

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Avaliação da atividade farmacológica de  
uma família de proteínas ligantes de  
quimiocinas derivada da saliva de  
carrapato**

**ALUNA: Ana Letícia de Oliveira Figueiredo Alessandri**

**Belo Horizonte  
2007**

Avaliação da atividade farmacológica de uma família de  
proteínas ligantes de quimiocinas derivada da saliva de  
carrapato

Tese apresentada à comissão de Pós-  
Graduação em Fisiologia e Farmacologia  
do Instituto de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Minas Gerais, para  
obtenção do grau de doutor em ciências.

Aluna: Ana Letícia de Oliveira Figueiredo Alessandri

Orientador: Dr. Mauro Martins Teixeira

Dedico este trabalho á memória do meu avô Admildo

### Agradecimentos

Ao professor Mauro Martins Teixeira, por toda paciência, bom humor e generosidade. Por fazer do Laboratório de Imunofarmacologia um ambiente tão agradável de trabalhar. Agradeço imensamente pelos conselhos e por nos unir numa grande e diversificada família.

Ao professor André Klein, que tão pacientemente me instruiu nos meus primeiros experimentos. Por ter me acolhido e ter sido meu mentor, além, é claro, por ser meu querido amigo.

À professora Denise Carmona do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, por possibilitar a realização dos ensaios de microscopia intravital em seu laboratório.

Ao professor Geovani Dantas Cassali do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, por colaborar tão gentilmente nas preparações histopatológicas.

À professora Maria Salete de A. Castro do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, por ser tão atenciosa e acolhedora. Por possibilitar a realização de diversos experimentos em seu laboratório.

Às professoras Deborah Negrão Correa, Virgínia Soares Lemos e Walderez Ornelas Dutra do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, pelos proveitosos comentários feitos durante o exame de qualificação.

Aos meus queridos amigos, que fizeram ou fazem parte do Laboratório de Imunofarmacologia, Adriana Carvalho, Adriana Soares, Adriano, Aline, André Talvani, Antônio, Caio, Caroline, Cris, Dani Sachs, Dani Souza, Daniel, David, Dora, Fernanda, Fernando, Flávio Amaral, Flávio Lopes, Ester, Ildeu, Ilma, Kátia, Kênia Pompermayer, Landa, Lucíola, Márcia, Marina, Michele, Norine, Rafael, Rodrigo, Tiça, Val, Vanessa Mendonça e Vívian. Como eu agradeço a cada um de vocês, pelas várias horas que passamos juntos, as brincadeiras e as colaborações despretensiosas. Aprendi com vocês o quanto é importante trabalhar em equipe, ser tolerante e respeitar as particularidades de cada um.

Vocês contribuíram não só na execução de uma técnica, mas com uma palavra encorajadora ou mesmo com uma idéia inusitada. Agradeço por vocês serem tão acolhedores de fazerem do Laboratório de Imunofarmacologia o meu segundo lar.

Em especial gostaria de demonstrar minha gratidão ao Remo, Vanessa e Angélica pela ajuda direta e laboriosa nos experimentos. Pela amizade e disponibilidade.

Agradeço, mais uma vez, à Dani Souza e Vanessa, por terem lido o manuscrito da tese.

Ao Sr José Alves e sua esposa Edna por todo carinho ao longo de tanto anos. Por serem tão acolhedores e divertidos. Os seus ensinamentos serão sempre guardados com zelo.

À família Goulart de Oliveira Costa por ter me acolhido com tanto amor. Por contribuírem na minha formação científica e pessoal.

Às minhas amigas Alessandra, Carol, Elisa, e Geane. Por me acompanharem a tanto tempo, por estarem sempre presentes, pelo apoio e carinho. Também agradeço ao Tutis, Anderson e Neimar pela amizade.

À minha família, mãe, avó, tia Leila, tio Alcino, Júlia e Tiago por me encorajar e pelo amor incondicional. Em especial à Claudinha por ter transformado a minha vida e, por me ter como espelho e orgulho.

À Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

Aos agentes financiadores desse projeto: CAPES, CNPq e FAPEMIG e Merck-Serono.

## **Memória**

“As coisas tangíveis tornam-se insensíveis à palma da mão.  
Mas as coisas findas, muita mais que lindas essas ficarão”

