinas, então, se ligam a moléculas da família das imunoglobulinas expressas nas células endoteliais. Essa ligação permite firme adesão entre o leucócito e o endotélio.

- Transmigração: O processo de transmigração pela célula endotelial poderá, então, ocorrer e depende de interações moleculares semelhantes àquelas necessárias à firme adesão, em adição à participação do PECAM-1 (CD31).

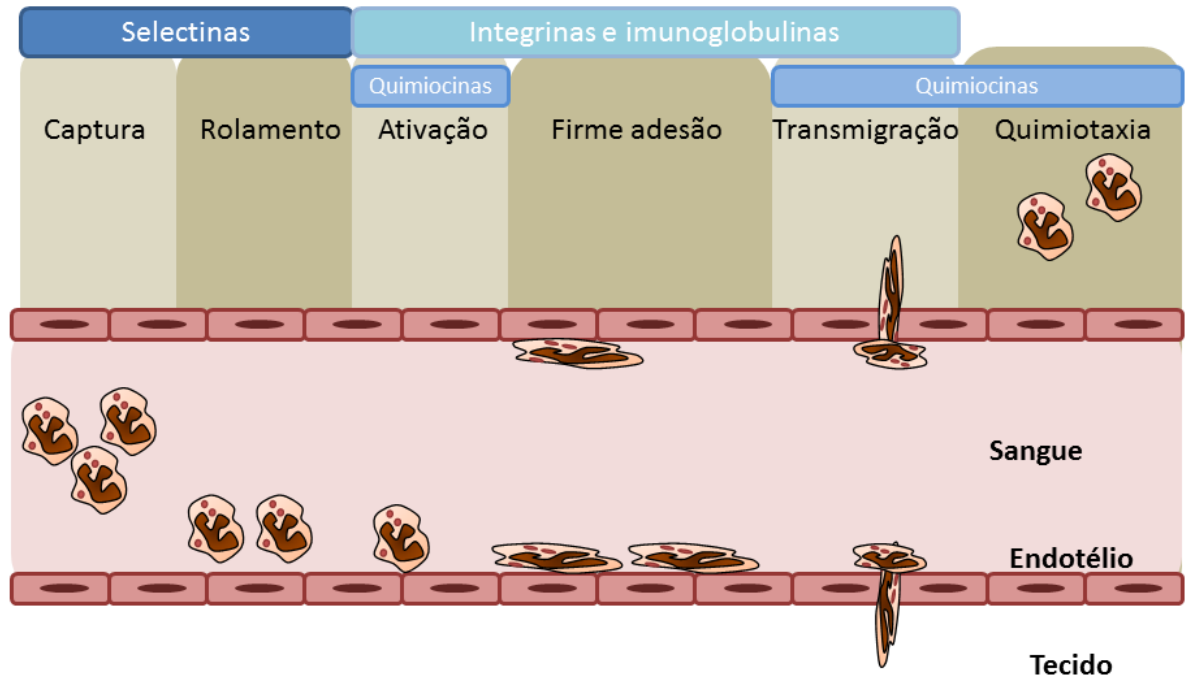


Figura 1. Mecanismo de recrutamento de leucócitos através do endotélio. As etapas do recrutamento de leucócitos envolvem a captura e o rolamento, dependente de selectinas; da ativação e firme adesão, dependente de integrinas e imunoglobulinas; e a transmigração, dependente de quimiocinas.

Os diversos leucócitos, como os neutrófilos, monócitos, eosinófilos e linfócitos, utilizam moléculas distintas, entretanto, superpostas para o processo de recrutamento. Isso explica, em parte, a seletividade por certos tipos celulares em determinadas respostas inflamatórias. Este modelo de recrutamento também é válido para a migração de diferentes leucócitos para os órgãos linfóides, contribuindo para a homeostase do sistema imunológico (SALLUSTO e MACKAY, 2004).

Após a transmigração pelo endotélio, os leucócitos migram através do tecido em direção ao tecido inflamado por um mecanismo orientado pelo gradiente quimiotático. Substâncias exógenas e endógenas podem exercer esse papel quimiotático para os diversos leucócitos. Agentes exógenos podem ser moléculas derivadas de bactérias. Já os mediadores endógenos envolvem componentes do sistema complemento, produtos da via da lipoxigenase, citocinas e quimiocinas (SCHULTE e cols., 2011).

Quimiocinas

As quimiocinas são proteínas com atividade quimioatrativa e peso molecular variando de 8 a 12 KDa. São produzidas por várias células, incluindo: células endoteliais (NAKANO e cols., 2012), células epiteliais (OH e col., 2012), fibroblastos (WOLF e cols., 2012), monócitos/macrófagos (FANG e cols., 2012), células dendríticas (HOLL e cols., 2012), células T (OWEN e cols., 2011) e eosinófilos (ROSE e cols., 2010).

Quimiocinas são caracterizadas pela presença de quatro resíduos de cisteína conservados na porção amino-terminal. Na presença ou ausência de aminoácidos entre as duas primeiras cisteínas, são classificadas como CC (CCL1-28), CXC (CXCL1-16), CX₃C (CX₃CL1/ *fractalkine*) e, ainda, existe a quimiocina C que possui somente uma cisteína na porção N-terminal (XCL1 e XCL2/ *lymphotactin-alpha* e *lymphotactin-beta*, respectivamente) (GUERREIRO e COL., 2011).

Tais proteínas contribuem para resposta inflamatória dada sua capacidade de induzir recrutamento e ativar populações de leucócitos, induzindo degranulação e levando à liberação de mediadores inflamatórios de células efectoras tais como basófilos, mastócitos, neutrófilos e eosinófilos. Entretanto, essas moléculas também podem exercer um papel na homeostase do sistema imune. Algumas delas dirigem o recrutamento de células para os tecidos linfóides (SALLUSTO e MACKAY, 2004). Contudo, o estudo das quimiocinas nos últimos anos tem contribuído para o entendimento do seu papel nas diversas doenças inflamatórias, na hematopoiese, na angiogênese, na geração de metástases, na rejeição de tumores, na diferenciação de células T e na infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (JOHNSON e cols., 2004). Assim, as quimiocinas são fatores essenciais para a migração celular, atuando sobre receptores com sete domínios transmembrana associados à proteína G, levando à ativação de cascatas de sinalização intracelular (GUERREIRO e COL., 2011).

Artrite Reumatóide

A artrite reumatóide (AR) afeta aproximadamente 1% da população adulta do mundo, sendo uma doença auto-imune comum que acomete com maior frequência as mulheres (FELSON, 2008). O gasto anual com o seu tratamento é de aproximadamente \$16 bilhões, incluindo as despesas sócias econômicas diretas, como custo com despesas médicas, e custos indiretos, como a queda de produtividade e redução da qualidade de vida do paciente (DUNLOP e col., 2003).

A intensa inflamação articular, com destruição da cartilagem e do osso, edema, dor e impossibilidade ou dificuldade em executar atividades habituais caracteriza a artrite reumatóide (Lesuis e col., 2012).

O sítio inicial da inflamação articular é a membrana sinovial, que normalmente secreta o líquido sinovial que reduz o atrito e nutre a cartilagem articular. A cápsula articular consiste de duas camadas: uma externa de tecido conjuntivo denso com vasos sanguíneos e nervos, e uma camada interna chamada de membrana sinovial. A superfície interna da membrana sinovial é revestida por uma ou duas camadas de células sinoviais: as células sinoviais tipo A semelhantes aos macrófagos e as células sinoviais tipo B semelhantes aos fibroblastos. Os sinoviócitos semelhantes a macrófagos normalmente fagocitam debris no líquido sinovial e são capazes de secretar citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- α . Os sinoviócitos semelhantes a fibroblastos que fisiologicamente formam o ácido hialurônico,

sintetizam as metaloproteinases (MMP) e prostaglandinas E2 quando estimulados pelo TNF- α e IL-1 (SAKAGUCHI e SAKAGUCHI, 2005). Deste modo, na artrite os sinoviócitos proliferam exacerbadamente, invadindo e gerando erosão na cartilagem e no osso, alterando o balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias e, conseqüentemente, levando a perpetuação dos mecanismos da AR.

Estudos em modelos experimentais resultam em um melhor entendimento do papel de diferentes tipos celulares e mediadores inflamatórios envolvidos no desenvolvimento da artrite. Pesquisas têm demonstrado que dentre os diferentes tipos celulares, os neutrófilos se destacam, pois regulam e orquestram a resposta inflamatória aguda e participam também da inflamação crônica (KASAMA e col., 2005). O envolvimento dos neutrófilos na patogênese da artrite reumatóide tem sido demonstrado utilizando-se diferentes modelos experimentais. Foi descoberto que camundongos K/BxN desenvolvem artrite espontaneamente, sendo estes animais provenientes do cruzamento de animais NOD com animais KRN. A transferência de soro de animais K/BxN que contém os auto-anticorpos para animais C57/Bl6, também induz uma reação inflamatória específica mimetizando o modelo animal K/BxN, indicando que a transferência destes auto-anticorpos é suficiente para induzir inflamação na articulação (KOUSKOFF, 1996). Utilizando-se este modelo, demonstrou-se que animais depletados de neutrófilos são resistentes aos efeitos inflamatórios do soro artritogênico de animais K/BxN. Interessantemente, a depleção dos neutrófilos cinco dias após a transferência do soro reverteu a reação

inflamatória das articulações. Estes resultados demonstram o papel fundamental dos neutrófilos na iniciação e manutenção do processo inflamatório nas articulações.

O acúmulo de produtos potencialmente tóxicos, como serino proteases, colagenase, espécies reativas de oxigênio e fibronectina no líquido sinovial ocorrem devido a processos de ativação de neutrófilos *in situ*. A presença deste tipo celular tem sido associada aos principais danos articulares observados na artrite reumatóide (ELLIOTT e col., 2011). Sendo assim, o modelo de artrite se torna um modelo ideal para se estudar o recrutamento de neutrófilos, a resolução da resposta inflamatória e a participação de diferentes moléculas nestes processos.

Outro importante ponto citado acima é a intensa dor articular gerada na AR. Como resultado de lesão tecidual e reatividade imune anormal ou lesão neural, a dor está frequentemente relacionada a processos inflamatórios (STEIN e col. 2003). Tais processos geram a sensibilização de nociceptores aferentes primários, que é caracterizada pela diminuição do limiar de excitabilidade necessário para ativá-lo, pelo aumento da atividade espontânea da célula nervosa e pelo aumento na frequência de disparo em resposta a estímulos supralimiais (COSTIGAN e col., 2009). A consequência de tais alterações leva a dois fenômenos clínicos relevantes, a hiperalgesia, caracterizada pela resposta exacerbada a estímulos dolorosos, e alodínia, que é o surgimento da dor em resposta a um estímulo normalmente inócuo (LOESER e TREEDE, 2008), melhor descrito como hipernocicepção em modelos animais (OLIVEIRA e col., 2011). Existem diversos mediadores químicos finais da

hipernocicepção inflamatória que podem ativar diretamente e/ou indiretamente os nociceptores. Entretanto, o estímulo inflamatório normalmente não libera estes mediadores diretamente, mas são precedidas por outros mediadores como as citocinas (CUNHA e col., 2005; VERRI e col., 2006). Assim sendo, células residentes (principalmente macrófagos, mastócitos e células dendríticas) e células infiltradas liberam diversos mediadores inflamatórios, como as citocinas, que desempenham papel essencial para o desenvolvimento da hipernocicepção inflamatória.

Citocinas como o TNF- α e IL-1 β estão também diretamente implicada em muitos dos processos imunes que estão associados com a patogênese de artrite reumatóide. Com efeito, o tratamento com anticorpos anti-TNF ou TNFR solúvel provou ser um importante desenvolvimento no tratamento de doentes com artrite reumatoide (SCOTT e KINGSLEY, 2006). Um problema associado ao tratamento baseado em citocinas é a de que estes são caros e precisam de ser administradas por via parentérica. Além disso, muitos pacientes não respondem a qualquer bloqueio de TNF- α (KEKOW e col., 2012). Assim, novas opções terapêuticas para o tratamento da AR são claramente necessários, bem como os modelos para investigar a inflamação articular e dor concomitantemente.

Resolução da resposta inflamatória e apoptose

Durante a resolução do processo inflamatório, uma série de eventos pode contribuir para a eliminação da resposta inflamatória. A vasodilatação e formação de edema contribuem para a redução das concentrações efetivas do estímulo inflamatório. Os

leucócitos recrutados eliminam o agente efetor, os mediadores inflamatórios são desativados espontaneamente ou enzimaticamente, moléculas com função inibitória são produzidas e as células efectoras são eliminadas do tecido (sendo este, o principal mecanismo do processo de resolução inflamatória). A eliminação de células inflamatórias do tecido lesado é um dos principais focos de pesquisa atualmente. As células inflamatórias podem ser eliminadas por recirculação sistêmica, drenagem linfática ou, principalmente, por morte celular (GILROY e col., 2004). Dois tipos fundamentais de morte celular têm sido descritos atualmente: a necrose e a apoptose seguido de fagocitose que são definidas de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas.

O termo apoptose foi utilizado pela primeira vez por KERR e colaboradores (1972) no início dos anos 70 para definir outro tipo de morte celular que se diferenciaria da necrose. A apoptose, também conhecida como morte programada de células, é definida como forma programada ou fisiológica de morte celular por um mecanismo altamente controlado que não induz inflamação e possui morfologia característica. Durante a apoptose, a célula sofre encolhimento, retenção de organelas, condensação da cromatina e fragmentação nuclear. Em algumas linhagens celulares, ocorre a formação dos corpos apoptóticos (SAVILL e col., 2002).

A apoptose é um importante contraponto fisiológico à mitose na regulação do número de células em processos como a reprodução, embriogenese e desenvolvimento, na renovação celular homeostática do indivíduo adulto e na eliminação de células

danificadas (ELMORE, 2007). A apoptose é descrita desde organismos multicelulares primitivos até os vertebrados, mas também foi identificado mecanismos semelhantes à apoptose em organismos unicelulares (Alberts e col., 2002).

A apoptose é um processo ativo que pode ser desencadeado por uma série de estímulos, extra e intracelulares, controlados por uma série específica de genes específicos que podem participar de cinco passos sequenciais e distintos: (1) a decisão da célula em morrer ou viver, (2) a ativação dos mecanismos de morte celular, (3) a execução do processo de morte, (4) a fagocitose da célula apoptótica e (5) a degradação da célula apoptótica (ELMORE, 2007).

Nos mamíferos, a apoptose pode ser desencadeado por duas grandes vias: (1) via de receptor de morte, ou via extrínseca; e (2) via mitocondrial, ou via intrínseca (RUBIO-MOSCARDO e col., 2005; EKERT e VAUX, 2005).

Os receptores de morte estão localizados na superfície celular com domínio extracelular rico em cisteína e pertencentes a família TNF (MELET e col., 2008). Tais receptores transmitem sinais de morte desencadeados por ligantes específicos.

Genes envolvidos na apoptose, tanto como anti ou proapoptóticos, vem sendo estudados. A via mitocondrial é controlada pela família Bcl-2 (B-cell lymphoma protein 2) (ROLLAND e CONRADT, 2010). A eficácia dessas proteínas no controle da apoptose é proporcional a sua expressão.

Foram identificadas mais de doze proteínas da família Bcl-2. São divididas, em relação a sua função e semelhança de sequência de aminoácidos em três subfamílias. A subfamília anti-apoptose é representada por Bcl-2/Bclxl, que inibe a apoptose por prevenir a liberação de proteínas mitocondriais das duas famílias pro-apoptóticas representadas por Bax/Bak (Bcl-2 associated protein X) e Bid/Bim (FRENZEL e col., 2009).

Praticamente todos os estímulos apoptóticos são desencadeados por caspases (cystenil aspartat específico protease), grupo de enzimas proteolíticas sintetizadas como proenzimas inativas. As caspases dos mamíferos são divididas em duas subfamílias. A primeira ligada ao desencadeamento de apoptose (caspases 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10 e 12), e a segunda ligada ao processamento de citocinas (caspases 1, 4, 5 e 11) (RAI e col., 2005).

As caspases envolvidas na apoptose podem ser subdivididas em iniciadoras e efetoras, de acordo com o tamanho de seu domínio. Caspases longas (2, 8, 9 e 10) atuam como iniciadoras, e caspases curtas (3, 6 e 7) atuam como efetoras (RAI e col., 2005). O controle da cascata de caspases é fundamental em vários processos homeostáticos e de diferenciação celular, com isso, o controle da atividade de caspases apresenta potencial terapêutico.

A morte celular por apoptose exerce um papel fundamental na maioria dos processos biológicos e a desregulação desse mecanismo é um importante fator na patogênese e progressão de inúmeras doenças (ELMORE, 2007). Excessiva morte celular por apoptose ou falta de apoptose está associada ao desenvolvimento de doenças. Assim, como por um lado a morte acelerada de células está associada a muitas doenças autoimunes, a reduzida capacidade de sofrer apoptose é uma característica básica de muitos tumores e doenças inflamatórias. Durante doenças inflamatórias como a artrite, a dermatite atópica, a asma, ocorre uma redução ou atraso da apoptose (GILROY e col., 2004).

A resolução é imperativa para que haja uma resposta adequada do hospedeiro, para proteção tecidual e para um retorno à homeostase (SCHWAB, e col., 2007; SERHAN e SAVILL, 2005; GILROY e col., 2004)

Espécies reativas de oxigênio

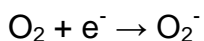
Espécies reativas de oxigênio são moléculas que possuem em sua órbita externa um elétron livre. As principais espécies reativas de oxigênio são: o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio, e o peróxido de nitrito, que por alguns autores é considerado uma espécie reativa de azoto. Essas moléculas possuem instabilidade elétrica muito grande, e por isso, mesmo tendo meia vida muito curta, apresentam grande capacidade reativa, o que pode acontecer com qualquer composto que esteja próximo, a fim de captar um elétron desse composto, ou liberar um elétron para esse composto para sua estabilização. As espécies reativas de oxigênio produzidas por macrófagos e

neutrófilos exercem uma função microbiana contra fungos e bactérias, por gerarem peroxidação lipídica e danos ao DNA destes microrganismos. Participam também da ativação celular em sítios inflamatório, levando a liberação de citocinas e quimiocinas e aumentando a expressão de moléculas da adesão (ARAZNA e col., 2013).

Em condições normais por volta de 95 a 98% do oxigênio absorvido pelos organismos aeróbicos é reduzido, formando água na cadeia respiratória através do transporte de elétrons na mitocôndria, bem como no retículo endoplasmático, onde o sistema enzimático citocromo, no processo de fosforilação oxidativa, procede a redução tetravalente do O₂ pelo sistema citocromo oxidase, fornecendo simultaneamente 4 elétrons para o oxigênio, que se reduz diretamente à água:



As fontes que cedem os cátions de hidrogênio e os elétrons para a reação são, basicamente, o NADH, o FADH e a ubiquinona ou coenzima Q (DE LUCA e col., 2005). Todavia, 2 a 5% do O₂ são reduzidos univalentemente, processo em que uma molécula recebe apenas um elétron, o qual ocupa um dos orbitais externos, ao mesmo tempo em que o outro continua não parelhado, produzindo intermediários altamente reativos, denominados espécies reativas de oxigênio. Forma-se então a primeira espécie tóxica reativa de oxigênio, o superóxido, conforme esquema:



Em condições inflamatórias, entretanto, a produção de superóxido é aumentada, pois este desenvolve um importante papel na resposta imune de mamíferos. O superóxido tem ação antimicrobiana e facilita a morte de microorganismos invasores, pois através de oxidação lipídica a membrana plasmática é degradada (GUERRA e col., 2007).

A partir do superóxido, e sob a ação de algumas enzimas, são geradas outras espécies reativas, como observado na figura 2. Em sítios inflamatórios são formadas espécies reativas de oxigênio, pois, como dito acima, estas têm a capacidade de ativar leucócitos e possuem propriedades microbicidas, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é formado pelo superóxido através da ação da enzima superóxido dismutase (SOD).

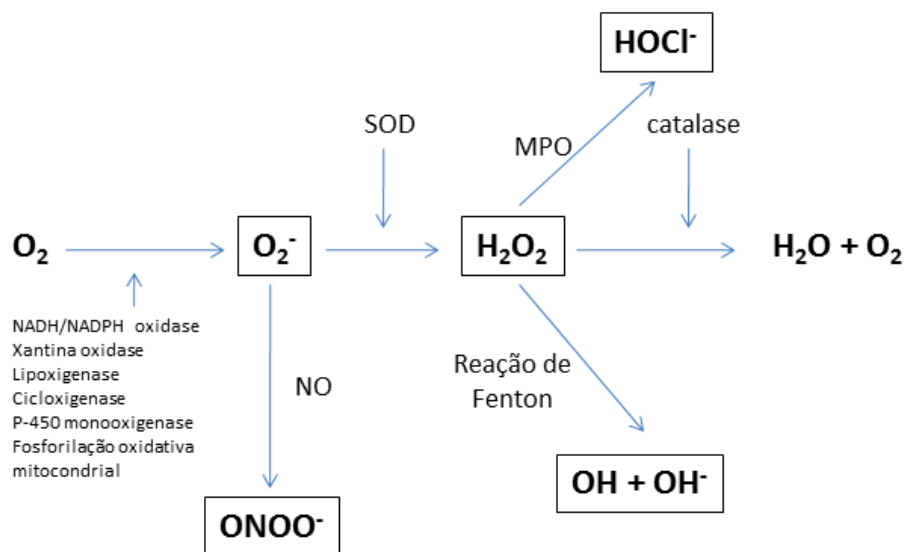


Figura 2: Espécies reativas de oxigênio e suas enzimas formadoras

Como citado acima, a eliminação de neutrófilos de um tecido inflamado é crucial para resolução da resposta inflamatória. Assim, podemos ressaltar trabalhos que reforçam a idéia de que espécies reativas de oxigênio podem ter um papel importante no controle

do acúmulo de leucócitos durante uma resposta inflamatória. Neutrófilos de pacientes com a síndrome autoinflamatória SAPHO (sigla de: *synovitis, acne, pustulosis, hyperostosis and osteitis*) tem um defeito específico na produção de espécies reativas de oxigênio, indicando que a diminuída produção dessas moléculas está envolvida no desenvolvimento e manutenção dessa doença inflamatória (FERGUNSON e col., 2008). De forma interessante, em pacientes com síndrome de Down nos quais o gene para SOD é superexpresso, e conseqüentemente devem apresentar maior produção de H_2O_2 , a apoptose de neutrófilos, espontânea bem como aquela induzida por anticorpos anti-Fas é acelerada tornando esses pacientes mais susceptíveis a doenças infecciosas, por exemplo, as bacterianas (YASUI e col., 2005). O peróxido de hidrogênio parece ser o principal mediador da apoptose de neutrófilos (YASUI e col., 2005). Além disso, os pacientes com doença granulomatosa crônica, caracterizada por um defeito genético na produção de superóxido e conseqüentemente de peróxido de hidrogênio, apresentam diminuída capacidade de resolução de resposta inflamatória (YASUI, e col., 2006). De fato já foi demonstrado que a SOD adicionada exogenamente em uma cultura de neutrófilos induz a apoptose dessas células (SULUWSKA, e col., 2005). Além dos dados acima, experimentos utilizando camundongos transgênicos que apresentam uma alta produção de SOD demonstraram uma redução no número de neutrófilos em fluídos de lavados brônquio-alveolares após administração intratraqueal de partículas poluentes (YASUI, e col., 2005).

Vias de sinalização celular e sua relevância para resolução da resposta inflamatória

A apoptose pode ser induzida por receptores de morte encontrados na membrana celular (LIN e col., 2012), como também induzida pela interrupção de vias de sinalização relacionada à sobrevivência. A ativação dessas vias de sinalização induz a produção de vários mediadores e previne a apoptose. Sob a maioria das condições, os neutrófilos serão expostos a ambos os fatores pró e anti-apoptóticos. O efeito resultante sobre a morte de neutrófilos e sobrevivência reflete um equilíbrio entre as atividades de tais fatores. A morte de neutrófilos está associada com a regulação positiva de sinalização da morte e a regulação negativa da sinalização de sobrevivência. A via da PI3k tem sido mostrada importante para a sobrevivência de vários tipos celulares (SONG e col., 2005). Foi demonstrada que tal via é importante para a sobrevivência de células da tireóide e hepatócitos (CULLEN e col., 2004), como também eosinófilos *in vivo* (PINHO e col., 2005). Drogas que inibem a fosforilação de AKT podem contribuir para a resolução da resposta inflamatória. Em nosso grupo de pesquisa descrevemos a influência do inibidor PDE4 (rolipram) na resolução da pleurisia induzida por LPS (SOUSA e col., 2010). A inibição da fosforilação de AKT gerada por Rolipram diminuiu o número de neutrófilos na cavidade pleural aumentando o número de neutrófilos apoptóticos induzidos por ativação de capase. Mostramos, também, que além do Rolipram outras drogas inibem a ativação de AKT e resolvem a inflamação eosinofílica induzida na pleura por OVA. Forskolin, um mimético da adenilato ciclase, que aumenta os níveis intracelulares de cAMP também inibiu a

fosforilação de AKT. Como consequência, observamos o aumento da apoptose (SOUSA e col, 2009). A inibição da fosforilação de ERK1/2 também induz apoptose em miócitos (ZHANG e col., 2011). Algumas infecções virais podem ativar a fosforilação de MAP quinases, como ERK1/2, JNK e p38, inibindo a apoptose das células infectadas promovendo a replicação viral (LIU e col., 2012).

O fator de transcrição NF- κ B é um regulador chave de várias funções celulares, incluindo a ativação e sobrevivência de leucócitos (WARD e col., 2004; DUTTA e col., 2006). Os efeitos de sobrevivência de muitas vias pode ser mediada por NF- κ B. Um exemplo é que AKT ativada pode fosforilar I κ B quinase (IKK) levando à ativação de NF- κ B (NAIR e col., 2006).

Objetivos

Objetivo geral:

Assim, o objetivo geral desta tese de doutorado foi **estudar a resposta inflamatória gerada pela artrite induzida por antígeno, bem como os mediadores endógenos importantes para sua resolução, com enfoque na formação de espécies reativas de oxigênio.**

Objetivos específicos I: Estudar resposta inflamatória gerada pela artrite induzida por antígeno

1. Verificar a cinética da hipernocicepção induzida pela AIA.
2. Verificar o efeito da morfina na hipernocicepção induzida pela AIA.
3. Avaliar o infiltrado inflamatório e as estruturas articulares após a indução da AIA.
4. Verificar a produção de TNF- α , IL-1 β e CXCL1 após a indução da AIA.
5. Verificar o efeito do tratamento com anti-TNF- α , IL-1ra e dexametasona na inflamação e na hipernocicepção na AIA.
6. Verificar o papel de neutrófilos no mecanismo de dor articular e produção de citocinas na AIA.

Objetivos Específicos II: Estudar o papel de mediadores endógenos, com foco na produção de ROS na resolução da resposta inflamatória

1. Verificar a cinética e o papel da produção de H₂O₂ na resolução natural, bem como a resolução da resposta inflamatória induzida pela administração de H₂O₂ na AIA.

2. Verificar se a resolução da resposta inflamatória da AIA induzida por H_2O_2 é promovida por apoptose de neutrófilos.
3. Verificar se a indução da apoptose de neutrófilos por H_2O_2 é dependente da inibição de vias de transdução de sinal.
4. Verificar a cinética e o papel da ativação das vias de transdução de sinal PI3K, ERK1/2 e P38 na AIA
5. Verificar se a administração de H_2O_2 é capaz de inibir a hipernocicepção na AIA.
6. Verificar se a resolução da resposta inflamatória induzida por H_2O_2 é dependente da produção de lipoxinas.
7. Estudar de apoptose de neutrófilos humanos por H_2O_2 *in vitro*.

Material e Métodos detalhados

Animais

Neste estudo usamos camundongos C57Bl/6 obtidos no Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO-ICB UFMG). Os camundongos gp91^{phox-/-} foram adquiridos no biotério mantido pelo nosso grupo de pesquisa (Laboratório de Imunofarmacologia) Todos os procedimentos experimentais foram avaliados pelo Comitê de Ética da UFMG.

Drogas e reagentes

Superóxido Dismutase de Eritrócito Bovino (SOD), Catalase, H₂O₂, UO126, SB 203580, LY 294002, Adjuvante Completo de Freud (CFA), Albumina de Soro Bovino Metilada (mBSA), Albumina de Soro Bovino (BSA), Z-VAD-fmk, um inibidor de caspases e LPS foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO). Anexina-V e os anticorpos para Western blotting foram adquiridos da Cell Signaling (Beverly MA, USA).

Modelo de Artrite Induzida por Antígeno

1-Procedimento de imunização, desafio com mBSA

Camundongos C57BL/6 ou gp91^{phox-/-} foram imunizados, através de injeção intradérmica, com uma emulsão contendo 100µL de volumes iguais de PBS e adjuvante completo de Freud (CFA), na qual foi dissolvida 500µg de mBSA. No 14º dia, os animais imunizados foram desafiados com mBSA (10 µg/cavidade) através de injeção intra-articular (articulação fêmur-tibial).

2-Quantificação de neutrófilos na cavidade articular induzida por mBSA

Para quantificação de neutrófilos, os camundongos foram sacrificados 24 horas após o desafio com o mBSA e foi realizado em lavado intra-articular (2 vezes) com 5µL de Albumina da Soro Bovino (BSA) 3% diluído em PBS. Este lavado foi diluído em 90µL deBSA e a partir deste, realizadas as contagens total e diferencial dos leucócitos. Os tratamentos foram realizados de acordo com o estabelecimento do pico de acúmulo de células na cavidade intra-articular.

Medida da hipernocicepção: Teste de pressão crescente no joelho de camundongo

Os experimentos foram realizados utilizando o teste de pressão com um anesthesiômetro eletrônico (Modelo 1601C, Life Science Instruments Califórnia, EUA), que consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expressa em gramas (g). A precisão do aparelho é de 0,1 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 ao joelho foi realizado através de uma ponteira descartável de polipropileno com 0.5 mm de diâmetro adaptada a esse. Os animais foram colocados em caixas de acrílico, medindo 12x20x17 cm cujo assoalho é uma rede de malha igual a 5 mm² constituída de arame não maleável de 1 mm de espessura, durante 15 minutos antes do experimento para adaptação ao ambiente. Espelhos foram posicionados 25 cm abaixo das caixas de experimentação para facilitar a visualização das plantas das patas dos animais. O experimentador aplicou, por entre as malhas da rede, uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do camundongo até que o animal produzisse uma resposta caracterizada como sacudida

("flinch") da pata estimulada. Os estímulos foram 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 como a variação na pressão (Δ de reação em gramas) obtida subtraindo-se a média de três valores expressos em gramas (força) observada antes do procedimento experimental (0 hora) da média de três valores em gramas (força) após a administração dos estímulos que variam de acordo com o experimento. Os testes nociceptivos foram realizados entre 08:00 e 16:00 h. Todos os experimentos seguiram as normas e éticas estabelecidas para experimentação com animais conscientes, recomendadas pelo IASP (International Association for the Study of Pain) (ZIMMERMANN, 1983).

Atividade da mieloperoxidase

Para avaliar o acúmulo de neutrófilos no joelho, foi também utilizado o método de quantificação da atividade de mieloperoxidase como descrito previamente (Matos e cols., 1999). Brevemente, um fragmento do joelho foi pesado e picado, suspenso a 5% em salina EDTA, submetido à homogeneização e centrifugação (3000 g, 10 minutos). O sobrenadante foi desprezado e o componente residual (pellet) ressuspensionado em 1,5 mL de NaCl 0.2% gelado e 1,5 mL de NaCl 1.6% com glicose 5% gelada para cada 100 mg de tecido. Realizou-se nova centrifugação 3000 g por 10 minutos. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em tampão fosfato com HTAB a 5% e 15 re-homogenizado por 30 segundos. As amostras foram congeladas e descongeladas seguidamente (3 vezes) em nitrogênio líquido, submetidas novamente a centrifugação e os sobrenadantes coletados para ensaio de MPO. Atividade de

mieloperoxidase (MPO) das amostras foi determinada através de leitor de ELISA (450 nm) usando tetramethylbenzine (1.6 mM) e H₂O₂ (0.5 mM). Os resultados foram expressos como número relativo de neutrófilos.

Contagem total dos leucócitos

Alíquotas de 10µL do lavado articular foram diluídas em líquido de Turk, na proporção de 1:2, sendo que a contagem total dos leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio óptico (aumento de 40x) e contador manual. Os resultados foram expressos como número de células x 10⁵ /cavidade.

Contagem diferencial dos leucócitos

As lâminas para contagem diferencial foram preparadas por citocentrifugação de uma alíquota dos lavados (citospin; ShandonLipshaw Inc., Pittsburgh, Pennsylvania, USA). As células foram examinadas em microscópio óptico através da objetiva de imersão em óleo (aumento de 100x), sendo contadas 100 células por lâmina diferenciando-se 3 tipos celulares, neutrófilos, eosinófilos e monucleares. A quantificação de cada tipo celular presente na cavidade articular foi calculada pela percentagem dessas células contadas nas lâminas e pela quantidade de células totais obtidas na contagem total. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos x 10⁴ /cavidade.

Dosagem de H₂O₂ por quimioluminescência

O métodos utilizados para dosagem de H₂O₂ foi o de quimioluminescência do luminol em presença de peroxidase (HRP)-peróxido de hidrogênio (Tarpey & Fridovich, 2001). Após o lavado articular (como descrito anteriormente, as amostras foram colocadas em tubos de poliestireno (1 ml) e colocadas em luminômetro (BIO-orbit, 1250) para confecção da leitura zero. Foi colocado então o luminol 100 µM e feito novo registro. A reação foi iniciada pela adição de horse radish-peroxidase (HRP, 6U/ml). Foram realizados registros em um intervalo de 10 minutos e os dados expressos como médias das áreas sob as curvas. A funcionalidade do método foi confirmada pela utilização de um padrão de peróxido de hidrogênio 0,5mM.

Técnica histológica

A região da articulação fêmur-tibial foi isolada e imersa em formol tamponado a 10%, para fixação durante 24 horas. Em seguida os tecidos provenientes da articulação fêmur-tibial foram descalcificados em EDTA (20%) por aproximadamente 72 horas. Esses tecidos foram desidratados e incluídos em blocos de parafina. Cortes de 6 µm de espessura foram dispostos em lâminas de microscopia. As lâminas foram coradas segundo a técnica de coloração de hematoxilina e eosina.

Tratamento com SOD, H₂O₂, Catalase, Z-VAD, SB 203580, UO-126 e LY 294002

Os camundongos foram tratados com SOD (0,3 mg/kg), H₂O₂(0,5mM), Catalase (1,2 mg/kg), Z-VAD (1,0 mg/kg), SB 203580 (1,0 mg/kg), UO-126 (3,0 mg/kg) e LY 294002(10 µg/cavidade), BOC-1 (1 mg/kg) ou veículo localmente (intra-articular) após (esses tempos foram determinados após realização de experimentos) a indução da resposta inflamatória.

Determinação de quimiocinas e citocinas por ELISA

Os kits para ELISA de camundongo foram obtidos da R&D Systems (DuoSet) e utilizados de acordo com os procedimentos previamente descritos pelo fabricante.

Avaliação da apoptose

1-Characterização morfológica da apoptose: Caracterização morfológica foi realizada como rotineiramente realizado no laboratório (PINHO et. al, 2005). Brevemente, células recuperadas após o estímulo inflamatório e tratados ou não foram citocentrifugadas, fixadas e coradas com May-Grunwald-Giemsa e contadas usando microscópio para determinar a proporção de células com morfologia apoptótica.

2-Characterização bioquímica da apoptose: Medida do número de células apoptóticas foi feita, também, através de citometria de fluxo (usando BectonDickensonFACScan e CELL quest software) utilizando marcação com anexina-V-FITC que liga-se a fosfatidilserina exposta na superfície das células apoptóticas e com iodeto de propídio

como uma forma de excluir da amostra células que tenham perdido a integridade de membrana.

Western blot

Células (5×10^6 células/ml) recuperadas da cavidade articular de camundongos foram lisadas utilizando solução de lise específica. O lisado foi, então, incubado por 12h com anticorpos específicos. O conteúdo foi analisado por Western blotting.

Cultura de neutrófilos humanos

Neutrófilos humanos foram isolados do sangue periférico de indivíduos normais por gradiente de densidade usando Histopaque 1077/1119 (ENGLISH e ANDERSEN, 1974), logo após coleta com o ácido tileno diamino tetracético dipotássico (EDTA-K2). Os neutrófilos foram separados do sangue total logo após a coleta; após o procedimento de separação de células foi realizada fixação das células por citocentrifugação para confirmar a pureza da suspensão celular (aproximadamente 95%) e foi realizada a contagem de leucócitos em câmara de Neubauer. Os neutrófilos foram, então, cultivados em meio RPMI incompleto, com ou sem H_2O_2 nas concentrações de 0,01; 0,1 e 1,0 mM, por 6 horas para avaliação da apoptose, e por 20, 40 e 60 minutos para avaliação da fosforilação de vias de sobrevivência celular.

Análises estatísticas

Os dados foram apresentados com média + SE. A análise da diferença entre dois ou mais grupos foi realizada, respectivamente, pelo teste t-student e ANOVA seguida do pós-teste Student-Newman-Keuls. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$.

Resultados

Este capítulo é composto por artigos publicados e de resultados ainda não publicados, contendo os resultados dos objetivos propostos nesta tese. Sendo assim, cada artigo apresentado aborda um ângulo da questão aqui tratada.

Cooperative role of tumour necrosis factor- α , interleukin-1 β and neutrophils in a novel behavioural model that concomitantly demonstrates articular inflammation and hypernociception in mice

RESEARCH PAPER

Cooperative role of tumour necrosis factor- α , interleukin-1 β and neutrophils in a novel behavioural model that concomitantly demonstrates articular inflammation and hypernociception in mice

Daniela Sachs¹, Fernanda M Coelho¹, Vívian V Costa^{1,2},
Fernando Lopes^{1,3}, Vanessa Pinho^{1,3}, Flávio A Amaral^{1,2},
Tarcília A Silva^{1,4}, Antônio L Teixeira^{1,5}, Daniele G Souza^{1,2} and
Mauro M Teixeira¹

¹Imunofarmacologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, ²Departamento de Microbiologia, ³Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, ⁴Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, and ⁵Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

BACKGROUND AND PURPOSE

Chronic joint inflammation and pain are the hallmarks of disease in patients with inflammatory arthritis, notably rheumatoid arthritis. The aim of the present study was to investigate the relative contribution of tumour necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β and neutrophil influx for joint inflammation and nociception in a novel murine model of antigen-induced arthritis (AIA).

EXPERIMENTAL APPROACH

AIA was induced by administration of antigen into knee joint of previously immunized mice. Neutrophil accumulation was determined by counting neutrophils in the joints and assessing myeloperoxidase activity in tissues surrounding the joints. TNF- α , IL-1 β and CXCL-1 were measured by EUSA. Mechanical hypernociception was assessed in parallel, using an electronic pressure meter.

KEY RESULTS

Hypernociception was dependent on antigen dose and the time after its administration; it was prevented by treatment with morphine and associated with neutrophil infiltration and local production of TNF- α , IL-1 β and CXCL-1. Administration of a chimeric monoclonal antibody to TNF- α (infliximab) or IL-1 receptor antagonist prevented neutrophil influx and hypernociception, and this was comparable to the effects of dexamethasone. Treatment with fucoidin (a leucocyte adhesion inhibitor) greatly suppressed neutrophil influx and local production of TNF- α and IL-1 β , and hypernociception.

Correspondence

Professor Mauro M Teixeira,
Departamento de Bioquímica e
Imunologia, Instituto de Ciências
Biológicas, Universidade Federal
de Minas Gerais, Avenue.
Antônio Carlos, 6627 Pampulha,
31270-901, Belo Horizonte,
Minas Gerais, Brazil. E-mail:
mmtex@icb.ufmg.br

Keywords

chemokine; cytokine; arthritis;
neutrophil migration;
inflammatory pain;
hypernociception

Received

8 December 2009

Revised

29 April 2010

Accepted

7 May 2010

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

In conclusion, the present study describes a new model that allows for the concomitant evaluation of articular hypernociception and inflammation. Using this system, we demonstrated that a positive feedback loop involving neutrophil influx and the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β is necessary for articular hypernociception after antigen challenge of immunized mice.

Abbreviations

AIA, antigen-induced arthritis; CFA, complete Freund's adjuvant; IL-1, interleukin-1; IL-1ra, IL-1receptor antagonist; mBSA, methylated BSA; MPO, myeloperoxidase; RA, rheumatoid arthritis; TMB, 3,3'-5,5'-tetramethylbenzidine; TNF- α , tumour necrosis factor- α ; TNFR, TNF receptor

Introduction

Chronic joint inflammation and pain are the two main symptoms in patients with rheumatoid arthritis (RA), and are associated with significant morbidity (Firestein, 2005). RA is a chronic autoimmune disease with repeated acute episodes characterized by infiltration of leucocytes into the synovial and peri-articular tissues (Wipke and Allen, 2001; Liew and McInnes, 2005; Coelho *et al.*, 2008) that results in destruction of cartilage and bone (Firestein, 2003). Neutrophils are the most abundant of leucocytes in the joints of patients with active RA (Kitsis and Weissmann, 1991; Wipke and Allen, 2001), and these cells are thought to contribute to local production of cytokines and to inflict joint damage, perpetuating the inflammatory process (Coelho *et al.*, 2008; Grespan *et al.*, 2008; Lemos *et al.*, 2009). In addition to their potential to inflict joint damage, neutrophils may also play a role in the induction of cutaneous inflammatory pain in animals (Lavich *et al.*, 2006; Cunha *et al.*, 2008).

The sensitization of primary afferent nociceptors is a common denominator of all kinds of inflammatory pain that leads to a state of hyperalgesia and/or allodynia, better described as hypernociception in animal models (Millan, 1999). Hypernociception is induced by inflammatory mediators released in the inflamed tissue in response to a range of inflammatory stimuli that trigger the release of a cascade of cytokines [tumour necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β and CXC chemokines] by resident and incoming cells (Cunha *et al.*, 2005; Verri *et al.*, 2006). Moreover, cytokines such as TNF- α and IL-1 β are also directly implicated in many of the immune processes that are associated with the pathogenesis of RA. Indeed, treatment with anti-TNF antibodies or soluble TNFR has proven an important development in the treatment of patients with RA (Scott and Kingsley, 2006). IL-1 β -based therapies also appear to be useful in the context of RA, a tenet that awaits confirmation with drugs or antibodies that are longer acting than anakinra [IL-1receptor antagonist (IL-1ra)]. A problem associated with

cytokine-based treatment is that these are costly and need to be given via the parenteral route. Moreover, many patients fail to respond to either TNF- α (Moreland *et al.*, 1997) or IL-1 β (Jiang *et al.*, 2000) blockade. Thus, new therapeutic options for the treatment of RA are clearly needed, as are models to investigate joint inflammation and pain concomitantly.

Several experimental models have been used to investigate the pathophysiology of arthritis. However, there are few methods to directly evaluate nociception concomitantly with inflammation events in experimental models of arthritis. In mice, joint hypernociception is usually evaluated only indirectly by stimulating the surrounding tissues in the hind paw after adjuvant administration (Chillingworth and Donaldson, 2003). Pain inferred from performing these latter strategies may reflect sensitization of cutaneous nociceptors instead of joint nociceptive terminals. In the present paper, we addressed the contribution of TNF- α and IL-1 β for neutrophil influx and nociception, using a novel behavioural model, and the contribution of neutrophils for cytokine production and nociception.

Methods

Animals

Animal care and handling procedures were in accordance with the guidelines of the International Association for Study of Pain, and had prior approval from the local animal ethics committee (CETEA, Certificate number 166/2006 and 007/2007). Eight-to ten-week-old male C57Bl/6J (WT) mice were obtained from Centro de Bioterismo of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG, Brazil) and maintained in the animal facilities of the Laboratório de Imunofarmacologia, Department of Biochemistry and Immunology (UFMG), with filtered water and food *ad libitum* and in a controlled environment (temperature and humidity).

Arthritis induction and determination of intra-articular inflammation

The animals were immunized i.d. at the base of the tail with 500 µg of methylated BSA (mBSA) in 100 µL of an emulsion of saline and an equal volume of complete Freund's adjuvant (CFA) at day 0 (Teixeira *et al.*, 2001). Challenge of mice was performed 14 days later. Each mouse received an injection of the amount of mBSA (in 10 µL sterile saline) in the knee joint. At the indicated time after antigen challenge, the mice were culled. The knee cavity was washed with phosphate-buffered saline (PBS) (2 × 5 µL), and peri-articular tissues were removed for evaluation of cytokines, chemokines and myeloperoxidase (MPO) activity. The total number of leucocytes was determined by counting leucocytes in a Neubauer chamber after staining with Turk's solution. Differential counts were obtained from cytopsin (Shandon III, Thermo Shandon, Frankfurt, Germany) preparations by evaluating the percentage of each leucocyte on a slide stained with May-Grünwald-Giemsa.

Hypernociception assessment by a modified electronic pressure meter test for mice

In a quiet room, the mice were placed in acrylic cages (12 × 10 × 17 cm high) with a wire grid floor 15–30 min before testing for environmental adaptation. A series of stimuli was performed only when the animals were quiet, without exploratory movements or defecation and not resting on their paws. In these experiments, an electronic pressure meter was used. It consists of a hand-held force transducer fitted with a polypropylene tip (INSIGHT Instruments, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil) (Cunha *et al.*, 2004). A non-standard large tip (4.15 mm²) and standard large tip (0.5 mm²) were adapted to the probe (Guerrero *et al.*, 2006). An increasing perpendicular force was applied to the central area of the plantar surface of the hind paw to induce the flexion of the knee joint, followed by paw withdraw. A tilted mirror below the grid provided a clear view of the animal's hind paw. The end point was characterized by the removal of the paw. After the flexion-elicited withdrawal threshold, the intensity of the pressure was automatically recorded. The value for the response was obtained by averaging three measurements. The animals were tested before and after treatments. Results are expressed as Δ withdrawal threshold (g) calculated by subtracting zero-time mean measurements from the time interval mean measurements.

The sensitization of the nociceptive neurones in humans results in hyperalgesia (Ferreira, 1972) (an increased response to a stimulus which is normally painful) or allodynia (pain from stimuli that are not

normally painful). However, in animal behaviour models of mechanical nociception, hyperalgesia and allodynia can be distinguished by the use of apparently different mechanical tests. Moreover, the terms hyperalgesia and allodynia have been developed for use in clinical practice rather than for experimental work, physiology or anatomical purposes (see IASP Pain Terminology). Therefore, we have used the term hypernociception to describe the decrease of behavioural nociceptive threshold in experimental animals (Parada *et al.*, 2003; Sachs *et al.*, 2004; Cunha *et al.*, 2005; Verri *et al.*, 2006).

Quantification of neutrophil accumulation in tissues

The extent of neutrophil accumulation in tissues was measured by assaying MPO activity (Souza *et al.*, 2002a; Barsante *et al.*, 2007). Briefly, the knee joint was removed and frozen at -70°C. Upon thawing, the tissue (0.1 g of tissue per 1.9 mL of buffer) was homogenized and processed for determination of MPO activity. The assay employed 25 µL of 3,3'-5,5'-tetramethylbenzidine (TMB, Sigma, St Louis, MO, USA) in PBS (pH 5.4) as the colour reagent. Neutrophil number in each sample was calculated from a standard curve of neutrophils obtained from the peritoneal cavity of 5% casein-treated animals, and processed the same way. The results are expressed in relative number of neutrophils mg⁻¹ wet tissue. Using this methodology, the test is specific for neutrophils over macrophages and lymphocytes.

Measurement of cytokines and chemokines in peri-articular tissues

The concentrations of TNF-α, IL-1β and CXCL-1 were measured in peri-articular tissues using commercially available ELISA assays, following the instructions supplied by the manufacturer (DuoSet kits, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Briefly, 100 mg of tissue was homogenized in 1 mL of PBS (0.4 M NaCl and 10 mM de NaPO₄) containing anti-proteases 0.1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA, 20 KI mL⁻¹ aprotinin A and 0.05% Tween 20. The samples were then centrifuged for 10 min at 3000×g, and the supernatant was immediately used for ELISA assay at a 1:3 dilution in PBS. All samples were assayed in duplicate.

Histology

The knee joint was removed and fixed for 24 h with 10% neutral-buffered formalin. The joints were then incubated in 10% EDTA at pH 7.2 for 3 weeks at room temperature to decalcification. The samples were embedded by routine histological technique in

paraffin, and sectioned at 7 μ m for Mallory's trichomic staining.

Drugs. mBSA, fucoidin, naloxone hydrochloride, morphine sulphate, dexamethasone and CFA were purchased from Sigma Chemical Co., and lidocaine chloride was obtained from Cristália (São Paulo, Brazil). Anti-TNF- α (Infliximab, Remicade[®], Kenilworth, NJ, USA) was obtained from Schering-Plough, and IL-1ra was a kind gift from Dr Steve Poole (National Institute for Biological Standards and Control, South Mimms, Hertfordshire, UK). All compounds were dissolved in saline. Morphine and naloxone were administered i.p. in a volume of 200 μ L. The solution of 2% lidocaine was locally administered in the s.c. plantar tissue in a volume of 10 μ L. The abbreviations used conform to *BJP's Guide to Receptors and Channels* (Alexander *et al.*, 2009), and to the IUPHAR guidelines, as published in *Pharmacological Reviews*.

Statistical analysis

Results are shown as the mean \pm SEM. Difference among groups was evaluated by using ANOVA followed by Student–Newman–Keuls *post hoc* test. The level of significance was set at $P < 0.05$.

Results

Kinetics of hypernociception in a model of antigen-induced arthritis (AIA)

The i.a. challenge of immunized mice with 10 μ L of sterile saline induced a small degree of hypernociception that peaked at 1 h and declined rapidly thereafter (Figure 1A). Challenge of immunized mice with mBSA induced dose-dependent (1, 3, 10 and 30 μ g) mechanical hypernociception that was of much greater intensity and duration. The intensity of hypernociception induced by the lower doses of mBSA (1 and 3 μ g i.a.) in immunized mice was significantly increased after 5 h (Figure 1A) of i.a. challenge, remained stable until day 6 and declined thereafter (Figure 1B). For higher doses (10 and 30 μ g per cavity), the intensity of hypernociception was significant from the first hour, achieved a maximal response at 5 h and remained at the same magnitude until day 6, declining thereafter (Figure 1), but after each of the assessment times the response was increased when compared with the saline group. A submaximal dose (10 μ g) and the read-out at 24 h after i.a. injection of mBSA were chosen for subsequent experiments.

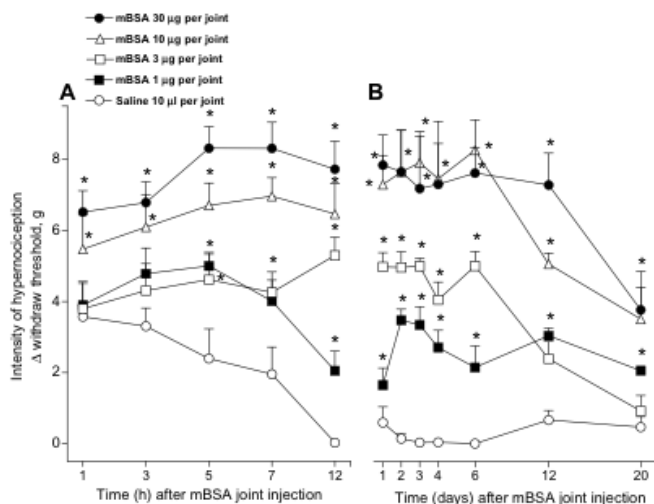


Figure 1

Dose- and time-dependent mechanical hypernociception after injection of antigen (mBSA) in the tibio-femoral joint of immunized mice. mBSA (1, 3, 10 and 30 μ g in 10 μ L) or sterile saline (control; 10 μ L) was injected into the left tibio-femoral joint. The intensity of hypernociception was evaluated, 1–12 h (A) and 1–20 days (B) after the injection of mBSA into the joint in immunized mice, by electronic pressure meter test. The results are expressed as the mean \pm SEM of 4–5 animals per group. * $P < 0.05$ when compared with control mice.

Discriminating articular from cutaneous hypernociception

A set of experiments was performed to verify whether the probe tip applied on the plantar surface of the hind paw stimulated cutaneous nociceptors instead of articular nociceptors. To distinguish articular (flexion) from cutaneous nociception (poking), two probes with different tip size (standard size tip, 0.5 mm² and non-standard size tip, 4.15 mm²) were adapted on the electronic pressure meter, and applied on the plantar hind paw surface of the mice. To confirm that the nociceptive response induced by intra-articular administration of mBSA in immunized mice was not due to the sensitization of cutaneous nociceptors, the mice received an intraplantar injection of either lidocaine (2% in 10 μ L) or saline (10 μ L). As shown in Figure 2, the intraplantar injection of lidocaine prevented the decrease in withdrawal threshold produced by the standard size tip (0.5 mm², thin tip) and did not alter the flexion movement produced by the large size tip (4.15 mm², large tip) applied on the plantar surface. These results suggest that the application of the standard size tip provokes cutaneous nociception by itself and that the large tip

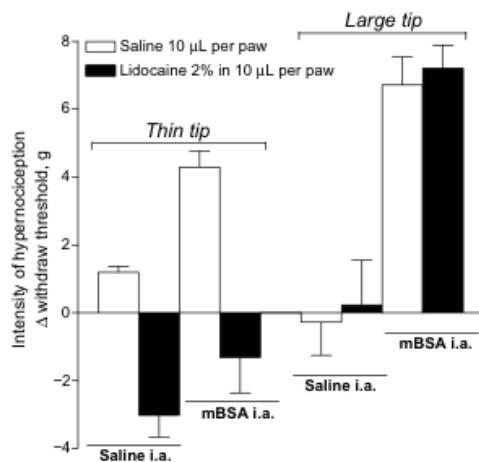


Figure 2

Effect of intraplantar lidocaine injection on hypernociceptive responses to injection of antigen (mBSA) in the tibio-femoral joint of immunized mice. The mice received an intraplantar injection of lidocaine (Lido: 2%, 10 μ L) or saline (10 μ L) 24 h after the i.a. injection of mBSA (mBSA, 10 μ g in 10 μ L) or saline (10 μ L). Hypernociception was evaluated 30 min after the intraplantar injection of lidocaine or saline with an electronic pressure meter test using tip probes of two sizes (4.15 and 0.5 mm²). The results are expressed as the mean \pm SEM of five animals per group.

causes dorsal flexion movement of the knee joint without the stimulation of cutaneous nociceptors, hence allowing the evaluation of the dorsal flexion-elicited hypernociception during joint inflammation. The large size tip (4.15 mm², large tip) was thus chosen for subsequent experiments.

Effect of morphine on mBSA-induced hypernociception in immunized mice

To corroborate the view that flexion of tibio-femoral joint indicates an articular nociceptive response (not a cutaneous nociceptive response), immunized mice challenged with i.a. mBSA were treated with morphine. The mice received morphine (2–8 mg·kg⁻¹; i.p.) 24 h after i.a. injection of mBSA. Treatment with morphine inhibited in a dose-dependent manner the mBSA-elicited hypernociception. Furthermore, treatment with the opioid receptor antagonist naloxone (1 mg·kg⁻¹; s.c.) 30 min before morphine (2 mg·kg⁻¹; i.p.) injection prevented the analgesic effect of morphine (Figure 3). The administration of naloxone alone had no significant effect on the nociceptive response.

Evaluation of joint inflammation

Joint inflammatory parameters after i.a. challenge of immunized mice with mBSA were also evaluated. There was an increase in the number of neutrophils in the synovial cavity (Figure 4A) and in peri-articular tissues (Figure 4B) at 24 h after challenge. In line with these findings, histological analysis of joint sections demonstrated a dense infiltration of neutrophils in the synovium and peri-articular tissues, and synovial hyperplasia at 24 h after challenge when compared with control (Figure 4C,D). Levels of the cytokines TNF- α and IL-1 β , and the chemokine CXCL-1 were increased 24 h after challenge in peri-articular tissues (Figure 5A, B and C respectively).

Reduction of mBSA-induced joint inflammation and hypernociception by treatments with anti-TNF- α , IL-1ra and dexamethasone in a model of AIA

In order to evaluate the usefulness of the model to investigate the role of drugs currently shown to modify the outcome of arthritis, especially TNF- α and IL-1 β -based therapies, we compared the effects of the treatment with anti-TNF- α , IL-1ra and dexamethasone (standard anti-inflammatory steroid) in our model. In the same animals and joints, we assessed the effects of the treatment on hypernociception, and on intra- and peri-articular neutrophil influx. As seen in Figure 6, treatment with anti-TNF- α antibody (infliximab, 10 mg·kg⁻¹; s.c.) or

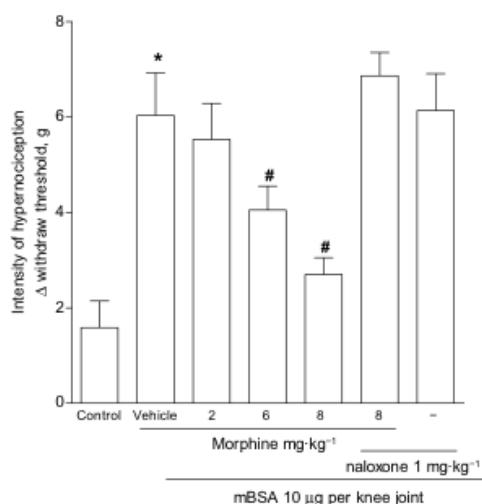


Figure 3

Antinociceptive effect of morphine after injection of antigen (mBSA) in the tibio-femoral joint of immunized mice. mBSA (10 μ g in 10 μ L) or sterile saline (control; 10 μ L) was injected into the femur-tibial joint. The animals were post-treated (24 h after i.a. injection of mBSA) with morphine (2–8 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p.) or vehicle (sterile saline). The effect of naloxone (1 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 30 min before morphine (8 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) is also demonstrated. The intensity of hypernociception was evaluated 24 h after i.a. injection of mBSA in immunized mice by electronic pressure meter test. The results are expressed as the mean \pm SEM of five animals per group. * $P < 0.05$ when compared with control mice. # $P < 0.05$ when compared to vehicle-treated animals.

IL-1ra (5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; s.c.) 30 min before antigen challenge of immunized mice greatly reduced the hypernociception, and intra- and peri-articular neutrophil influx. Overall, the effect of anti-TNF- α or IL-1ra was of similar magnitude to that of the treatment with dexamethasone (5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; s.c.) (Figure 6). Treatment with anti-TNF- α decreased production of IL-1 β by approximately 50%, whereas treatment with IL-1ra decreased TNF- α in the joints by approximately 40% ($n = 4$ in each group, $P < 0.05$).

Neutrophils play a critical role in mechanical joint hypernociception and cytokine production

Neutrophils have been shown to play a major role in mechanical and thermal hypernociception due to intraplantar inflammation in rats (Lavich *et al.*, 2006; Cunha *et al.*, 2008). In the present series of experiments, the selectin inhibitor fucoidin 20 ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.v.) was used to evaluate the role of neu-

trophil migration in the induction of inflammatory hypernociception. As shown in Figure 7, fucoidin given 10 min before mBSA challenge greatly reduced mechanical hypernociception (Figure 7A), number of neutrophils in the synovial cavity (Figure 7B) and the number of neutrophils in peri-articular tissues (Figure 7C) evaluated 24 h after mBSA challenge in immunized mice. Interestingly, the treatment with fucoidin also reduced concentrations of TNF- α (Figure 7D), IL-1 β (Figure 7E), but not CXCL-1 (Figure 7F) in peri-articular tissues.

Discussion

In the present study, we characterized a novel behavioural model that allows the quantification of articular hypernociception after antigen challenge of immunized mice. Arthritis, induced by administration of antigen into the knee joint of previously immunized mice, mediated a dose-dependent hypernociception, which was associated with a significant infiltrate of inflammatory cells and synovial hyperplasia. Using this model, we show a cooperative role between neutrophil influx and the production of the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β in driving tissue inflammation and hypernociception.

Articular hypernociception is usually indirectly evaluated by mechanical and thermal tests. The application of a cutaneous nociceptive stimulus on the ipsilateral plantar skin is used to detect primary or even secondary hypernociception (central sensitization) induced by inflammatory agents injected in the joint (Butler *et al.*, 1992; Chillingworth and Donaldson, 2003; Cook and Nickerson, 2005). Whereas a standard-sized tip probe evoked a mechanical nociceptive response that was decreased by lidocaine given locally, nociception induced by a large tip probe was not affected by lidocaine application in the paw. These findings further support the notion that in the present model, only articular nociception is being evaluated. Morphine was used to confirm that the decrease of withdrawal threshold elicited by flexion of the knee joint was indicative of a hypernociceptive response, because its analgesic effect has been well documented (Maldonado *et al.*, 1994; Nagakura *et al.*, 2003; Verri *et al.*, 2004; 2005). As expected, morphine inhibited in a dose-dependent manner hypernociception after antigen challenge of immunized mice, and this effect was prevented by the opioid receptor antagonist, naloxone. Altogether, these results suggest that the use of a large tip probe in mice is suitable for studying articular hypernociception after antigen challenge of immunized animals.

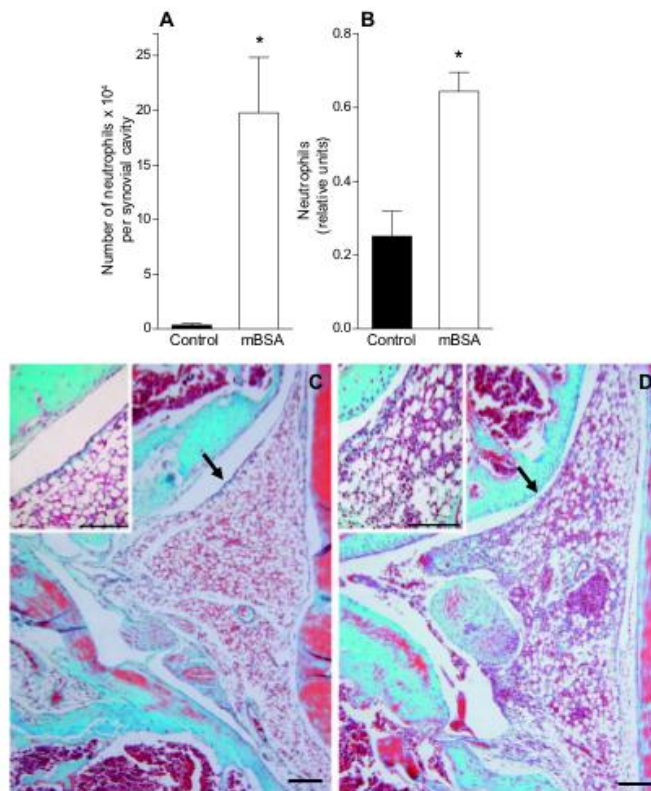


Figure 4

Articular inflammation after injection of antigen (mBSA) in the tibio-femoral joint of immunized mice. mBSA (10 μ g in 10 μ L) or sterile saline (control; 10 μ L) was injected into the right tibio-femoral joint. In (A), the number of neutrophils in the synovial cavity was assessed into the knee joint of immunized animals. (B) The number of neutrophils in peri-articular tissues was assessed by using MPO assay, and results are shown as relative units. The results are expressed as the mean \pm SEM of five animals per group. * $P < 0.05$ when compared with control mice. Representative sections of knee joints are shown from control (C) or mBSA animals (D) at 24 h after AIA induction or sterile saline injection. Details: high magnification of bone, articular space, synovium and perisynovial tissue (Mallory's trichrome staining); bar = 10 μ m. The arrows show the region of greater magnification ($\times 400$) that appears as an insert in each of the figures.

Recently, Guerrero *et al.* (2006) evaluated hypernociception evoked by flexion of the tibio-tarsal joint of mice given a non-immune stimulus (zymosan) using a similar methodology. In contrast to our studies, these authors could not evaluate inflammatory parameters (cell influx and cytokine production) concomitantly, due to technical difficulties in obtaining material from the injected joint. Therefore, in addition to using immune stimulation as the cause of joint inflammation, the model described here allows a direct comparison, in the same joint, of leucocyte influx, local cytokine and

chemokine production and hypernociception. Therefore, it is possible to evaluate, in the same experimental system, whether the anti-inflammatory effect of a given compound may contribute to its anti-hyperalgesic effect.

Strategies that block or antagonize TNF- α and IL-1 β have been used for the treatment of RA, and found to be useful in preventing the progression of the disease in groups of patients (Schiff, 2000; Olsen and Stein, 2004). Consistent with the human studies, treatment of animals with anti-TNF- α , IL-1ra and dexamethasone (standard anti-

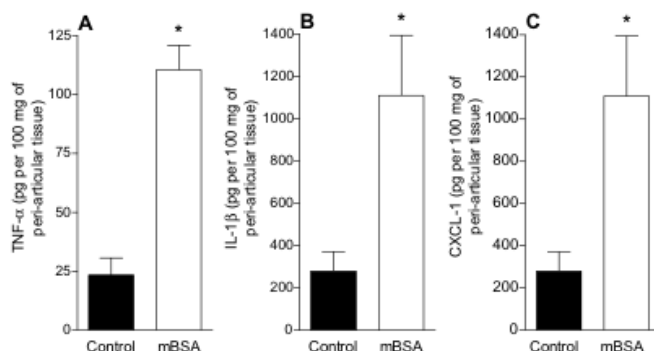


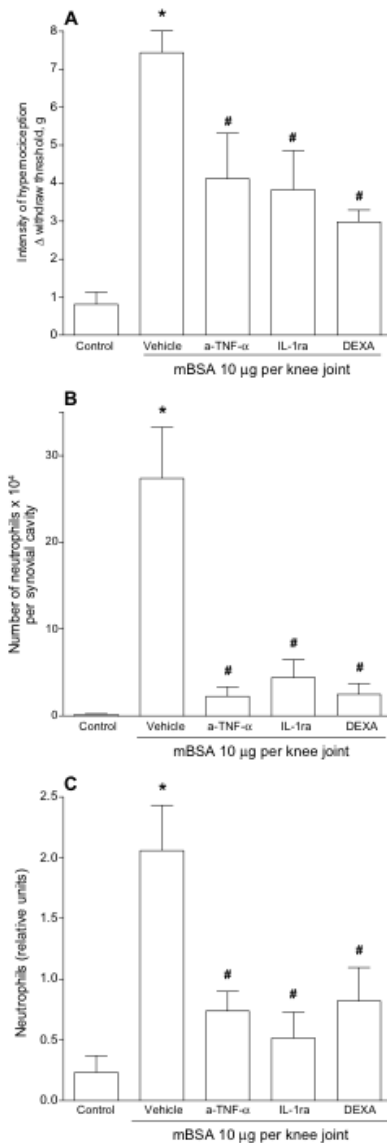
Figure 5

Levels of TNF- α , IL-1 β and CXCL1 in the joint after injection of antigen (mBSA) in the tibio-femoral joint of immunized mice. mBSA (10 μ g in 10 μ L) or sterile saline (control; 10 μ L) was injected into the left knee joint. The concentrations of (A) TNF- α , (B) IL-1 β and (C) CXCL1 in peri-articular tissues after AIA induction was assessed by ELISA, and results are shown as pg of cytokine/chemokine 100 mg⁻¹ tissue. The results are expressed as the mean \pm SEM of 4–5 animals per group. * P < 0.05 when compared with control mice.

inflammatory steroid) reduced neutrophil migration after antigen challenge of immunized mice. These results demonstrate the relevance of TNF- α and IL-1 β for neutrophil influx in this model, and are consistent with the well-known effects of these cytokines in driving the production of a neutrophil chemoattractant and cell adhesion molecule expression at sites of inflammation (Hickey *et al.* 1997; Kelly *et al.* 2007). On the other hand, blockade of neutrophil influx with fucoidin decreased TNF- α and IL-1 β production (as seen in Figure 7). Fucoidin inhibits leucocyte migration (Ley *et al.*, 1993; Kubes *et al.*, 1995; Shimaoka *et al.*, 1996; Teixeira and Hellewell, 1997) by binding to L- and P-selectins, and consequently inhibiting leucocyte rolling and subsequent adhesion (Ley *et al.*, 1993; Kubes *et al.*, 1995; Shimaoka *et al.*, 1996). Therefore, in the context of AIA in mice, TNF- α and IL-1 β are necessary for an adequate influx of neutrophils, but neutrophils are also essential for the full production of TNF- α and IL-1 β . This is not to say neutrophils are actually major producers of these cytokines, but they do appear to contribute to their local production, possibly by interacting with resident macrophages. These findings are consistent with previous findings in another model of acute inflammation induced by reperfusion injury (Souza *et al.*, 2000b; 2001; 2002b; 2004). Indeed, in the context of intestinal reperfusion injury, neutrophil influx was necessary for TNF- α production (Souza *et al.*, 2000a; 2004), whereas TNF- α was necessary for neutrophil influx (Souza *et al.*, 2001). Interestingly, blockade of TNF- α partially decreased IL-1 β production, and blockade of IL-1 β partially decreased TNF- α produc-

tion, suggesting that these cytokines facilitate the production of each other in the context of AIA. A previous study from our group showed that CXCR2-acting cytokines, such as CXCL1, are needed for neutrophil influx in AIA (Coelho *et al.*, 2008). CXCL1 production was not decreased by fucoidin treatment. Therefore, although CXCL1 acting on CXCR2 appears to be necessary for neutrophil recruitment, it seems that neutrophils are not necessary for the production of CXCL1. Altogether, these studies demonstrate the complexity of the inflammatory response and the many positive feedback loops which are necessary for inflammation to occur. In the context of experimental arthritis, there is strong positive interaction between neutrophils and the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β . Extrapolating this more generally, the existence of positive feedback loops explains why multiple interventions are capable of inhibiting a given inflammatory response, when interventions are given at the beginning of the response.

Several studies have clearly described a role for TNF- α and IL-1 β in the genesis of inflammatory hypernociception (Cunha *et al.*, 2005; Verri *et al.*, 2006). Similarly, it is now clear that neutrophils play a crucial role in the induction of inflammatory hypernociception induced by several stimuli (Levine *et al.*, 1984; Cunha *et al.*, 2008). In our study, strategies that blocked neutrophil influx (fucoidin) or cytokine inhibitors (anti-TNF- α or IL-1ra) decreased hypernociception induced by antigen challenge of immunized mice. These results demonstrate that a positive interaction between neutrophils and cytokines (TNF- α and IL-1 β) drives articular inflammation



after antigen challenge of immunized animals, and triggers the mechanisms that lead to inflammatory hypernociception. However, it is of note that, whereas hypernociception was blocked by around 50% by cytokine inhibitors (or dexamethasone),

Figure 6

Effects of the treatment with anti-TNF- α , IL-1ra or dexamethasone on mechanical hypernociception, neutrophil recruitment and levels of cytokines after injection of antigen (mBSA) in the tibio-femoral joint of immunized mice. Anti-TNF- α ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, s.c.), IL-1ra ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, s.c.), dexamethasone (DEXA, $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, s.c.) or vehicle (sterile saline, $200 \mu\text{L}$) was given 30 min before mBSA ($10 \mu\text{g}$, i.a.). Control animals received $10 \mu\text{L}$ sterile PBS (vehicle) in the knee joint. In (A), the hypernociception was evaluated 24 h after mBSA ($10 \mu\text{g}$ in $10 \mu\text{L}$) i.a. injection in immunized mice by electronic pressure meter test. (B) The number of neutrophils in the synovial cavity was assessed in the knee joint of immunized animals. (C) The number of neutrophils in peri-articular tissues was assessed by using MPO assay, and results are shown as relative units. The results are expressed as the mean \pm SEM of five animals per group. * $P < 0.05$ when compared with control mice. # $P < 0.05$ when compared to vehicle-treated animals.

leucocyte recruitment was inhibited by around 80–90% in the same joint. We have no explanation for these findings, but it is possible that the remaining cell influx may be sufficient for causing a significant degree of hypernociception. In agreement with the latter possibility, fucoidin was the most effective at preventing neutrophil influx and at preventing hypernociception.

In conclusion, we describe a new model that allows for the concomitant evaluation of articular hypernociception and inflammation after antigen challenge of immunized mice. In this model, production of TNF- α , IL-1 β and recruitment of neutrophils occur together with the development of articular hypernociception. More importantly, a positive feedback loop involving neutrophil influx and the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β are necessary for the development of articular hypernociception. This model should be useful in the development of novel strategies for the treatment of diseases with joint inflammation and pain, and can be used to evaluate the inhibitory effects of drugs in clinical use on hypernociception.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq, Brazil), Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) and Fundação do Amparo a Pesquisas do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brazil).

Conflict of interest

The authors state no conflict of interest.

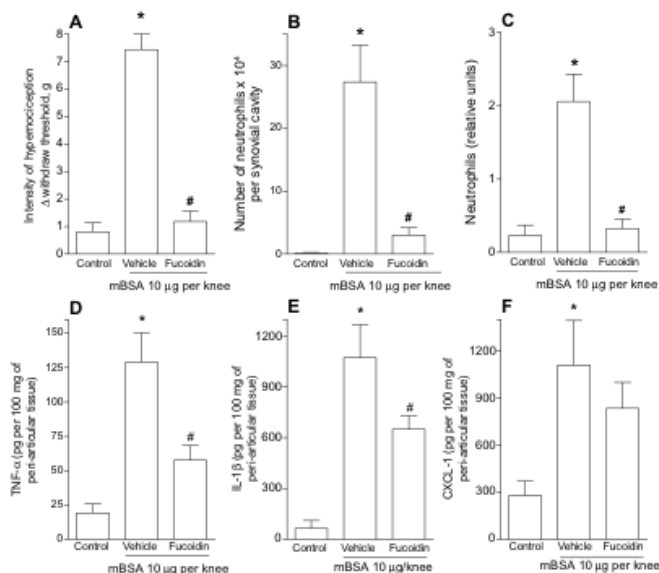


Figure 7

Effects of the treatment with fucoidin on mechanical hypernociception, neutrophil recruitment and cytokine production after injection of antigen (mBSA) in the tibio-femoral joint of immunized mice. Fucoidin (20 mg·kg⁻¹, i.v.) or vehicle (sterile saline, 200 μ L) was given 10 min before mBSA (10 μ g, i.a.). Control animals received 10 μ L sterile PBS (vehicle) in the knee joint. In (A), the hypernociception was evaluated 24 h after mBSA (10 μ g in 10 μ L) i.a. injection in immunized mice by electronic pressure meter test. (B) The number of neutrophils in the synovial cavity was assessed into the knee joint of immunized animals. (C) The number of neutrophils in peri-articular tissues was assessed by using MPO assay, and results are shown as relative units. The concentrations of (D) TNF- α , (E) IL-1 β and (F) CXCL1 in peri-articular tissues after AIA induction were assessed by ELISA, and results are shown as pg of cytokine/chemokine 100 mg⁻¹ tissue. The results are expressed as the mean \pm SEM of five animals per group. * P < 0.05 when compared with control mice. # P < 0.05 when compared to vehicle-treated animals.

References

- Alexander SPH, Mathie A, Peters JA (2009). *Guide to Receptors and Channels (GRAC)*, 4th edn. Br J Pharmacol 158 (Suppl. 1): S1–S254.
- Barsante MM, Cunha TM, Allegretti M, Cattani F, Policani F, Bizzarri C *et al.* (2007). Blockade of the chemokine receptor CXCR2 ameliorates adjuvant-induced arthritis in rats. Br J Pharmacol 153: 992–1002.
- Butler SH, Godefroy F, Besson JM, Weil-Fugazza J (1992). A limited arthritic model for chronic pain studies in the rat. Pain 48: 73–81.
- Chillingworth NL, Donaldson LF (2003). Characterizations of Freund's complete adjuvant-induced model of chronic arthritis in mice. J Neurosci Methods 128: 45–52.
- Coelho FM, Pinho V, Amaral FA, Sachs D, Costa V, Rodrigues D *et al.* (2008). The chemokine receptors CXCR1/2 modulate antigen-induced arthritis by regulating adhesion of neutrophils to the synovial microvasculature. Arthritis Rheum 58: 1329–2337.
- Cook CD, Nickerson MD (2005). Nociceptive sensitivity and opioid antinociception and antihyperalgesia in Freund's adjuvant-induced arthritic male and female rats. J Pharmacol Exp Ther 313: 449–459.
- Cunha TM, Verri WA Jr, Vivancos GG, Moreira IF, Reis S, Parada CA *et al.* (2004). An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. Brazil J Med Biol Res 37: 401–407.
- Cunha TM, Verri WA Jr, Silva JS, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH (2005). A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 1755–1760.
- Cunha TM, Verri WA Jr, Schivo IR, Napimoga MH, Parada CA, Poole S (2008). Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. J Leukoc Biol 83: 824–832.
- Ferreira SH (1972). Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. Nat New Biol 240: 200–203.
- Firestein GS (2003). Evolving concepts of rheumatoid arthritis. Nature 423: 356–361.

- Firestein GS (2005). Immunologic mechanisms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol* 11: S39–S44.
- Grespan R, Fukada SY, Lemos HP, Vieira SM, Napimoga MH, Teixeira MM *et al.* (2008). CXCR2-specific chemokines mediate leukotriene B₄-dependent recruitment of neutrophils to inflamed joints in mice with antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 58: 2030–20450.
- Guerrero AT, Verri WA Jr, Cunha TM, Silva TA, Rocha FA, Ferreira SH *et al.* (2006). Hypernociception elicited by tibio-tarsal joint flexion in mice: a novel experimental arthritis model for pharmacological screening. *Pharmacol Biochem Behav* 84: 244–251.
- Hickey MJ, Reinhardt PH, Ostrovsky L, Jones WM, Jutila MA, Payne D *et al.* (1997). Tumor necrosis factor- α induces leukocyte recruitment by different mechanisms *in vivo* and *in vitro*. *J Immunol* 158: 3391–3400.
- Jiang Y, Genant HK, Watt I, Cobby M, Bresnihan B, Aitchison R *et al.* (2000). A multicenter, double-blind, dose-ranging, randomized, placebo-controlled study of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis: radiologic progression and correlation of Genant and Larsen scores. *Arthritis Rheum* 43: 1001–1009.
- Kelly M, Hwang JM, Kubes P (2007). Modulating leukocyte recruitment in inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 120: 3–10.
- Kitsis E, Weissmann G (1991). The role of the neutrophil in rheumatoid arthritis. *Clin Orthop Relat Res* 265: 63–72.
- Kubes P, Jutila M, Payne D (1995). Therapeutic potential of inhibiting leukocyte rolling in ischemia/reperfusion. *J Clin Invest* 95: 2510–2519.
- Lavich TR, Siqueira Rde A, Farias-Filho FA, Cordeiro RS, Rodrigues e Silva PM, Martins MA (2006). Neutrophil infiltration is implicated in the sustained thermal hyperalgesic response evoked by allergen provocation in actively sensitized rats. *Pain* 125: 180–187.
- Lemos HP, Grespan R, Vieira SM, Cunha TM, Verri WA Jr, Fernandes KSS *et al.* (2009). Prostaglandin mediate IL-23/IL-17-induced neutrophils migration in inflammation by inhibiting IL-12 INF γ production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 5954–5959.
- Levine JD, Lau W, Kwiat G, Goetzl EJ (1984). Leukotriene B₄ produces hyperalgesia that is dependent on polymorphonuclear leukocytes. *Science* 225: 743–745.
- Ley K, Linnemann G, Meinen M, Stoolman LM, Gaetgens P (1993). Fucoidin, but not yeast polyphosphomannan PPME, inhibits leukocyte rolling in venules of the rat mesentery. *Blood* 81: 177–185.
- Liew FY, McInnes IB (2005). A fork in the pathway to inflammation and arthritis. *Nat Med* 11: 601–602.
- Maldonado R, Valverde O, Turcaud S, Fournie-Zaluski MC, Roques BP (1994). Antinociceptive response induced by mixed inhibitors of enkephalin catabolism in peripheral inflammation. *Pain* 58: 77–83.
- Millan MJ (1999). The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 57: 1–164.
- Moreland LW, Baumgartner SW, Schiff MH, Tindall EA, Fleischmann RM, Weaver AL *et al.* (1997). Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein. *N Engl J Med* 337: 141–147.
- Nagakura Y, Okada M, Kohara A, Kiso T, Toya T, Iwai A *et al.* (2003). Allodynia and hyperalgesia in adjuvant-induced arthritic rats: time course of progression and efficacy of analgesics. *J Pharmacol Exp Ther* 306: 490–497.
- Olsen NJ, Stein CM (2004). New drugs for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 350: 2167–2179.
- Parada CA, Vivancos GG, Tambeli CH, Cunha FQ, Ferreira SH (2003). Activation of presynaptic NMDA receptors coupled to NaV1.8-resistant sodium channel C-fibers causes retrograde mechanical nociceptor sensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 2923–2928.
- Sachs D, Cunha FQ, Ferreira SH (2004). Peripheral analgesic blockade of hypernociception: activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K⁺ channel pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 3680–3685.
- Schiff MH (2000). Role of interleukin 1 and interleukin 1 receptor antagonist in the mediation of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 59 (Suppl. 1): i103–i108.
- Scott DL, Kingsley GH (2006). Tumor necrosis factor inhibitors for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 355: 704–712.
- Shimaoka M, Ikeda M, Iida T, Taenaka N, Yoshiya I, Honda T (1996). Fucoidin, a potent inhibitor of leukocyte rolling, prevents neutrophil influx into phorbol-ester-induced inflammatory sites in rabbit lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 153: 307–311.
- Souza DG, Cara DC, Cassali GD, Coutinho SF, Silveira MR, Andrade SP *et al.* (2000a). Effects of the PAF receptor antagonist UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischemia of the superior mesenteric artery in the rat. *Br J Pharmacol* 131: 1800–1808.
- Souza DG, Coutinho SF, Silveira MR, Cara DC, Teixeira MM (2000b). Effects of a BLT receptor antagonist on local and remote reperfusion injuries after transient ischemia of the superior mesenteric artery in rats. *Eur J Pharmacol* 403: 121–128.
- Souza DG, Cassali GD, Poole S, Teixeira MM (2001). Effects of inhibition of PDE4 and TNF- α on local and remote injuries following ischaemia and reperfusion injury. *Br J Pharmacol* 134: 985–994.
- Souza DG, Pinho V, Cassali GD, Poole S, Teixeira MM (2002a). Effect of a BLT receptor antagonist in a model of severe ischemia and reperfusion injury in the rat. *Eur J Pharmacol* 440: 61–69.

Souza DG, Soares AC, Pinho V, Torloni H, Reis LF, Teixeira MM *et al.* (2002b). Increased mortality and inflammation in tumor necrosis factor-stimulated gene-14 transgenic mice after ischemia and reperfusion injury. *Am J Pathol* 160: 1755–1765.

Souza DG, Bertini R, Vieira AT, Cunha FQ, Poole S, Allegretti M *et al.* (2004). Repertaxin, a novel inhibitor of rat CXCR2 function, inhibits inflammatory responses that follow intestinal ischaemia and reperfusion injury. *Br J Pharmacol* 143: 132–142.

Teixeira MM, Hellewell PG (1997). The effect of the selectin binding polysaccharide fucoidin on eosinophil recruitment *in vivo*. *Br J Pharmacol* 120: 1059–1066.

Teixeira MM, Talvani A, Tafuri WL, Lukacs NW, Hellewell PG (2001). Eosinophil recruitment into sites of delayed-type hypersensitivity reactions in mice. *J Leukoc Biol* 69: 353–360.

Verri WA Jr, Schivo IR, Cunha TM, Liew FY, Ferreira SH, Cunha FQ (2004). Interleukin-18 induces mechanical hypernociception in rats via endothelin acting on ETB receptors in a morphine-sensitive manner. *J Pharmacol Exp Ther* 310: 710–717.

Verri WA Jr, Molina RO, Schivo IR, Cunha TM, Parada CA, Poole S *et al.* (2005). Nociceptive effect of subcutaneously injected interleukin-12 is mediated by endothelin acting on ETB receptors in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 315: 609–615.

Verri JWA, Cunha TM, Parada CA, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH (2006). Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacol Ther* 112: 116–138.

Wipke BT, Allen PM (2001). Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. *J Immunol* 167: 1601–1608.

Resolution of Neutrophilic Inflammation by H₂O₂ in Antigen-Induced Arthritis:

Resolution of Neutrophilic Inflammation by H₂O₂ in Antigen-Induced Arthritis

Fernando Lopes, Fernanda M. Coelho, Vivian V. Costa, Érica L. M. Vieira, Lirlândia P. Sousa, Tarcília A. Silva, Leda Q. Vieira, Mauro M. Teixeira, and Vanessa Pinho

Objective. Neutrophil accumulation contributes to the pathogenesis of rheumatoid arthritis. This study was undertaken to examine the ability of H₂O₂ to influence neutrophilic inflammation in a model of antigen-induced arthritis (AIA) in mice.

Methods. AIA was induced by administration of antigen into the knee joints of previously immunized mice. Neutrophil accumulation was measured by counting neutrophils in the synovial cavity and assaying myeloperoxidase activity in the tissue surrounding the mouse knee joint. Apoptosis was determined by morphologic and molecular techniques. The role of H₂O₂ was studied using mice that do not produce reactive oxygen species (gp91^{phox}^{-/-} mice) and drugs that enhance the generation or enhance the degradation of H₂O₂.

Results. Antigen challenge of immunized mice induced neutrophil accumulation that peaked at 12–24 hours after challenge. H₂O₂ production peaked at 24 hours, after which time, the inflammation resolved. Neutrophil recruitment was similar in wild-type and gp91^{phox}^{-/-} mice, but there was delayed resolution in gp91^{phox}^{-/-} mice or after administration of catalase. In contrast, administration of H₂O₂ or superoxide dismutase (SOD) resolved neutrophilic inflammation. The resolution of inflammation induced by SOD or H₂O₂ was accompanied by an increase in the number of

apoptotic neutrophils. Apoptosis was associated with an increase in Bax and caspase 3 cleavage and was secondary to phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt activation.

Conclusion. Our findings indicate that levels of H₂O₂ increase during neutrophil influx and are necessary for the natural resolution of neutrophilic inflammation. Mechanistically, enhanced levels of H₂O₂ (endogenous or exogenous) inhibit p-Akt/NF-κB and induce apoptosis of migrated neutrophils. Modulation of H₂O₂ production may represent a novel strategy for controlling neutrophilic inflammation in the joints.

Rheumatoid arthritis (RA) affects ~1% of the adult population of the world (1). The annual cost of RA is estimated to be ~16 billion dollars, including medical expenses and indirect costs, such as decreased productivity and quality of life (2). In RA, the altered balance between proinflammatory and antiinflammatory cytokine production leads to chronic inflammation, synovio-cyte proliferation, and erosion of cartilage and bone (3). Neutrophils are the most abundant leukocyte in the joints of patients with active RA (4) and are thought to play a role in the pathogenesis of the disease by inflicting damage to tissues and releasing proinflammatory cytokines (3,5,6).

More direct evidence of the involvement of neutrophils in the pathogenesis of arthritis has come from studies of animal models of the disease (7). Neutrophils are attracted into affected joints by chemoattractants commonly detected in rheumatoid synovial fluid (8). For example, we have shown that chemokines active on CXCR1 and CXCR2 receptors play an important role in driving neutrophil influx and joint damage in experimental arthritis (6). Accumulation of a particular leukocyte subset in tissue depends not only on the number of cells being recruited, but also on the number of cells that are cleared (by apoptosis) or leave the tissue (9). Recent

Supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Brazil.

Fernando Lopes, MSc, Fernanda M. Coelho, PhD, Vivian V. Costa, MSc, Érica L. M. Vieira, MS, Lirlândia P. Sousa, PhD, Tarcília A. Silva, PhD, Leda Q. Vieira, PhD, Mauro M. Teixeira, MD, PhD, Vanessa Pinho, PhD: Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

Address correspondence to Vanessa Pinho, PhD, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627 Pampulha, 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. E-mail: vpinho@icb.ufmg.br.

Submitted for publication December 21, 2010; accepted in revised form May 5, 2011.

studies have shown that apoptosis of neutrophils contributes to natural or induced (by antiinflammatory agents) resolution of inflammation (10,11).

Several mediators and molecular pathways have been shown to modulate the survival and death of leukocytes at sites of inflammation, including growth factors (12), proinflammatory cytokines (13), phosphatidylinositol 3-kinase γ (PI3K γ) (14), and tumor necrosis factor α (TNF α) (15). Reactive oxygen species (ROS) are released during inflammatory responses and have been shown to regulate cell survival (16). Under conditions of oxidative stress, superoxide dismutase (SOD) acts as an endogenous cellular defense system that degrades O_2^- into oxygen and H_2O_2 . H_2O_2 may then be detoxified by glutathione peroxidase or catalase (17). H_2O_2 has been demonstrated to induce apoptosis in epithelial cells (18), endothelial cells (19), human hepatoma cells (20), and myocytes (21).

In this study, we examined the ability of H_2O_2 to resolve neutrophilic inflammation in a model of antigen-induced arthritis (AIA) in mice. We demonstrated that endogenous generation of H_2O_2 is important for the natural resolution of inflammatory responses and that administration or generation of H_2O_2 resolves established inflammation in AIA. Mechanistically, H_2O_2 resolves inflammation by inhibiting a PI3K survival pathway and, hence, promoting neutrophil apoptosis.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Male C57BL/6 and gp91^{phox}^{-/-} (22) mice (ages 8–10 weeks) were bred and housed in a temperature-controlled room and given free access to water and food. All experimental protocols were subjected to evaluation and were approved by the local animal ethics committee.

Reagents and drugs. SOD from bovine erythrocytes, catalase, H_2O_2 , Freund's complete adjuvant (CFA), methylated bovine serum albumin (mBSA), and LY294002 were purchased from Sigma. Rabbit anti-p-AKT (Ser⁴⁷³), anti-cleaved caspase 3, and anti-Bax (P-19/sc-526) or secondary anti-rabbit peroxidase-conjugated antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Anti- β -actin and anti-mouse peroxidase-conjugated antibodies were from Sigma.

Arthritis induction. Animals were immunized intradermally at the base of the tail with 500 μ g of mBSA in 100 μ l of an emulsion of saline and an equal volume of CFA on day 0 (6). Mice were challenged with antigen 14 days later. Each mouse received an injection of mBSA (10 μ g mBSA in 10 μ l sterile saline) into the left knee joint. The knee cavity was washed with phosphate buffered saline (PBS; 2 \times 5 μ l), and periarticular tissue was removed for evaluation of cytokines, chemokines, and myeloperoxidase (MPO) activity. The total number of leukocytes was determined by counting leukocytes in a Neubauer chamber after staining with Turk's solution. Differential counts were determined using standard morpho-

logic criteria and were performed in May-Grünwald-Giemsa-stained cytopsin (Shandon III) slides. In experiments to evaluate the effects of drug treatment on inflammation resolution and neutrophil apoptosis, mice were treated intraarticularly with SOD (0.3 mg/kg), H_2O_2 (10 μ l, 0.5M), catalase (1.2 mg/kg), or LY294002 (10 μ g/cavity) 12 or 24 hours after arthritis induction, and parameters were evaluated 24 or 48 hours after arthritis induction. Doses were determined by dose-response experiments.

Histologic analysis. The mouse knee joints were removed and fixed in 8% paraformaldehyde. After fixation in 8% paraformaldehyde (pH 7.2) for 12 hours, the joints were incubated in 20% EDTA (pH 7.2) for 3 days at room temperature to decalcify the bone. Samples were washed with PBS and dehydrated. After embedding in paraffin, 3- μ m-thick sections were obtained and stained with hematoxylin and eosin.

Quantification of neutrophil accumulation in tissue by measurement of MPO activity. The extent of neutrophil accumulation in tissue was measured by assaying MPO activity, as previously described (23). Briefly, the mouse knee joint was removed and frozen at -70°C until analyzed. Upon thawing, the tissue (0.1 gm of tissue per 1.9 ml of buffer) was homogenized and processed for determination of MPO activity. The assay used 25 μ l of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (Sigma) in PBS (pH 5.4) as the color reagent. The neutrophil number in each sample was calculated from a standard curve of neutrophils obtained from the peritoneal cavity of 5% casein-treated animals and processed in the same manner. The results were expressed as the relative number of neutrophils per milligram of wet tissue.

Assessment of leukocyte apoptosis. Apoptosis was assessed as previously described (24). Briefly, cells (5×10^4) collected 48 hours after antigen challenge were cytocentrifuged, fixed, stained with May-Grünwald-Giemsa, and counted using oil immersion microscopy (100 \times objective) to determine the proportion of cells with distinctive apoptotic morphology. Twenty-five fields were counted per slide, and results are expressed as the mean \pm SEM number of apoptotic cells in 25 fields.

Lysate preparation and Western blot analysis. Inflammatory cells harvested from the mouse knee cavity were washed with PBS, and cytosolic and nuclear cell extracts were obtained as previously described (25). Protein levels were quantified using the Bradford method (Bio-Rad). Lysate samples (40 μ g of cytosolic extracts and 10 μ g of nuclear extracts) were separated by electrophoresis on a denaturing 10–15% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto nitrocellulose membranes as described (25). Rainbow markers (Amersham Biosciences) were run in parallel to estimate molecular weights. Membranes were blocked overnight at 4 $^\circ\text{C}$ with PBS containing 5% (weight/volume) nonfat dry milk and 0.1% Tween 20, washed 3 times with PBS containing 0.1% Tween 20, and then incubated with specific antibody in PBS containing 5% (w/v) BSA and 0.1% Tween 20. After washing, membranes were incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary anti-rabbit antibody (1:3,000). Immunoreactive bands were visualized using an ECL detection system, according to the recommendations of the manufacturer (Amersham Biosciences). To ascertain that blots were loaded with equal amounts of protein

lysates, they were also incubated in the presence of antibodies against β -actin or lamin A. The levels of p-Akt were quantified by using densitometric analysis software (LabImage) and were normalized to the levels of β -actin in the same sample. Results were expressed as a p-Akt: β -actin ratio, measured in arbitrary units.

H₂O₂ assay. Luminol-dependent chemiluminescence induced by H₂O₂ was measured using a BioOrbit 1250 Luminometer, according to the method described by Capettini et al (26), with some modifications. The samples obtained by articular wash were placed in tubes containing 1 ml PBS solution (137.0 mmoles/liter NaCl, 2.7 mmoles/liter KCl, 8.1 mmoles/liter Na₂HPO₄, and 1.5 mmoles/liter KH₂PO₄ [pH 7.4]), containing 100 μ moles/liter of luminol (Sigma), stirred, and maintained at 37°C. The reaction was initiated by the addition of 6 IU/ml of HRP (27) and recorded for 10 minutes.

Statistical analysis. All results are presented as the mean \pm SEM. Normalized data were analyzed by one-way analysis of variance, and differences between groups were assessed using Student-Newman-Keuls posttest. *P* values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Kinetics of joint inflammation and H₂O₂ production in a murine model of AIA. After injection of antigen into the left knee joints of immunized mice, recruitment of neutrophils was first detected at 3 hours and peaked at 12–24 hours after challenge (Figure 1A). Neutrophilic inflammation was substantially resolved (>80% decrease in neutrophil influx) by 48 hours after antigen challenge. A similar profile was observed when the MPO assay was used to investigate neutrophil accumulation in tissues surrounding the mouse knee joint. Neutrophil influx was first detectable at 3 hours after challenge, peaked at 12–24 hours after challenge, and was markedly decreased at 48 hours after antigen challenge. (Results are available from the author upon request.) Levels of H₂O₂ in the cavity were evaluated by luminol/HRP chemiluminescence assay. As shown in

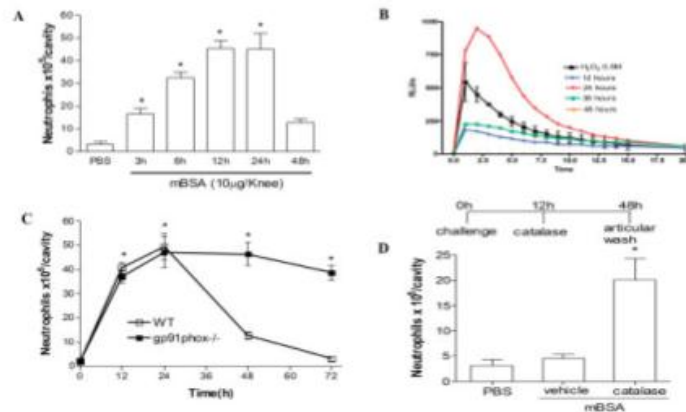


Figure 1. Kinetics of joint inflammation and H₂O₂ production in a murine model of antigen-induced arthritis. **A**, Number of neutrophils in the synovial cavity at different time points after injection of 10 μ g of methylated bovine serum albumin (mBSA) or 10 μ l of sterile phosphate buffered saline (PBS) into the knee joints of immunized wild-type (WT) mice. **B**, H₂O₂ production at different time points after arthritis induction in wild-type mice, assessed by luminol chemiluminescence in the presence of horseradish peroxidase. The x-axis shows the duration of chemiluminescence measurement in minutes. RLU = relative luminescence units. **C**, Number of neutrophils in the synovial cavity at different time points after injection of 10 μ g of mBSA into the knee joints of immunized wild-type or gp91^{phox}^{-/-} mice. **D**, Effect of catalase treatment on the number of neutrophils in the synovial cavity in wild-type mice. Catalase (1.2 mg/kg) or vehicle (10 μ l saline) was administered intraarticularly 12 hours after arthritis induction (challenge), and the number of neutrophils in the synovial cavity was assessed 48 hours after arthritis induction. Values are the mean \pm SEM (n = 5 mice per group). * = *P* < 0.01 versus PBS-treated mice in **A** and **D**; * = *P* < 0.01 versus wild-type mice in **C**.

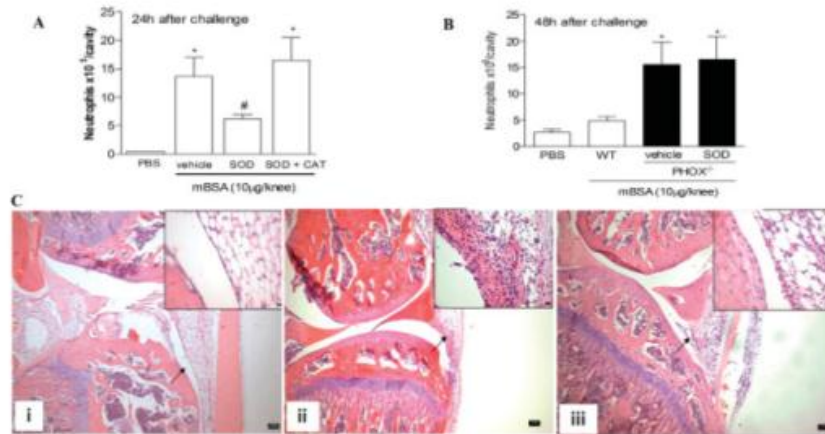


Figure 2. Effect of superoxide dismutase (SOD) treatment on neutrophil recruitment and joint inflammation in wild-type and $gp91^{phox-/-}$ mice with antigen-induced arthritis. **A** and **B**, Number of neutrophils in the synovial cavity in wild-type mice treated with an intraarticular injection of SOD (0.3 mg/kg), SOD plus catalase (CAT; 1.2 mg/kg), or vehicle (10 μ l saline) (**A**) and in wild-type mice and $gp91^{phox-/-}$ mice treated with vehicle or SOD (**B**). Treatment was administered 12 hours after arthritis induction with 10 μ g of mBSA or injection of 10 μ l of sterile PBS into the knee joints of immunized mice, and the number of neutrophils was assessed 24 hours (**A**) or 48 hours (**B**) after arthritis induction. Bars show the mean \pm SEM ($n = 5$ mice per group). * = $P < 0.05$ versus PBS-treated mice; # = $P < 0.05$ versus vehicle-treated mice. **C**, Hematoxylin and eosin-stained sections of the knee joints of control mice (**i**), vehicle-treated arthritic mice (**ii**), and SOD-treated arthritic mice (**iii**). Histopathologic features were assessed 24 hours after induction of arthritis or injection of sterile PBS. **Insets**, Higher-magnification views of the regions indicated by arrows. Representative results are shown. Bars = 100 μ m. Original magnification $\times 40$; $\times 400$ in **insets**. See Figure 1 for other definitions.

Figure 1B, H_2O_2 was first detected at 12 hours, and the levels peaked at 24 hours, after which time, the inflammation resolved. Levels of H_2O_2 decreased by 36 hours, and H_2O_2 was virtually undetectable at 48 hours (Figure 1B).

A series of experiments was then conducted in $gp91^{phox-/-}$ mice that were immunized and challenged with an injection of antigen into the knee. The $gp91^{phox-/-}$ mice lack the ability to assemble NADPH oxidase and are therefore incapable of generating ROS (22). As shown in Figure 1C, the productive phase of inflammation was similar in wild-type and $gp91^{phox-/-}$ mice, i.e., neutrophil migration into the cavity was similar from 6 hours to 24 hours. However, whereas neutrophilic inflammation resolved in wild-type mice, the numbers of neutrophils in the cavity were still elevated in $gp91^{phox-/-}$ mice 48 hours, and even 72 hours, after antigen challenge. At 72 hours, there were virtually no neutrophils in the cavity in antigen-challenged wild-type mice (Figure 1C).

Since H_2O_2 production peaked 24 hours after

antigen challenge and a decrease in the production of ROS was associated with prolonged inflammatory responses, we treated wild-type mice with catalase, an enzyme that degrades H_2O_2 , 12 hours after challenge, and counted neutrophil numbers 48 hours after challenge. As shown in Figure 1D, there were significant numbers of neutrophils in the articular cavity in catalase-treated animals, suggesting that enzyme treatment prevented neutrophil clearance.

Requirement of H_2O_2 for the natural resolution of inflammation and H_2O_2 -mediated resolution of ongoing neutrophilic inflammation. Since H_2O_2 generation was associated with the natural resolution of inflammation in an inflammatory response, we examined whether administration of H_2O_2 or generation of endogenous H_2O_2 , by means of SOD treatment, induced the resolution of inflammation. In the experiments depicted in Figure 2, SOD was administered to mice 12 hours after arthritis induction, before H_2O_2 levels in the cavity peaked. At the dose used, SOD treatment increased the levels of H_2O_2 in the synovial cavity (mean \pm SEM 0

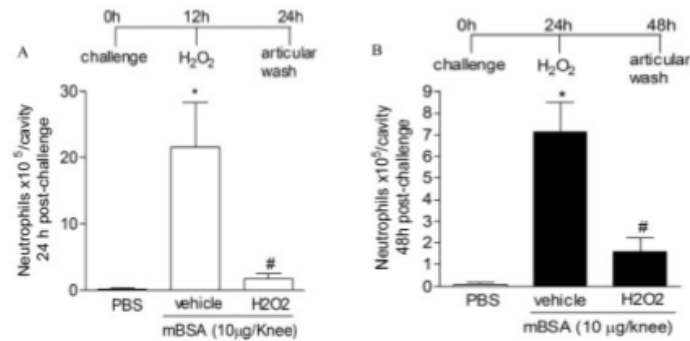


Figure 3. Effect of H₂O₂ treatment on neutrophil recruitment in wild-type mice and gp91^{phox}^{-/-} mice with antigen-induced arthritis. The number of neutrophils in the synovial cavity in wild-type mice (A) and in gp91^{phox}^{-/-} mice (B) was determined after intraarticular injection of vehicle (10 μ l saline) or H₂O₂ (0.5M). Treatment was administered 12 hours (in wild-type mice) or 24 hours (in gp91^{phox}^{-/-} mice) after arthritis induction with 10 μ g of mBSA or injection of 10 μ l of sterile PBS into the knee joints of immunized mice, and the number of neutrophils was assessed 24 hours (in wild-type mice) or 48 hours (in gp91^{phox}^{-/-} mice) after arthritis induction. Bars show the mean \pm SEM (n = 5 mice per group). * = $P < 0.01$ versus PBS-treated mice; # = $P < 0.05$ versus vehicle-treated mice. See Figure 1 for definitions.

relative luminescence units (RLU)/second in mice that received PBS, 164.5 \pm 80 RLU/second in mice that received antigen plus vehicle, and 8,209.5 \pm 1,517.5 RLU/second in mice that received antigen plus SOD [n = 4 mice per group]. Importantly, SOD treatment at 12 hours significantly reduced the number of neutrophils recovered from the mouse synovial cavity at 24 hours (Figure 2A).

A decrease in neutrophil recruitment was associated with decreased joint damage in the mice, as observed on histopathologic analysis (Figure 2C), but there was no effect on the number of mononuclear cells (mean \pm SEM 0.7 \pm 0.1 $\times 10^5$ mononuclear cells/cavity in mice that received PBS, 1.0 \pm 2.1 $\times 10^5$ mononuclear cells/cavity in mice that received vehicle, and 1.7 \pm 0.8 $\times 10^5$ mononuclear cells/cavity in mice that received SOD; n = 4 mice per group). Indeed, SOD treatment significantly ameliorated synovial hyperplasia and leukocyte recruitment after antigen challenge in immunized mice (Figure 2C). Treatment of mice with catalase, which degrades H₂O₂, reversed the ability of SOD to resolve inflammation (Figure 2A). Moreover, administration of SOD into the knee joints of gp91^{phox}^{-/-} mice, which do not generate ROS, had no effect on neutrophil numbers (Figure 2B). Taken together, these results suggest that SOD generated H₂O₂ from ROS in the mouse knee joint

and that H₂O₂ mediated the resolution of neutrophilic inflammation after SOD treatment.

To confirm the latter possibility, H₂O₂ was injected into mouse knee joints 12 hours after antigen challenge, and neutrophil numbers were evaluated at 24 hours. As shown in Figure 3A, H₂O₂ induced the resolution of neutrophilic inflammation in wild-type mice. Significantly, administration of H₂O₂ also decreased the level of neutrophil accumulation in the cavity in gp91^{phox}^{-/-} mice to levels observed in wild-type mice (Figures 3B and 1C).

Promotion of the resolution of neutrophilic inflammation by H₂O₂ induction of neutrophil apoptosis. The next series of experiments was performed to investigate whether induction of apoptosis was the mechanism by which administration of H₂O₂ or endogenous enhancement of H₂O₂ (by SOD treatment) resolved neutrophilic inflammation in the mouse synovial cavity. The resolution of inflammation induced by treatment with SOD or H₂O₂ was accompanied by an increase in the number of apoptotic neutrophils, as assessed morphologically (Figures 4A and B). Consistent with the ability of catalase to degrade H₂O₂ and to prevent SOD-induced resolution, administration of catalase to arthritic mice prevented the enhancing effects of SOD on neutrophil apoptosis (Figure 4A). Administration of

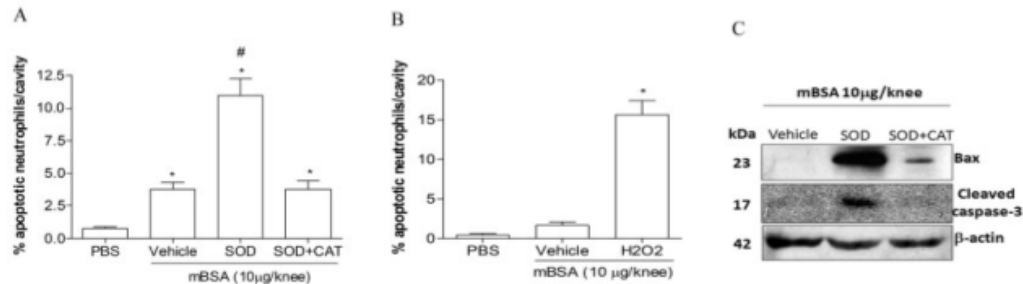


Figure 4. Effect of H_2O_2 treatment on the number of apoptotic neutrophils in wild-type mice with antigen-induced arthritis. **A** and **B**, Percentage of apoptotic neutrophils in the synovial cavity in mice given an intraarticular injection of vehicle, superoxide dismutase (SOD; 0.3 mg/kg), or SOD plus catalase (CAT; 1.2 mg/kg) (**A**), and in mice given an intraarticular injection of vehicle or H_2O_2 (0.5M) (**B**) 12 hours after arthritis induction. The percentage of apoptotic neutrophils in the synovial cavity was assessed 12 hours after treatment. Bars show the mean \pm SEM ($n = 5$ mice per group). * = $P < 0.05$ versus PBS-treated mice; # = $P < 0.05$ versus vehicle-treated mice. **C**, Western blot analysis of cleaved caspase 3 and Bax in fractionated cytoplasmic extracts treated with vehicle, SOD, or SOD plus catalase. See Figure 1 for other definitions.

SOD also increased the accumulation of the proapoptotic protein Bax and activated caspase 3, both of which were inhibited by catalase treatment (Figure 4C). Taken together, these findings show that H_2O_2 or SOD administration induces apoptosis of neutrophils, an event which precedes and explains the resolution of neutrophilic inflammation in arthritic mice.

Inhibition of PI3K/Akt and NF- κ B activation by treatment with SOD. The PI3K/Akt pathway has been shown to mediate survival in many cell types (28). Recently, we have demonstrated that the PI3K/Akt pathway is important for survival of eosinophils *in vivo* (29,30). To explore the importance of the PI3K/Akt pathway for neutrophil accumulation and survival in the joint cavities of mice with AIA, we used the PI3K inhibitor LY294002. Local treatment with LY294002 after arthritis induction in mice reduced the number of neutrophils in the joint cavity (Figure 5A) and increased the number of apoptotic cells (Figure 5C). With this in mind, we examined the levels of Akt phosphorylation in the joint cavities of mice with AIA and found that there was an increase in Akt phosphorylation 24 hours after arthritis induction, which declined 48 hours after arthritis induction, in inflammatory cells recovered from the joint cavity (Figure 6). In control mice (treated with PBS), the number of cells recovered was not sufficient to analyze by Western blotting. However, it has previously been shown that Akt phosphorylation in cells recovered from the pleural cavity is increased after inflammatory challenge when compared with control mice (29). Of note, the kinetics of Akt phosphorylation paralleled the kinetics of neutrophil accumulation and migration into

the joint cavity observed in both wild-type and $gp91^{phox-/-}$ mice (Figures 1 and 6A).

Since PI3K inhibitors resolved neutrophilic inflammation, we examined whether the resolution of inflammation and increase in apoptotic cell numbers observed in arthritic mice after SOD administration were associated with less Akt phosphorylation. Treatment of mice with SOD 12 hours after arthritis induction diminished Akt phosphorylation to baseline levels (Figure 6A), suggesting that control of Akt phosphorylation may be an important mechanism by which SOD resolves neutrophilic inflammation.

The transcription factor NF- κ B is a crucial regulator of granulocyte apoptosis (30,31). Blockade of NF- κ B function with SN50 was associated with the resolution of inflammation and induction of apoptosis (Figures 5C and D). Thus, we examined the translocation of NF- κ B p65 to the nucleus after arthritis induction in mice. There was an increase in NF- κ B p65 translocation at 24 hours in inflammatory cells recovered from the joint cavity (Figure 6B), and translocation decreased thereafter. The kinetics of translocation of NF- κ B p65 to the nucleus paralleled the kinetics of neutrophil accumulation into the joint cavity in mice (Figures 1A and 6B). Importantly, treatment of arthritic mice with LY294002 decreased NF- κ B p65 translocation to the nucleus, showing that NF- κ B activation occurs downstream of PI3K/Akt. (Results are available from the author upon request.)

Therefore, we investigated whether the NF- κ B pathway was also implicated in the resolution of neutrophilic inflammation after SOD treatment. As shown in

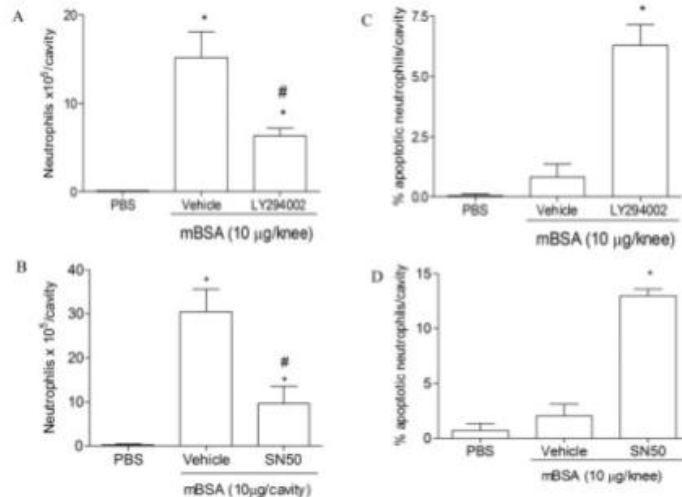


Figure 5. Effect of LY294002 treatment and SN50 treatment on the number of neutrophils and neutrophil apoptosis in wild-type mice with antigen-induced arthritis. **A** and **B**, Number of neutrophils in the synovial cavity in mice given an intraarticular injection of LY294002 (10 µg) (**A**) or SN50 (1 µg) (**B**) 12 hours after arthritis induction. The number of neutrophils was assessed 24 hours after arthritis induction. **C** and **D**, Percentage of apoptotic neutrophils in the synovial cavity in mice given an intraarticular injection of LY294002 (10 µg) (**C**) or SN50 (1 µg) (**D**) 12 hours after arthritis induction. The percentage of apoptotic neutrophils was assessed 24 hours after arthritis induction. Bars show the mean ± SEM (n = 5 mice per group) * = P < 0.01 versus control mice. See Figure 1 for definitions.

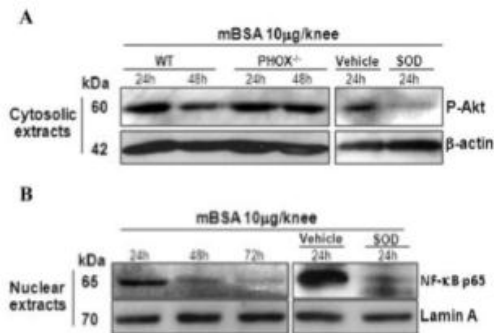


Figure 6. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and NF-κB activation by superoxide dismutase (SOD) treatment. Immunized mice were challenged with mBSA and 12 hours later were treated with SOD. After 6 hours, cells were collected from the joint cavity and processed for analysis. Times shown are the time between arthritis induction and evaluation. **A**, Western blot analysis of phosphorylated Akt in cytosolic extracts from wild-type mice, gp91^{phox}^{-/-} mice, and wild-type mice treated with vehicle or SOD. **B**, Western blot analysis of NF-κB p65 in nuclear extracts from wild-type mice treated with vehicle or SOD. See Figure 1 for other definitions.

Figure 6B, antigen challenge of immunized mice was associated with significant translocation of NF-κB p65 to the nucleus. Treatment of arthritic mice with SOD decreased NF-κB p65 translocation to the nucleus (Figure 6B). Therefore, the ability of SOD to decrease NF-κB translocation and the relevance of NF-κB function for the survival of neutrophils suggest that modulation of the PI3K/NF-κB axis is a major mechanism by which H₂O₂ affects neutrophil survival in murine AIA.

DISCUSSION

In arthritis, there is a characteristic recruitment of neutrophils to the articular cavity, which may contribute to pathophysiologic manifestations of disease (32). Thus, an understanding of the mechanisms involved in neutrophil accumulation, recruitment, and survival at sites of inflammation may be useful for the development of novel therapies for arthritis. There has been great interest in understanding the molecular pathways involved in the clearance of neutrophils during the resolution of the inflammatory response. The following are

the major findings of the present study. First, endogenous generation or administration of H_2O_2 resolves neutrophilic inflammation. Second, $gp91^{phox}$ -deficient mice, which do not produce ROS, have delayed resolution of inflammation, which is reversed by administration of H_2O_2 . Third, resolution of inflammation by H_2O_2 is secondary to induction of proapoptotic molecules and consequent apoptosis of neutrophils. Fourth, mechanistically, neutrophil apoptosis is due to inhibition by H_2O_2 of a PI3K/NF- κ B survival pathway.

Previous studies have demonstrated the role of ROS in the context of inflammation. Most of these studies have focused on the productive phase of the inflammatory response. ROS play an important role in pathologic processes such as aging, hypertension, atherosclerosis, cancer, ischemia, neurodegenerative diseases, and diabetes (33). Similarly, during inflammation, activated phagocytic cells, such as neutrophils, generate a ROS-dependent respiratory burst that directs toxicity toward invading microbes (34). Furthermore, the release of ROS (H_2O_2) by damaged tissue can form a concentration gradient that directs leukocyte recruitment at the site of tissue injury, demonstrating that ROS can orchestrate inflammatory responses in tissue (35). In our experiments, we showed that endogenous production or exogenous administration of ROS played an active role in the resolution of inflammation. Indeed, experiments in $gp91^{phox}$ -deficient mice showed that the inflammatory response was processed normally, but resolution was delayed. Previous studies have shown that low levels of ROS production, due to deficiency in $p47^{phox}$ of the NADPH oxidase complex, were associated with increased autoimmunity and arthritis severity (36).

The findings in mice deficient in subunits of NADPH oxidase remind us of human diseases in which neutrophils contribute to pathogenesis and in which there are genetic defects that result in decreased production of ROS, such as SAPHO syndrome (synovitis, acne, pustulosis, hyperostosis, and osteitis) (37) and PAPA syndrome (pyogenic arthritis, pyoderma gangrenosum, and acne) (38). Chronic granulomatous disease is also the result of a failure of phagocytes in the NADPH oxidase enzymatic system, causing the patient to develop inflammatory granulomas (39). Therefore, an inability to produce ROS appears to explain the prolonged neutrophilic inflammation observed in $gp91^{phox-/-}$ mice and may explain the greater disease severity in the absence of NADPH oxidase.

The major ROS in our study was H_2O_2 , as shown by experiments using catalase and SOD. Engraftment of

cells overexpressing SOD in knee joints at the time of arthritis induction has previously been shown to reduce arthritis in rats (40). However, this is the first report to describe the effect of these enzymes in postprocessing, i.e., after the arthritis is already present. Treatment of mice with catalase, which degrades H_2O_2 , delayed the resolution of inflammation. In contrast, administration of SOD, which generates H_2O_2 , accelerated the resolution of inflammation. Thus, we found that treatment of mice with SOD or H_2O_2 resulted in increased numbers of apoptotic cells in the articular cavity. Interestingly, macrophage counts were unaffected, indicating specificity for neutrophils. Of note, although H_2O_2 may induce either apoptosis or necrosis depending on the type of cell tested and the H_2O_2 concentration used (41), we did not find necrotic neutrophils in the present study. Therefore, the ability of H_2O_2 to resolve inflammation in the knee joints of mice appears to be due to the ability of H_2O_2 to induce apoptosis of neutrophils. This idea is consistent with the findings of other studies showing that H_2O_2 can induce apoptosis in hepatocytes (42), lung epithelial cells (43), cortical neurons (44), and neutrophils *in vitro* (45).

The mechanisms of neutrophil apoptosis induced by H_2O_2 are still poorly understood. Recently, Aikawa et al (46) demonstrated that H_2O_2 induced apoptotic death of Jurkat cells. This effect was inhibited by overexpression of human Bcl-2, by silencing of cytochrome c, and by ablation of Bax/Bak, indicating that H_2O_2 -induced apoptosis was mediated by the mitochondrial pathway in Jurkat cells (46). Furthermore, testicular germ cells treated with H_2O_2 were found to be apoptotic and showed an increase in the expression of proapoptotic proteins and cleaved caspase 3 (47). In the present study, treatment of mice with SOD or H_2O_2 enhanced Bax expression and promoted the activation of caspase 3 in leukocytes recovered from the articular cavity. These events were reversed by concomitant administration of catalase, suggesting that H_2O_2 -dependent neutrophil apoptosis in AIA may involve the mitochondrial pathway. However, experiments in different systems will be necessary to confirm the latter possibility, since it was not feasible to purify neutrophils from the articular cavity in adequate numbers in the present study.

Apoptosis can be triggered by inhibition of survival pathways. In leukocytes, including neutrophils, a major survival pathway is dependent on a PI3K/Akt/NF- κ B pathway (24). In the mouse knee joint, there is a correlation between the expression of activated Akt and NF- κ B and the permanence of neutrophils. We have previously shown that the resolution of established in-

flammation was associated with the prevention of signaling via the PI3K/Akt/NF- κ B pathway (29). In the mouse knee joint, PI3K or NF- κ B inhibitors resolved neutrophilic inflammation. Moreover, NF- κ B appeared to be downstream of PI3K, since PI3K inhibitors could prevent NF- κ B translocation. Therefore, neutrophil survival in mice with AIA relies on PI3K-dependent activation of NF- κ B. These results are consistent with the results of other studies showing that Akt can induce cell survival by phosphorylating I κ B kinase and, consequently, activating NF- κ B (48). The activated NF- κ B may then control cell survival via induction of the expression of antiapoptotic genes (24,49). Importantly, increasing H₂O₂ generation by administration of SOD to arthritic mice decreased Akt phosphorylation and NF- κ B activation. Therefore, the ability of H₂O₂ to resolve neutrophilic inflammation in AIA depends on its ability to control PI3K and NF- κ B activation and, consequently, leukocyte survival *in vivo*.

Taken together, our results show that exogenous administration or endogenous generation of H₂O₂ induces resolution of neutrophilic inflammation in AIA. The resolution is due to inhibition by H₂O₂ of a PI3K/NF- κ B survival pathway in neutrophils. Because oxidative stress plays key roles in many chronic inflammatory diseases, antioxidant therapies have frequently been considered as potential agents to treat or prevent such diseases. However, large-scale studies have failed to confirm such theoretical benefits (50). Our observations may help to explain these disappointing results by showing that oxidative stress plays an important role in the resolution of inflammation. Understanding the complex interactions between oxidative stress and inflammation should help in the design of efficient antiinflammatory therapies.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Marina G. M. e Castor, Rodrigo Guabiraba, William Gonçalves, Camila R. C. Nogueira, Juliana P. V. Silva, and Luciana Pádua for help with research.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors were involved in drafting the article or revising it critically for important intellectual content, and all authors approved the final version to be published. Dr. Pinho had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Study conception and design. Lopes, Pinho.

Acquisition of data. Lopes, Coelho, Costa, E. L. M. Vieira, Sousa, Silva.

Analysis and interpretation of data. Lopes, Sousa, L. Q. Vieira, Teixeira, Pinho.

REFERENCES

- Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003;423:356–61.
- Dunlop DD, Manheim LM, Yelin EH, Song J, Chang RW. The costs of arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;49:101–13.
- Kasama T, Miwa Y, Isozaki T, Odai T, Adachi M, Kunkel SL. Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005;4:273–9.
- Kitsis E, Weissmann G. The role of the neutrophil in rheumatoid arthritis. *Clin Orthop Relat Res* 1991;265:63–72.
- Firestein GS. Immunologic mechanisms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol* 2005;11:39–44.
- Coelho FM, Pinho V, Amaral FA, Sachs D, Costa VV, Rodrigues DH, et al. The chemokine receptors CXCR1/CXCR2 modulate antigen-induced arthritis by regulating adhesion of neutrophils to the synovial microvasculature. *Arthritis Rheum* 2008;58:2329–37.
- Wipke BT, Allen PM. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2001;167:1601–8.
- Tanaka D, Kagari T, Doi H, Shimozato T. Essential role of neutrophils in anti-type II collagen antibody and lipopolysaccharide-induced arthritis. *Immunology* 2006;119:195–202.
- Rossi AG, Hallett JM, Sawatzky DA, Teixeira MM, Haslett C. Modulation of granulocyte apoptosis can influence the resolution of inflammation. *Biochem Soc Trans* 2007;35:288–91.
- Fox S, Leitch AE, Duffin R, Haslett C, Rossi AG. Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *J Innate Immun* 2010;2:216–27.
- Droemann D, Hansen F, Aries SP, Braum J, Zabel P, Dalhoff K, et al. Neutrophil apoptosis, activation and anti-inflammatory cytokine response in granulocyte colony-stimulating factor-treated patients with community-acquired pneumonia. *Respiration* 2006;73:340–6.
- Lelekov-Boissard T, Chapuisat G, Boissel JP, Grenier E, Dronne MA. Exploration of beneficial and deleterious effects of inflammation in stroke: dynamics of inflammation cells. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* 2009;367:4699–716.
- Andina N, Conus S, Schneider EM, Fey MF, Simon HU. Induction of Bim limits cytokine-mediated prolonged survival of neutrophils. *Cell Death Differ* 2009;16:1248–55.
- Saudemont A, Okkenhaug K, Colucci F. p110 δ is required for innate immunity to transplantable lymphomas. *Biochem Soc Trans* 2007;35:183–5.
- Guzylack-Piriou L, Balmelli C, McCullough KC, Summerfield A. Type-A CpG oligonucleotides activate exclusively porcine natural interferon-producing cells to secrete interferon- α , tumour necrosis factor- α and interleukin-12. *Immunology* 2004;112:28–37.
- Won HY, Sohn JH, Min HJ, Lee K, Woo HA, Ho YS, et al. Glutathione peroxidase 1 deficiency attenuates allergen-induced airway inflammation by suppressing Th2 and Th17 cell development. *Antioxid Redox Signal* 2010;13:575–87.
- Lasheras C, Huerta JM, Gonzalez S, Brana AF, Patterson AM, Fernandez S. Independent and interactive association of blood antioxidants and oxidative damage in elderly people. *Free Radic Res* 2002;36:875–82.
- Hussain S, Thomassen LC, Ferecatu I, Borot MC, Andreau K, Martens JA, et al. Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells. *Part Fibre Toxicol* 2010;7:10.
- Fang WT, Li HJ, Zhou LS. Protective effects of prostaglandin E₁ on human umbilical vein endothelial cell injury induced by hydrogen peroxide. *Acta Pharmacol Sin* 2010;31:485–92.
- Kim SJ, Jung HJ, Hyun DH, Park EH, Kim YM, Lim CJ. Glutathione reductase plays an anti-apoptotic role against oxidative stress in human hepatoma cells. *Biochimie* 2010;92:927–32.

21. Zhang L, Jiang H, Gao X, Zou Y, Liu M, Liang Y, et al. Heat shock transcription factor-1 inhibits H₂O₂-induced apoptosis via down-regulation of reactive oxygen species in cardiac myocytes. *Mol Cell Biochem* 2011;347:21–8.
22. Al-Mehdi AB, Zhao G, Dodia C, Tozawa K, Costa K, Muzykantov V, et al. Endothelial NADPH oxidase as the source of oxidants in lungs exposed to ischemia or high K⁺. *Circ Res* 1998;83:730–7.
23. Barcelos LS, Talvani A, Teixeira AS, Cassali GD, Andrade SP, Teixeira MM. Production and in vivo effects of chemokines CXCL1-3/KC and CCL2/JE in a model of inflammatory angiogenesis in mice. *Inflamm Res* 2004;53:576–84.
24. Pinho V, Souza DG, Barsante MM, Hamer FP, De Freitas MS, Rossi AG, et al. Phosphoinositide-3 kinases critically regulate the recruitment and survival of eosinophils in vivo: importance for the resolution of allergic inflammation. *J Leukoc Biol* 2005;77:800–10.
25. Sousa LP, Silva BM, Brasil BS, Nogueira SV, Ferreira PC, Kroon EG, et al. Plasminogen/plasmin regulates α -enolase expression through the MEK/ERK pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;337:1065–71.
26. Capetini LS, Cortes SF, Gomes MA, Silva GA, Pesquero JL, Lopes MJ, et al. Neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide is a major endothelium-dependent relaxing factor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;295:2503–11.
27. Tarpey MM, Fridovich I. Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circ Res* 2001;89:224–36.
28. Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of AKT/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 2005;9:59–71.
29. Sousa LP, Carmo AF, Rezende BM, Lopes F, Silva DM, Alessandri AL, et al. Cyclic AMP enhances resolution of allergic pleurisy by promoting inflammatory cell apoptosis via inhibition of PI3K/Akt and NF- κ B. *Biochem Pharmacol* 2009;78:396–405.
30. Fujihara S, Jaffray E, Farrow SN, Rossi AG, Haslett C, Hay RT. Inhibition of NF- κ B by a cell permeable form of I κ B α induces apoptosis in eosinophils. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;326:632–7.
31. Ward C, Walker A, Dransfield I, Haslett C, Rossi AG. Regulation of granulocyte apoptosis by NF- κ B. *Biochem Soc Trans* 2004;32:465–7.
32. Mishiro T, Nakano S, Takahara S, Miki M, Nakamura Y, Yasuoka S, et al. Relationship between cathepsin B and thrombin in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2004;31:1265–73.
33. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002;82:47–95.
34. Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 2000;12:64–76.
35. Niethammer P, Grabher C, Look AT, Mitchison TJ. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature* 2009;459:996–9.
36. Hultqvist M, Backlund J, Bauer K, Gelderman KA, Holmdahl R. Lack of reactive oxygen species breaks T cell tolerance to collagen type II and allows development of arthritis in mice. *J Immunol* 2007;179:1431–7.
37. Ferguson PJ, Lokuta MA, El-Shanti HI, Muhle L, Bing X, Huttenlocher A. Neutrophil dysfunction in a family with a SAPHO syndrome-like phenotype. *Arthritis Rheum* 2008;58:3264–9.
38. Wise CA, Bennett LB, Pacual V, Gillun JD, Bowcock AM. Localization of a gene for familial recurrent arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:2041–5.
39. Goldblatt D, Thrasher AJ. Chronic granulomatous disease. *Clin Exp Immunol* 2000;122:1–9.
40. Dai L, Claxson A, Marklund SL, Feakins R, Yousaf N, Chernajovsky Y, et al. Amelioration of antigen-induced arthritis in rats by transfer of extracellular superoxide dismutase and catalase genes. *Gene Ther* 2003;7:550–8.
41. Singh SK, Lakshmi MG, Saxena S, Swamy CV, Idris MM. Proteome profile of zebrafish caudal fin based on one-dimensional gel electrophoresis LCMS/MS and two-dimensional gel electrophoresis MALDI MS/MS analysis. *J Sep Sci* 2011;34:225–32.
42. Diesen DL, Kuo PC. Nitric oxide and redox regulation in the liver: Part II. Redox biology in pathologic hepatocytes and implications for intervention. *J Surg Res* 2011;167:96–112.
43. Liu G, Beri R, Mueller A, Kamp DW. Molecular mechanisms of asbestos-induced lung epithelial cell apoptosis. *Chem Biol Interact* 2010;188:309–18.
44. Yagami T, Takase K, Yamamoto Y, Ueda K, Takasu N, Okamura N, et al. Fibroblast growth factor 2 induces apoptosis in the early primary culture of rat cortical neurons. *Exp Cell Res* 2010;316:2278–90.
45. Yasui K, Kobayashi N, Yamazaki T, Agematsu K, Matsuzaki S, Ito S, et al. Superoxide dismutase (SOD) as a potential inhibitory mediator of inflammation via neutrophil apoptosis. *Free Radic Res* 2005;39:755–62.
46. Aikawa T, Shinzawa K, Tanaka N, Tsujimoto Y. Noxa is necessary for hydrogen peroxide-induced caspase-dependent cell death. *FEBS Lett* 2010;584:681–8.
47. Maheshwari A, Misro MM, Aggarwal A, Sharma RK, Nandan D. Pathways involved in testicular germ cell apoptosis induced by H₂O₂ in vitro. *FEBS J* 2009;276:870–81.
48. Nair AS, Shishodia S, Ahn KS, Kunnumakkara AB, Sethi G, Aggarwal BB. Deguelin, an Akt inhibitor, suppresses I κ B α kinase activation leading to suppression of NF- κ B-regulated gene expression, potentiation of apoptosis, and inhibition of cellular invasion. *J Immunol* 2006;177:5612–22.
49. Souza DG, Vieira AT, Pinho V, Sousa LP, Andrade AA, Bonjardim CA, et al. NF- κ B plays a major role during the systemic and local acute inflammatory response following intestinal reperfusion injury. *Br J Pharmacol* 2005;145:246–54.
50. Bjelakovic G, Beninati S, Pavlovic D, Kocic G, Jevtovic T, Kamenov B, et al. Glucocorticoids and oxidative stress. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2007;18:115–27.

Resultados ainda não publicados

Com o objetivo de aprofundar nos mecanismos envolvidos na resolução da resposta inflamatória produzimos os resultados que são apresentados abaixo.

Cinética da resposta inflamatória, da produção de espécies reativas de oxigênio, de vias de transdução de sinal e de quimiocinas na AIA

Através da medida do diâmetro do joelho, 12 horas após o desafio com mBSA em animais previamente imunizados, observamos um aumento do edema. Tal edema já não foi mais observado 24 horas após o desafio (Figura 3A). Como já foi mostrado em publicação acima, 48 horas após o desafio já se torna possível observar a resolução da resposta inflamatória. Inversamente proporcional à diminuição de células na cavidade observamos o aumento no número de neutrófilos apoptóticos (Figura 3B).

Por termos observado aumento do número de neutrófilos apoptóticos após 48 horas em seguida buscamos observar a cinética de vias de transdução de sinal já identificadas pelo nosso grupo como sendo importantes para a sobrevivência de neutrófilos em sítios inflamatórios. Nesta cinética, juntamente com o início do pico de células na cavidade articular, observamos o pico da fosforilação de P38 12 horas após o desafio com mBSA. A fosforilação desta via diminui após 24 horas. Após a diminuição da fosforilação de P38 podemos observar, então, a diminuição da fosforilação de ERK1/2 e da AKT, esta última sendo a representante da via da PI3 quinase (Figura 3C).

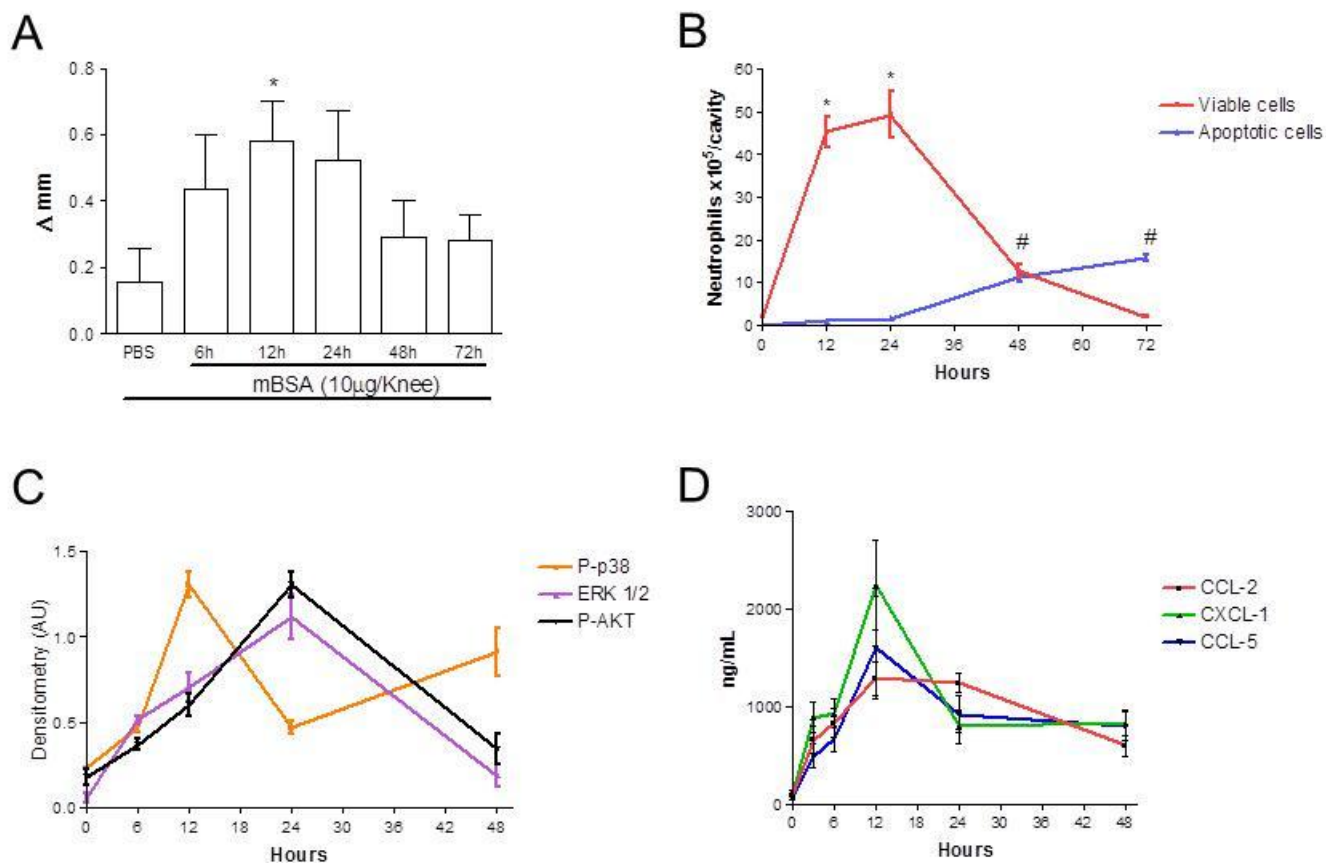


Figura 3: Cinética da resposta inflamatória, de vias de transdução de sinal e de quimiocinas na AIA. O edema articular foi avaliado nos tempos descritos após o desafio com mBSA (10µg/cavidade) (A). O número de neutrófilos e o número de neutrófilos apoptóticos foram avaliados nos tempos descritos após o desafio com mBSA (B). Através de western blot foi avaliada a cinética da ativação das vias da p38, ERK 1/2 e PI3K e foi representado em gráfico a densitometria das bandas (D). Foi avaliada a produção de quimiocinas CCL2, CCL5 e CXCL2 nos tempos descritos (E). Valores expressos em média +/- desvio padrão (n = 5 camundongos por grupo). * P<0,05 em relação ao controle negativo e #P<0,05 em relação ao controle positivo.

A diminuição da sobrevivência de leucócitos em sítios inflamatórios não é o único ponto importante na resolução da resposta. É, também, importante que novas células possam migrar para o sítio. Com isso acompanhamos também a cinética da produção das quimiocinas CXCL1, CCL2 e CCL5. CXCL1 e CCL5 apresentaram pico 12 horas após o desafio, mostrando diminuição 24 horas depois. CCL2 também apresentou pico 12 horas após o desafio, entretanto manteve-se em platô até 24 horas, mostrando diminuição apenas 48 horas depois (Figura 3D). A cinética dessas quimiocinas corrobora com a cinética observada da resolução da resposta na AIA.

Espécies reativas de oxigênio influenciam na resolução da resposta inflamatória por inibir vias de transdução de sinal

A administração de apocinina, um inibidor da enzima NADPH oxidase, 12 horas após o desafio manteve o número de células na cavidade articular mesmo após 48 horas, mostrando, assim como observamos em publicação acima, que a ausência de espécies reativas de oxigênio contribui para o atraso da resolução da resposta inflamatória (Figura 4A). Além disso, observamos que Z-vad, um inibidor de caspases, administrado juntamente com H_2O_2 mantém o número de células na cavidade articular (Figura 4B) e inibe seu efeito apoptótico (Figura 4C). Esse dado, juntamente com outros anteriormente descritos, nos mostram que a apoptose induzida por H_2O_2 é dependente da ativação de caspase.

A administração de H_2O_2 também inibiu as vias de transdução de sinal que foram identificadas por nosso grupo como importantes para a sobrevivência de leucócitos em sítios inflamatórios, e que mostraram cinética que corrobora com a resolução natural na Figura 1. As MAP quinases P38 e ERK1/2 e a via da PI3 quinase (Figura 4D). Além de inibir vias de sobrevivência e induzir apoptose de neutrófilos na AIA, a administração de H_2O_2 diminuiu a produção das quimiocinas CXCL1, CCL2 e CCL5 (Figura 4E), o que pode estar evitando que novas células migrem para o sítio, um dos pontos fundamentais para a resolução da resposta inflamatória.

Em uma das publicações apresentadas acima mostramos que a partir da primeira hora após o desafio com mBSA em animais imunizados já é possível observar o aumento da hipernocicepção através de teste de pressão crescente na pata dos animais. Este aumento na hipernocicepção apresentou um pico após sete dias e se manteve presente ainda após 20 dias. A administração de H_2O_2 , além de diminuir o número de células na cavidade por induzir a apoptose, além de diminuir o número de novas

células que migrariam para a cavidade por reduzir a produção de quimiocinas, também reduziu a hipernociceção dois dias após o desafio (Figura 4F).

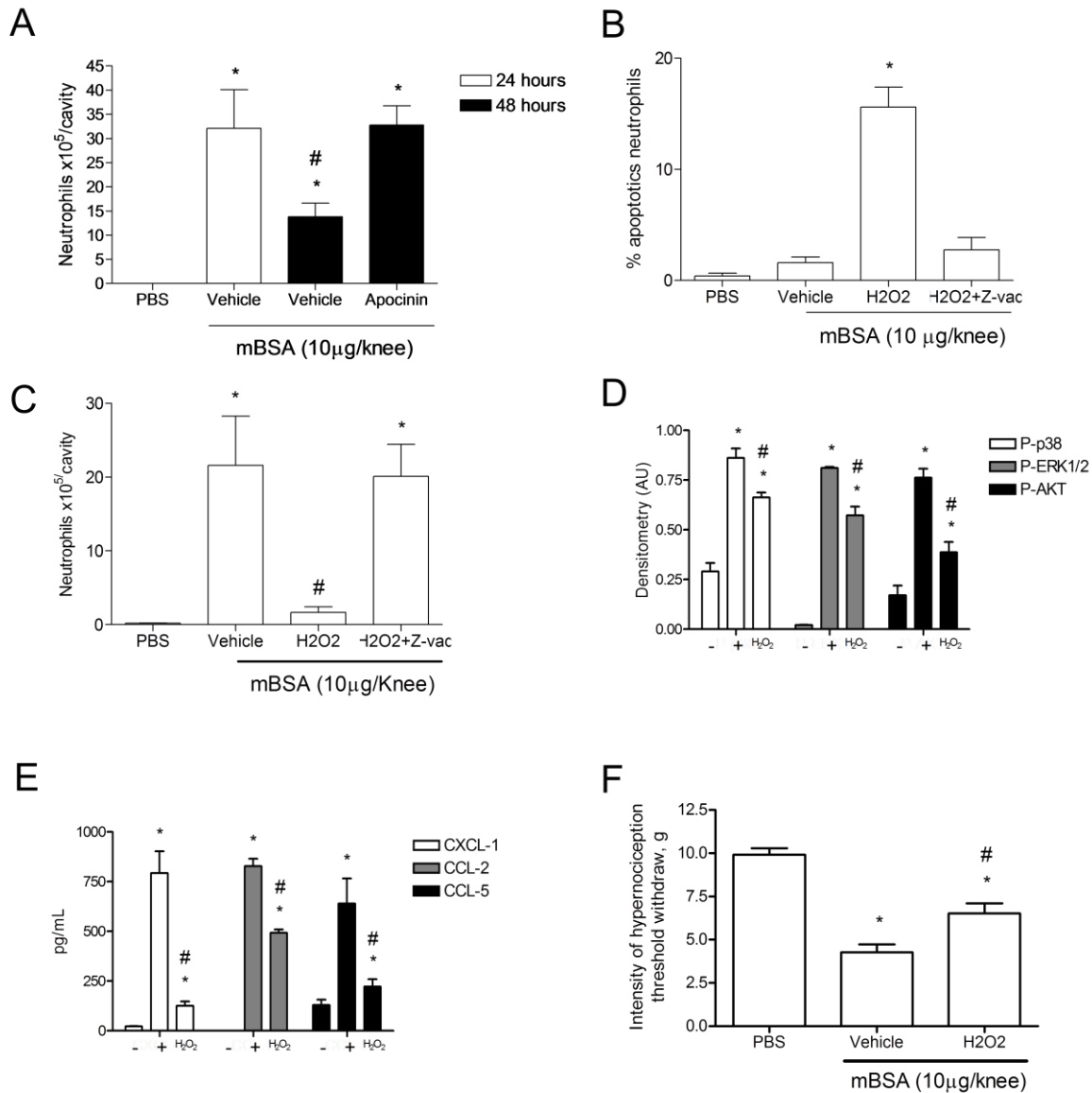


Figura 4: Espécies reativas de oxigênio influenciam na resolução da resposta inflamatória por aumentar a apoptose e inibir vias de transdução de sinal, levando a diminuição de quimiocinas e inibindo a hipernociceção. O número de neutrófilo na cavidade articular foi avaliado 24 e 48 horas após o desafio, sendo que 12 após o desafio foi administrado apocinina (A). O número de neutrófilos na cavidade articular (B) bem como o número de neutrófilos apoptóticos (C) foram avaliadas 24 horas após o desafio com mBSA, sendo que os animais foram pós tratados com H₂O₂ ou H₂O₂+Z-vad ou veículo, 12 horas após o desafio. 12 horas após o desafio os animais foram tratados com H₂O₂ ou veículo e 3 horas após o tratamento foi recolhido células da cavidade articular para avaliação por western blot das vias de

transdução de sinal celular descritas (D). 12 horas após o desafio os animais foram tratados com H_2O_2 e o tecido periarticular recolhido 12 horas após o tratamento para análise, por ELISA, das quimiocinas descritas (E). H_2O_2 inibe a hipernocicepção na AIA. Os animais foram tratados com H_2O_2 ou veículo 12 horas após o desafio com mBSA. A hipernocicepção foi avaliada dois dias depois. Valores expressos em média +/- desvio padrão (n = 5 camundongos por grupo). * $P < 0,05$ em relação ao controle negativo e # $P < 0,05$ em relação ao controle positivo.

Inibição farmacológica e sequência de ativação das vias de transdução de sinal importantes para a sobrevivência de neutrófilos

Como o objetivo de verificamos se as vias de transdução de sinal são realmente importantes na resolução da resposta inflamatória observada pela administração de H_2O_2 tratamos animais previamente imunizados, 12 horas após o desafio com mBSA, com os inibidores LY294002 (inibidor de PI3 quinase), UO126 (inibidor de ERK1/2), e SB203580 (inibidor de P38). O tratamento com esses inibidores diminuiu o número de neutrófilos e aumentou o número de eventos apoptóticos observados no lavado da cavidade articular. Isso mostrou a importância da ativação dessas vias para a sobrevivência de neutrófilos na AIA. A inibição leva a apoptose e resolução. Entretanto, tal inibição acontece de forma sequenciada. Podemos observar tal afirmação por analisar a ativação das vias após o uso de inibidores específicos. O tratamento com LY294002 inibiu a fosforilação de PI3K e ERK1/2, mas não inibiu a fosforilação de P38. O tratamento com UO126 inibiu a fosforilação de ERK1/2 e PI3K, mas também não inibiu a fosforilação de P38. Já o tratamento com SB203580, que não inibe a fosforilação de P38, mas sim a ativação subsequente da via, também inibiu a fosforilação de ERK1/2 e PI3K. Esses resultados mostram que a fosforilação de P38 antecede a fosforilação de ERK1/2 e PI3K, assim como foi observado na cinética da resolução natural mostrada na Figura 2.

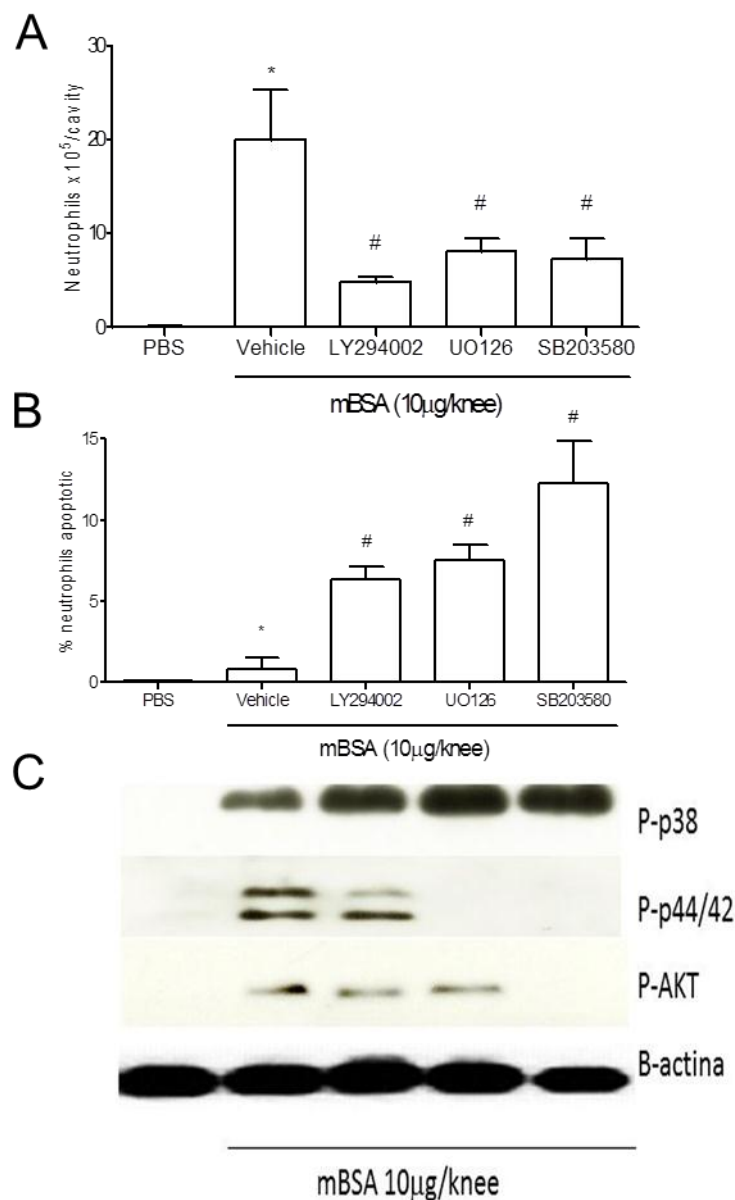


Figura 5. Inibição farmacológica e sequência de ativação das vias de transdução de sinal importantes para a sobrevivência de neutrófilos. Os animais foram desafiados e tratados com os inibidores citados 12 horas depois. Após 3 horas as células foram recolhidas para avaliação do número de neutrófilo (A), avaliação do número de neutrófilos apoptóticos (B) e ativação das vias de transdução de sinal apresentadas (C). Valores expressos em média +/- desvio padrão (n = 5 camundongos por grupo). * P<0,05 em relação ao controle negativo e # P<0,05 em relação ao controle positivo.

Resolução da resposta inflamatória da AIA não dependente de lipoxinas

Buscamos também saber se a resolução seria dependente da produção de lipoxinas. Para isso, inicialmente, usamos os animais deficientes em SOCS-2. Essa proteína, além de outras funções, participa da transdução de sinal ligado a lipoxinas (McBERRY e col., 2012). Os animais deficientes em SOCS-2 quando imunizados e desafiados com mBSA apresentaram resolução da resposta inflamatória no mesmo tempo que os animais selvagens, ou seja, 48 horas após a indução da AIA o número de neutrófilos na cavidade articular (Figura 6A), bem como no tecido periarticular (Figura 6B), já havia retornado a valores basais. Assim pudemos perceber que a resolução natural não é dependente de SOCS-2. Vale ressaltar que a resposta inflamatória nestes animais é menor que em animais selvagens. Ainda não sabemos se a imunização é menos efetiva ou se tais animais apresentam menor recrutamento celular. Isso será investigado futuramente.

Administramos, também, em animais selvagens submetidos à AIA tratados com SOD um antagonista de receptores ALX, que têm ação tanto na lipoxina A4 e anexina1 (BOC-1) (SOUZA e col., 2007). Os animais que receberam SOD e também BOC-1 tiveram resolução igual aos animais que somente receberam SOD, ou seja, BOC-1 não inibiu a resolução induzida por SOD nem no acúmulo de neutrófilos na cavidade articular (Figura 6C) quanto no tecido periarticular (Figura 6D), nos mostrando que a resolução induzida pelo aumento na quantidade de H_2O_2 também não é dependente da produção de lipoxinas ou anexina 1.

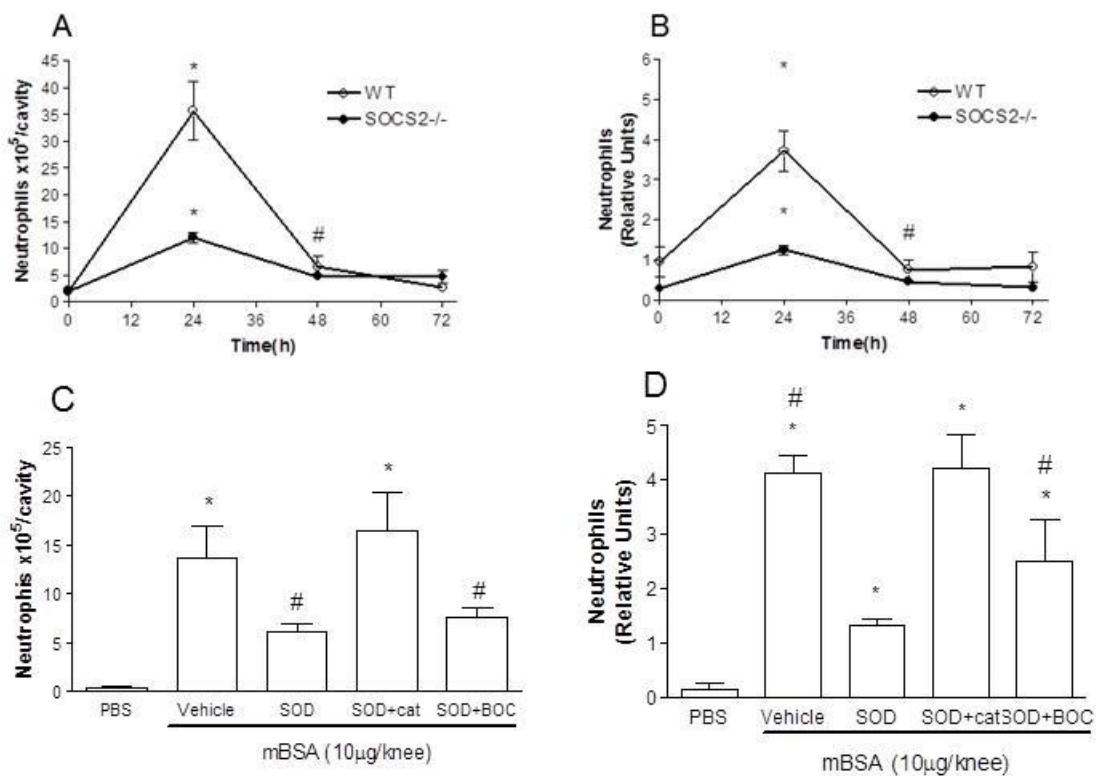


Figura 6: Resolução da resposta inflamatória na AIA não dependente de lipoxinas. Número de neutrófilos na cavidade articular, analisados pela contagem diferencial de leucócitos (A), e relativo no tecido periarticular, analisados pela atividade de MPO (B), em camundongos selvagens e deficientes em SOC-2 imunizados e desafiados com mBSA ou solução salina estéril analisados nos diferentes tempos após o desafio. Os resultados são expressos em média \pm SEM com 4 a 5 animais por grupo. * $P < 0,05$ quando comparado com camundongos controle. # $P < 0,05$ quando comparado com o pico de 24 horas. Número de neutrófilos na cavidade articular, analisados pela contagem diferencial de leucócitos (C), e relativo no tecido periarticular, analisados pela atividade de MPO (D), em camundongos selvagens imunizados tratados com SOD, SOD + catalase e SOD + BOC 12 horas após o desafio com mBSA ou solução salina estéril analisados 24 horas após o desafio. Valores expressos em média \pm desvio padrão ($n = 5$ camundongos por grupo). * $P < 0,05$ quando comparado com camundongos controle. # $P < 0,05$ quando comparado com veículo.

H₂O₂ induz apoptose e inibe vias de transdução de sinal em neutrófilos humanos

Após observarmos os efeitos do H₂O₂ em neutrófilos na AIA buscamos saber se teria efeito similar em neutrófilos humanos. Para isso cultivamos neutrófilos humanos por seis horas sem e com H₂O₂ em diferentes concentrações (0,01; 0,1 e 1 mM) H₂O₂ induziu apoptose em neutrófilos humanos de forma concentração dependente (Figura 7A). Observamos que a apoptose acontece por inibição de vias de transdução de sinal

de forma tempo dependente. Uma hora após o tratamento com H_2O_2 na cultura inibiu a ativação da p38, via que se mostrou primária no modelo murino. (Figura 7B).

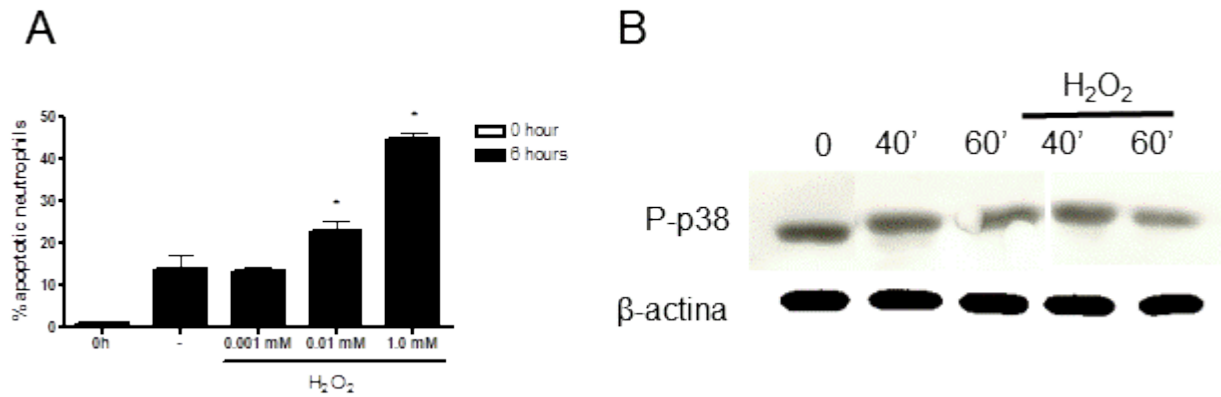


Figura 7. H_2O_2 induz apoptose e inibi vias de transdução de sinal em neutrófilos humanos. Neutrófilos humanos foram cultivados sem ou com uma concentração crescente de H_2O_2 e avaliado a apoptose após 6 horas (A). Neutrófilos foram cultivados por 20, 40 e 60 minutos, sem e com 1mM de H_2O_2 e foi avaliado a ativação de P38. Valores expressos em média \pm desvio padrão (n = 5 camundongos por grupo). * $P < 0,05$ em relação ao controle negativo.

Com base nas publicações e resultados observados acima traçamos um sequência de ativação das vias de transdução de sinal que pode ser observada na Figura 8. Quando há ativação de p38 ocorre fosforilação de p44/42 que por sua vez ativa AKT. Esta última ativa NF- κ B levando os neutrófilos à sobrevivida.

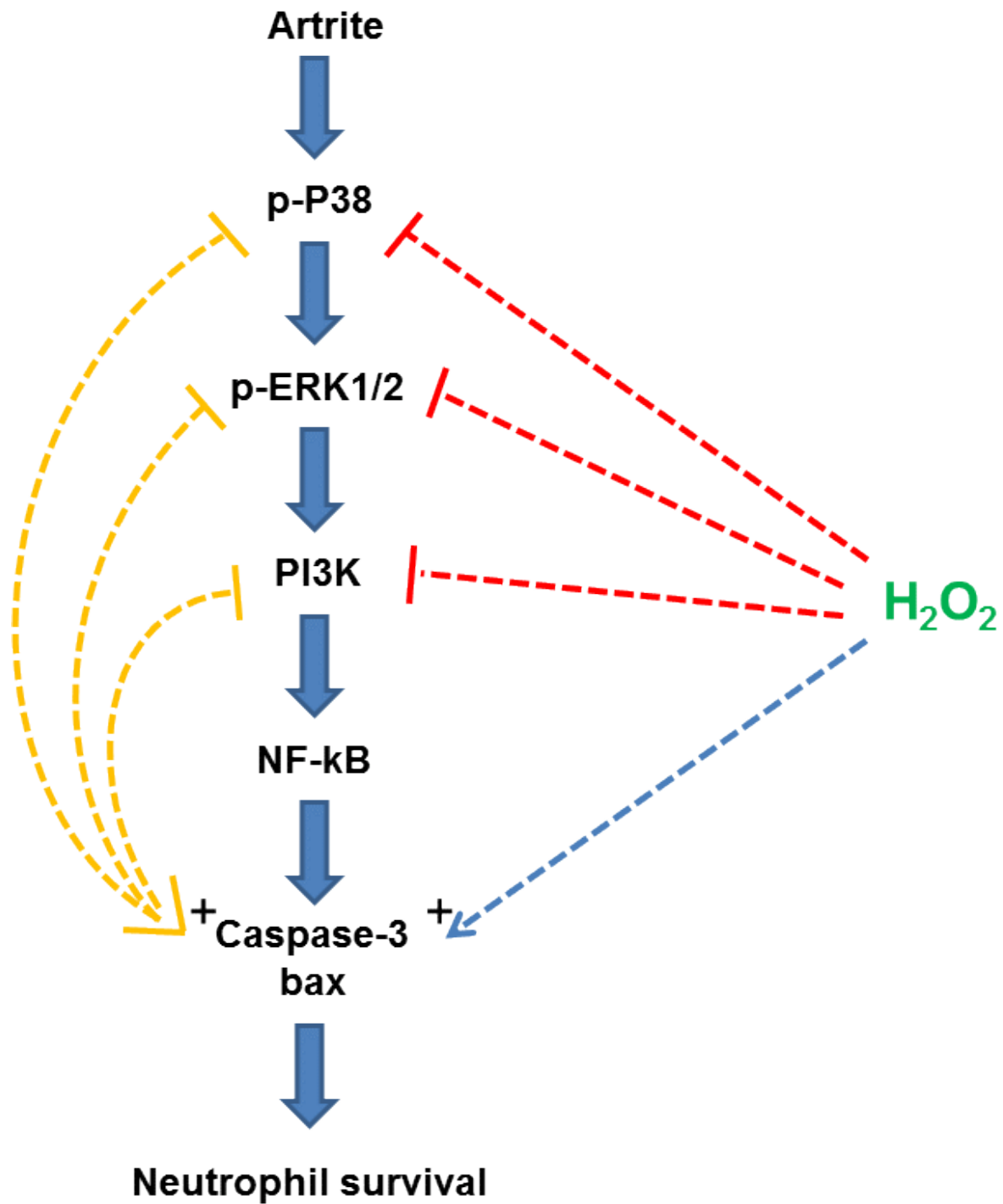


Figura 8. Modelo da resolução da resposta inflamatória induzida por SOD/H₂O₂ durante a AIA. O aumento de H₂O₂ inibi a fosforilação de p38. A inibição da fosforilação de p38, por sua vez, inibi a fosforilação de p44/42 que inibi a fosforilação de AKT. Com tais inibições o NF-kB não é ativado inibindo a sobrevida de neutrófilos. SOD/ H₂O₂ também ativam caspase-3 e bax que também inibem a sobrevida de neutrófilos.

Discussão

Na presente tese caracterizamos um novo modelo comportamental que permite a quantificação da hipernocicepção articular após a indução de AIA em camundongos. A AIA induziu hipernocicepção, que é dependente do tempo e da dose do antígeno, foi associada a um significativo infiltrado de células inflamatórias e hiperplasia sinovial. Usando esse modelo, mostramos um papel cooperativo entre o influxo de neutrófilos e a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β em dirigir a inflamação do tecido e a hipernocicepção.

Após o entendimento dos mecanismos envolvidos na resposta inflamatória e na hipernocicepção induzidas pela AIA, tivemos também grande interesse em uma compreensão dos mecanismos envolvidos na sobrevivência de neutrófilos. Um dos pontos inovadores do nosso estudo é o tratamento ter sido feito no pico de acúmulo de neutrófilo. Esta estratégia é importante uma vez que na clínica, não se sabe quando o paciente irá inflamar e, quando este procura atendimento, a inflamação já está instalada.

Dentro destes mecanismos observamos que a H₂O₂ é um mediador importante para a resolução da resposta inflamatória neutrofílica. A inibição com apocinina ou com catalase atrasou a resolução. Animais deficientes que não produzem espécies reativas de oxigênio também apresentaram atraso na resolução. Estudos anteriores demonstraram que os baixos níveis de produção de ROS, devido à deficiência em p47phox do complexo de NADPH-oxidase, foram associados com a gravidade da artrite (HULTQVIST, e col., 2007). A resolução da inflamação por H₂O₂ induz moléculas pró-apoptóticas e consequente apoptose de neutrófilos. Mecanicamente, a apoptose dos neutrófilos é devido à inibição de vias de transdução de sinal e ativação de moléculas pro-apoptóticas por H₂O₂.

SEHRAN E SAVILL no artigo intitulado “Resolution of inflammation: the beginning programs the end” (2005) colocaram que o programa de resolução se inicia nas

primeiras horas depois que começa a inflamação. Mediadores inflamatórios importantes para o início da resposta podem mudar seu perfil durante o processo inflamatório, e ativar vias pró-resolutivas, como acontece com mediadores lipídicos dependentes da 5-lipoxigenase. Já é sabido que H_2O_2 é um importante mediador pró-inflamatório (O'NEIL, 2011), e agora mostramos que este também pode mudar seu perfil e desligar vias de sobrevivência após a inflamação estabelecer seu pico máximo.

Os resultados demonstrados aqui em camundongos deficientes em subunidades de NADPH oxidase nos remetem a doenças humanas crônicas nas quais existem defeitos genéticos que levam a produção diminuída de espécies reativas de oxigênio, como síndrome SAPHO e os neutrófilos contribuem para sua patogênese (sinovite, acne, pustulose, hiperostose e osteíte) (FERGUNSON e col., 2008) e PAPA síndrome (artrite piogênica, pioderma gangrenoso, e acne) (MARZANO e col., 2012). A doença granulomatosa crônica é também o resultado de uma falha do sistema enzimático na NADPH oxidase de fagócitos fazendo com que o paciente desenvolva granulomas inflamatórias (BADALZADEH e col., 2012). Portanto, uma incapacidade de produzir espécies reativas de oxigênio parece explicar a prolongada inflamação neutrofílica e maior gravidade observadas em camundongos deficientes em gp91phox.

Os mecanismos de apoptose de neutrófilos induzida por H_2O_2 são ainda pouco compreendidos. Recentemente, Aikawa e col. (2010) demonstraram apoptose induzida por H_2O_2 em células Jurkat. Esse efeito foi inibido por superexpressão de Bcl-2 humana, por silenciamento de citocromo c e por inibição de Bax / Bak, o que indica que a apoptose induzida por H_2O_2 foi mediada pela via mitocondrial. Além disso, as células germinativas testiculares tratadas com H_2O_2 mostraram-se apoptóticas e mostraram um aumento na expressão de proteínas próapoptóticas e caspase3 clivada (MAHESHWARI e col., 2009). No presente estudo, o tratamento de camundongos com SOD ou o próprio H_2O_2 promoveu a ativação de Bax e a expressão de caspase 3 clivada em leucócitos recuperados da cavidade articular. Ao administrar H_2O_2 juntamente com o inibidor de caspase (Z-vad) a resolução foi adiada. Estes eventos foram revertidos pela administração concomitante de catalase, o que sugere que na

AIA a apoptose de neutrófilos induzida por de H_2O_2 também está associada à via mitocondrial.

A apoptose pode ser desencadeada por inibição das vias de sobrevivência. Em leucócitos, incluindo neutrófilos, algumas vias de sobrevivência são dependentes de PI3 quinase/Akt, MAP quinase/ERK1/2 e MAP quinase / P38. Estas vias acabam convergindo na ativação do fator de transcrição NF- κ B (COPE e col., 2012). Na articulação do joelho de camundongos, existe uma correlação entre a fosforilação de Akt, ERK1/2 e P38 com a ativação de NF- κ B e a permanência de neutrófilos. Nosso grupo mostrou previamente a correlação de vias na resolução da inflamação (VAGO e col., 2012). Na articulação do joelho de camundongos, inibidores de PI3 quinase, ERK1/2, P38 e NF- κ B adiantou a resolução da inflamação neutrofílica. Além disso, a ativação dessas vias parece acontecer de forma sequenciada, uma vez que o uso de inibidores específicos mostraram essa sequência. NF- κ B parece ser o ponto abaixo destas vias, uma vez que os inibidores de PI3 quinase, a última da sequência traçada, também inibiu a translocação de NF- κ B para o núcleo. Assim, a sobrevivência de neutrófilos em camundongos com AIA depende da ativação de P38, ERK1/2 e PI3 quinase, levando a ativação de NF- κ B. Estes resultados são consistentes com a resultados de outros estudos que mostram que Akt pode induzir sobrevivência de células por fosforilar I κ B e, conseqüentemente, ativar NF- κ B (NAIR e col., 2006). A ativação de NF- κ B pode, em seguida, controlar a sobrevivência celular através da indução da expressão de genes antiapoptóticos (SOUSA e col., 2010). Importammentemente, o aumentando de H_2O_2 em camundongos artríticos diminuiu a fosforilação das vias acima citadas e a ativação de NF- κ B. Portanto, a capacidade de H_2O_2 em resolver a inflamação neutrofílica na AIA depende de sua capacidade de controlar a ativação de vias de sobrevivência e NF- κ B levando, conseqüentemente, a apoptose de leucócitos *in vivo*.

A inibição das vias de transdução de sinal e a ativação de caspase 3 e bax pela administração de H_2O_2 levou os neutrófilos a apoptose e desencadearam a resolução da resposta inflamatória na AIA. Acreditamos que a apoptose de neutrófilos levou a

uma diminuição de quimiocinas, levando a um fenômeno muito importante para a concretização da resolução, o bloqueio de migração de novas células. A resolução inflamatória por H_2O_2 levou a uma preservação de estruturas comumente lesadas na AIA, como a membrana sinovial, e levou a diminuição da hipernocicepção. Somado aos resultados de que H_2O_2 também induz apoptose em neutrófilos humanos cultivados por inibir as vias de sobrevivência, os resultados desse trabalho são um grande apoio para futuras terapias em doenças inflamatórias que têm o neutrófilo como célula chave.

Conclusão

Concluimos com essa tese que a hipernocicepção gerada pela artrite induzida por antígeno é dependente da liberação de citocinas e quimiocinas e pela migração de neutrófilos, e que a resolução da resposta inflamatória durante a AIA é dependente de H_2O_2 , espécie reativa de oxigênio que inibe vias de sobrevivência, gerando consequente apoptose dessas células.

Referências:

Aikawa T, Shinzawa K, Tanaka N, Tsujimoto Y. Noxa is necessary for hydrogen peroxide-induced caspase-dependent cell death. *FEBS Lett.* 2010 Feb 19;584(4):681-8.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts.K. & Walter. P. *Molecular Biology of the cell.* 4.ed. Garland Science, 2002

Arazna M, Pruchniak MP, Zycinska K, Demkow U. Neutrophil extracellular trap in human diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2013;756:1-8.

Badalzadeh M, Fattahi F, Fazlollahi MR, Tajik S, Bemanian MH, Behmanesh F, Movahedi M, Houshmand M, Pourpak Z. Molecular Analysis of Four Cases of Chronic Granulomatous Disease Caused by Defects in NCF-2: The Gene Encoding the p67-phox. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2012 Dec;11(4):340-4.

Chen L, Vicente-Manzanares M, Potvin-Trottier L, Wiseman PW, Horwitz AR. The integrin-ligand interaction regulates adhesion and migration through a molecular clutch. *PLoS One.* 2012;7(7):e40202.

Cope AP. Signal transduction pathways in chronic inflammatory rheumatic diseases. *Open Rheumatol J.* 2012;6:207-8.

Costigan M, Moss A, Latremoliere A, Johnston C, Verma-Gandhu M, Herbert TA, Barrett L, Brenner GJ, Vardeh D, Woolf CJ, Fitzgerald M. T-cell infiltration and signaling in the adult dorsal spinal cord is a major contributor to neuropathic pain-like hypersensitivity. *J Neurosci.* 2009 Nov 18;29(46):14415-22.

Cullen KA, McCool J, Anwer MS, Webster CR. Activation of cAMP-guanine exchange factor confers PKA-independent protection from hepatocyte apoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004 Aug;287(2):G334-43.

Cunha TM, Verri WA Jr, Silva JS, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Feb 1;102(5):1755-60.

De Luca T, Morre DM, zhao H, Morre DJ. NAD⁺/NADH and/or CoQ/CoQH₂ ratios from plasma membrane electron transport may determine ceramide and sphingosine-1-phosphate levels accompanying G1 arrest and apoptosis. *Biofactors*. 2005;25(1-4):43-60.

Dutta J., Fan Y., Gupta N., Fan G., and Gelinas C., Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB, *Oncogene* 2006. 25(6800-6816).

Ekert PG, Vaux DL. The mitochondrial death squad: hard-ened killers or innocent bystanders? *Curr Opin Cell Biol* 2005;17:626–30.

Elkhawad M, Rudd JH, Sarov-Blat L, Cai G, Wells R, Davies LC, Collier DJ, Marber MS, Choudhury RP, Fayad ZA, Tawakol A, Gleeson FV, Lepore JJ, Davis B, Willette RN, Wilkinson IB, Sprecher DL, Cheriyan J. Effects of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibition on Vascular and Systemic Inflammation in Patients With Atherosclerosis. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2012 Sep;5(9):911-22.

Elliott ER, Van Ziffle JA, Scapini P, Sullivan BM, Locksley RM, Lowell CA. Deletion of Syk in neutrophils prevents immune complex arthritis. *J Immunol*. 2011 Oct 15;187(8):4319-30.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

English D, Andersen BR. Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradient of ficoll-hypaque. *J Immunol Methods* 1974; 5:249.

Fang J, Han D, Hong J, Tan Q, Tian Y. The chemokine, macrophage inflammatory protein-2gamma, reduces the expression of glutamate transporter-1 on astrocytes and increases neuronal sensitivity to glutamate excitotoxicity. *J Neuroinflammation*. 2012 Dec 12;9(1):267.

Felson DT. Comparing the prevalence of rheumatic diseases in China with the rest of the world. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(1):106.

Ferguson PJ, Lokuta MA, El-Shanti HI, Muhle L, Bing X, Huttenlocher A. Neutrophil dysfunction in a family with a SAPHO syndrome-like phenotype. *Arthritis Rheum*. 2008 Oct;58(10):3264-9.

Fialkow, L., Wang, Y., Downey, G.P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radical Biology & Medicine* 42 (2007) 153-164.

Frenzel, A.; Grespi, F.; Chmielewski, W.; Villunger, A. Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. *Apoptosis*, v. 14, n. 4, p. 584-596, 2009.

Fyhrquist N, Wolff H, Lauerma A, Alenius H. CD8+ T Cell Migration to the Skin Requires CD4+ Help in a Murine Model of Contact Hypersensitivity. *PLoS One*. 2012;7(8):e41038. Epub 2012 Aug 20.

Gilroy, D. W., Lawrence, T., Perretti, M. & Rossi, A. G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nature Rev. Drug Discov*. 3, 401–416 (2004).

Griffin GK, Newton G, Tarrio ML, Bu DX, Maganto-Garcia E, Azcutia V, Alcaide P, Gracie N, Luscinskas FW, Croce KJ, Lichtman AH. IL-17 and TNF- α sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation. *J Immunol*. 2012 Jun 15;188(12):6287-99.

Guerra AN, Gavala ML, Chung HS, Bertics PJ. Nucleotide receptor signalling and the generation of reactive oxygen species. *Purinergic Signal*. 2007 Mar;3(1-2):39-51.

Guerreiro R, Santos-Costa Q, Azevedo-Pereira JM. [The_chemokines_and their receptors:_characteristics_and physiological functions]. *Acta Med Port*. 2011 Dec;24 Suppl 4:967-76. Epub 2011 Dec 31. Review. Portuguese.

Holl EK, Roney KE, Allen IC, Steinbach E, Arthur JC, Buntzman A, Plevy S, Frelinger J, Ting JP. Plexin-B2 and Plexin-D1 in_dendritic cells: expression and IL-12/IL-23p40_production. *PLoS One*. 2012;7(8):e43333.

Hultqvist M, Backlund J, Bauer K, Gelderman KA, Holmdahl. Lack of reactive oxygen species breaks T cell tolerance to collagen type II and allows development of arthritis in mice. *J Immunology*, 2007, 179: 1431-1437.

Isobe Y, Kato T, Arita M. Emerging roles of eosinophils and eosinophil-derived lipid mediators in the resolution of inflammation. *Front Immunol*. 2012;3:270. Epub 2012 Aug 28.

Jiang C, Huang H, Liu J, Wang Y, Lu Z, Xu Z. Adverse events of pirfenidone for the treatment of pulmonary fibrosis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One*. 2012;7(10):e47024. doi: 10.1371/journal.pone.0047024.

Johnson MD, Kim P, Tourtellotte W, Federspiel CF. Transforming growth factor beta and monocyte chemotactic protein-1 are elevated in cerebrospinal fluid of immunocompromised patients with HIV-1 infection. *J NeuroAIDS*. 2004;2(4):33-43.

Kekow J, Mueller-Ladner U, Schulze-Koops H. Rituximab is more effective than second_anti-TNF_therapy_in rheumatoid arthritis patients and previous_TNF α blocker failure. *Biologics*. 2012;6:191-9.

Kerr, J. F. R.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, v. 26, p. 239-257, 1972.

Kouskoff V, Korganow AS, Duchatelle V, Degott C, Benoist C, Mathis D. Organspecific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell*. 1996;87(5):811-822.

Lawrence, T., Gilroy, D.W. Chronic inflammation: a failure of resolution. *Int. J. Exp. Path.* (2007), 88: 85-94.

Lesuis N, Befrits R, Nyberg F, van Vollenhoven RF. Gender and the treatment of immune-mediated chronic inflammatory diseases: rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease and psoriasis: an observational study. *BMC Med*. 2012 Aug 1;10:82.

Lin Q, Liu Y, Moore DJ, Elizer SK, Veach RA, Hawiger J, Ruley HE. Cutting Edge: The "Death" Adaptor CRADD/RAIDD Targets BCL10 and Suppresses Agonist-Induced Cytokine Expression in T Lymphocytes. *J Immunol*. 2012 Feb 8.

Liu X, Li Q, Dowdell K, Fischer ER, Cohen JI. Varicella-Zoster Virus ORF12 Protein Triggers Phosphorylation of ERK1/2 and Inhibits Apoptosis. *J Virol*. 2012 Jan 11.

Loeser JD, Treede RD. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*. 2008 Jul 31;137(3):473-7. doi: 10.1016/j.pain.2008.04.025.

Maheshwari A, Misro MM, Aggarwal A, Sharma RK, Nandan D. Pathways involved in testicular germ cell apoptosis induced by H₂O₂ in vitro. *FEBS J*. 2009 Feb;276(3):870-81.

Martin N, Ruddick A, Arthur GK, Wan H, Woodman L, Brightling CE, Jones DJ, Pavord ID, Bradding P. Primary human airway epithelial cell-dependent inhibition of human lung mast cell degranulation. *PLoS One*. 2012;7(8):e43545.

Marzano AV, Ishak RS, Colombo A, Caroli F, Crosti C. Pyoderma Gangrenosum, Acne and Suppurative Hidradenitis Syndrome following Bowel Bypass Surgery. *Dermatology*. 2012 Nov 16.

McBerry C, Gonzalez RM, Shryock N, Dias A, Aliberti J. SOCS2-induced proteasome-dependent TRAF6 degradation: a common anti-inflammatory pathway for control of innate immune responses. *PLoS One*. 2012;7(6):e38384.

Melet, A.; Song, K.; Bucur, O.; Jagani, Z.; Grassian, A. R.; Khosravi-Far, R. Apoptotic pathways in tumor progression and therapy. *Adv Exp Med Biol*, v. 615, p. 47-79, 2008.

Misharin AV, Haines K 3rd, Rose S, Gierut A, Hotchkiss RS, Perlman H. Development of a new humanized mouse model to study acute inflammatory arthritis. *J Transl Med*. 2012 Sep 13;10(1):190.

Nair AS, Shishodia S, Ahn KS, Kunnumakkara AB, Sethi G, Aggarwal BB. Deguelin, an Akt inhibitor, suppresses I κ B kinase activation leading to suppression of NF- κ B-regulated gene expression, potentiation of apoptosis, and inhibition of cellular invasion. *J Immunol* 2006;177:5612–22.

Nakano M, Fujii T, Hashimoto M, Yukawa N, Yoshifuji H, Ohmura K, Nakaizumi A, Mimori T. Type I interferon induces CX3CL1 (fractalkine) and CCL5 (RANTES) production in human pulmonary vascular endothelial cells. *Clin Exp Immunol*. 2012 Oct;170(1):94-100

Oh J, Yu T, Choi SJ, Yang Y, Baek HS, An SA, Kwon LK, Kim J, Rho HS, Shin SS, Choi WS, Hong S, Cho JY. Syk/Src pathway-targeted inhibition of skin inflammatory responses by carnosic acid. *Mediators Inflamm*. 2012;2012:781375.

Oliveira PG, Grespan R, Pinto LG, Meurer L, Brenol JC, Roesler R, Schwartzmann G, Cunha FQ, Xavier RM. Protective effect of RC-3095, an antagonist of the gastrin-releasing peptide receptor, in experimental arthritis. *Arthritis Rheum*. 2011 Oct;63(10):2956-65.

O'Neill LA. A critical role for citrate metabolism in LPS signalling. *Biochem J.* 2011 Sep 15;438(3):e5-6.

Pinho, V., Souza D.G., Barsante, M.M., Hamer, F.P., De Freitas, M.S., Rossi, A.G., Teixeira, M.M. Phosphoinositide-3 kinases critically regulate the recruitment and survival of eosinophil in vivo: importance for the resolution of allergic inflammation. *J Leukoc Biol.* 2005 77(5):800-10.

Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds* 2005;4:138–44

Rohrbach AS, Hemmers S, Arandjelovic S, Corr M, Mowen KA. PAD4 is not essential for disease in the K/BxN murine autoantibody-mediated model of arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2012 May 2;14(3):R104.

Rolland, S. G.; Conradt, B. New role of the BCL2 family of proteins in the regulation of mitochondrial dynamics. *Curr Opin Cell Biol*, v. 22, n. 6, p. 852-858, 2010.

Rose CE Jr, Lannigan JA, Kim P, Lee JJ, Fu SM, Sung SS. Murine lung eosinophil activation and chemokine production in allergic airway inflammation. *Cell Mol Immunol.* 2010 Sep;7(5):361-74.

Rubio-Moscardo F, Blesa D, Mestre C, Siebert R, Balasas T, Benito A, Rosenwald A, Climent J, Martinez JI, Schilhabel M, Karran EL, Gesk S, Esteller M, deLeeuw R, Staudt LM, Fernandez-Luna JL, Pinkel D, Dyer MJ, Martinez-Climent JA. Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in Bcell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood* 2005;106:3214–22.

Sallusto F, Mackay CR. Chemoattractants and their receptors in homeostasis and inflammation. *Current Opinion in Immunology.* 2004;16(6):724-731.

Salmi M and Jalkanen S. Ectoenzymes controlling leukocyte traffic. *Eur. J. Immunol.* 2012. 42: 284–292.

Schulte D, Küppers V, Dartsch N, Broermann A, Li H, Zarbock A, Kamenyeva O, Kiefer F, Khandoga A, Massberg S, Vestweber D. Stabilizing the VE-cadherin-catenin complex blocks leukocyte extravasation and vascular permeability. *EMBO J.* 2011 Aug 19;30(20):4157-70.

Schwab JM, Chiang N, Arita M, Serhan CN. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature.* 2007 Jun 14;447(7146):869-74.

Scott DL, Kingsley GH. Tumor necrosis factor inhibitors for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2006 Aug 17;355(7):704-12. Review.

Serhan, C. N. & Savill, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature Immunol.* 2005 6, 1191–1197.

Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 2005;9:59–71.

Sousa LP, Carmo AF, Rezende BM, Lopes F, Silva DM, Alessandri AL, Bonjardim CA, Rossi AG, Teixeira MM, Pinho V. Cyclic AMP enhances resolution of allergic pleurisy by promoting inflammatory cell apoptosis via inhibition of PI3K/Akt and NF- κ B. *Biochemical Pharmacology* 2009. 78:396–405

Sousa LP, Lopes F, Silva DM, Tavares LP, Vieira AT, Rezende BM, Carmo AF, Russo RC, Garcia CC, Bonjardim CA, Alessandri AL, Rossi AG, Pinho V, Teixeira MM. PDE4 inhibition drives resolution of neutrophilic inflammation by inducing apoptosis in a PKA-PI3K/Akt-dependent and NF- κ B-independent manner. *Journal of Leukocyte Biology.* 2010. 87:895-904.

Souza DG, Fagundes CT, Amaral FA, Cisalpino D, Sousa LP, Vieira AT, Pinho V, Nicoli JR, Vieira LQ, Fierro IM, Teixeira MM. The required role of endogenously produced lipoxin A4 and annexin-1 for the production of IL-10 and inflammatory hyporesponsiveness in mice. *J Immunol.* 2007 Dec 15;179(12):8533-43.

Stein C, Schäfer M, Machelska H. Attacking_pain_at its source: new perspectives on opioids. *Nat Med.* 2003 Aug;9(8):1003-8. Review.

Subramanian H, Grailer JJ, Ohlrich KC, Rymaszewski AL, Loppnow JJ, Kodera M, Conway RM, Steeber DA. Signaling through L-selectin mediates enhanced chemotaxis of lymphocyte subsets to secondary lymphoid tissue chemokine. *J Immunol.* 2012 Apr 1;188(7):3223-36.

Sulowska Z, Majewska E, Klink M, Banasik M, Tchórzewski H. Flow cytometric evaluation of human_neutrophil_apoptosis during nitric oxide generation in vitro: the role of exogenous antioxidants. *Mediators Inflamm.* 2005 Jun 9;2005(2):81-7.

Vago JP, Nogueira CR, Tavares LP, Soriani FM, Lopes F, Russo RC, Pinho V, Teixeira MM, SousaLP. Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis. *J Leukoc Biol.* 2012 Aug;92(2):249-58.

Verri WA Jr, Cunha TM, Parada CA, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacol Ther.* 2006 Oct;112(1):116-38.

Ward C, Walker A, Dransfield I, Haslett C, Rossi AG. Regulation of granulocyte apoptosis by NF-kappaB. *BiochemSoc Trans* 2004;32:465-7.

Wolf J, Weinberger B, Arnold CR, Maier AB, Westendorp RG, Grubeck-Loebenstein B. The effect of chronological age on the inflammatory response of human_fibroblasts. *Exp Gerontol.* 2012 Sep;47(9):749-53.

Yasui K, Kobayashi N, Yamazaki T, Agematsu K, Matsuzaki S, Ito S, Nakata S, Baba A, Koike K. Superoxide dismutase (SOD) as a potential inhibitory mediator of inflammation via neutrophil apoptosis. *Free Radic Rec.* 2005 Jul;39(7):755-62

Yasui K., Baba A. Therapeutic potential of superoxide dismutase (SOD) for resolution of inflammation. *Inflamm. res.* 55 (2006) 359–363

Zhang S, Li H, Yang SJ. Tribulosin suppresses apoptosis via PKC epsilon and ERK1/2 signaling pathway during hypoxia/reoxygenation in neonatal rat ventricular cardiac myocytes. *J Asian Nat Prod Res.* 2011 Dec;13(12):1135-45.