Carlos Drummond de Andrade

## Resumo

As quimiocinas participam de uma ampla série de eventos fisiológicos bem como do processo patológico de várias doenças, apresentando-se, assim, como possíveis alvos para novas estratégias terapêuticas. Alguns tipos de vírus e o *Schistosoma mansoni* burlam o sistema imune do hospedeiro produzindo proteínas que seletivamente neutralizam as quimiocinas que medeiam o processo inflamatório. Os carrapatos possuem em sua saliva uma grande variedade de agentes como as proteínas ligantes de quimiocinas que permitem com que eles se alimentem por longo período de tempo sem serem percebidos pelo sistema imunológico do hospedeiro. Através de uma biblioteca de cDNA construída a partir da glândula salivar do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* foram identificadas três proteínas ligantes de quimiocinas chamadas Evasinas que não apresentam homologia estrutural às proteínas já descritas. Ao contrário das proteínas ligantes de quimiocinas virais e do *Schistosoma mansoni*, esta família apresenta uma grande seletividade de seus membros quanto aos ligantes. Estudos *in vitro* mostram que a Evasina-1 liga-se à MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL4 e PARC/CCL18. A Evasina-3 liga-se à IL-8/CXCL8 e GRO- $\alpha$ /CXCL1 e homólogos murinos (KC/CXCL1-3 e MIP-2/CXCL1-2). Já a Evasina-4 liga-se à eotaxina/CCL11 e RANTES/CCL5. No presente trabalho, nós avaliamos a atividade farmacológica das evasinas em diferentes modelos de inflamação. A Evasina-1 inibiu o recrutamento celular induzido por MIP-1 $\alpha$ /CCL3, bem como diminuiu a inflamação em modelos de hipersensibilidade do tipo tardia e fibrose pulmonar induzida pela bleomicina. De maneira semelhante, a Evasina-3 e a Evasina-4 preveniram o influxo de neutrófilos ou eosinófilos, respectivamente, induzido por fatores quimiotáticos ou por antígeno em animais sensibilizados. Assim, essas novas proteínas ligantes de quimiocinas, que são menores que os recentemente descobertos anticorpos naturais de camelos que possuem apenas a cadeia pesada, apresentam atividade farmacológica *in vivo* e são eficazes em reduzir a inflamação em modelos animais. As evasinas podem ser relevantes como estratégias antiinflamatórias no futuro e úteis no planejamento de novos arcaouços estruturais através do planejamento molecular racional.

**Abstract**

The chemokines are involved in physiologic events and pathologic process of many diseases. Then, they are potential targets to new therapeutics strategies. Several virus and *Schistosoma mansoni* subvert their host immune system by producing proteins that selectively neutralize the chemokines that mediate inflammatory process. The ticks present in their saliva many agents, such as chemokines binding proteins that allow them to feed for long periods of time without are detected by immunologic systems of host. Through cDNA library from the salivary glands of the tick *Rhipicephalus sanguineus* were identified three chemokines binding proteins called, Evasins, that don't have structural homology with any known proteins. Unlike viral and *Schistosoma mansoni* chemokines binding proteins this family present high selectivity to their ligands. *In vitro* studies showed that Evasin-1 binds to MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL4 and PARC/CCL18. The Evasin-3 binds to IL-8/CXCL8 and GRO- $\alpha$ /CXCL1 and their murine homologous (KC/CXCL1-3 and MIP-2/CXCL1-2). The Evasin-4 binds to eotaxin/CCL11 and RANTES/CCL5. In the present work we evaluated the pharmacological activity of evasins in different inflammation models. The Evasin-1 inhibited the cellular recruitment induced by MIP-1 $\alpha$ /CCL3 and decreased the inflammation in delayed type hypersensitivity models and bleomycin induced pulmonary fibrosis. In a similar way, Evasin-3 and Evasin-4 prevented the neutrophil and eosinophil influx, respectively, induced by chemotactic factors or by antigen in sensitized animals. Then, these chemokines binding proteins, which are smaller than the natural camel antibodies that present only heavy chain, have pharmacological activity *in vivo* and are effective in reducing inflammation in animal models. The evasins could be relevant anti-inflammatory strategies in the future and useful for the creation of new scaffolds through rational design.



**Sumário**

Lista de figuras e tabelas.....	1
Lista de abreviaturas.....	4
<b>I. Introdução</b>	
1) O processo inflamatório.....	7
1.1) Mediadores inflamatórios.....	8
1.2) Recrutamento celular .....	9
2) Quimiocinas.....	11
2.1) Receptores de quimiocinas.....	13
2.2) Funções biológicas das quimiocinas.....	17
2.2.1) MIP-1 $\alpha$ /CCL3.....	18
2.2.2) Eotaxina/CCL11.....	20
2.2.3) IL-8/CXCL8.....	22
3) Estratégias utilizadas para interferir no sistema de quimiocinas.....	24
3.1) Pequenas moléculas como antagonistas de receptores de quimiocinas.....	24
3.2) Proteínas modificadas.....	28
3.3) Anticorpos.....	29
3.4) Proteínas ligantes de quimiocinas.....	30
<b>II. Justificativa e objetivos.....</b>	<b>34</b>
<b>III. Material e Métodos</b>	
1) Animais.....	37
2) Drogas e reagentes.....	37
3) Migração de leucócitos para a cavidade peritoneal induzida por MIP-1 $\alpha$ /CCL3.....	37
4) Microscopia intravital.....	38
4.1) Análise histopatológica.....	39
5) Reação de hipersensibilidade do tipo tardia na cavidade pleural induzida por mBSA.....	40
5.1) Citometria de fluxo.....	41

5.2) Análise dos resultados de FACS.....	42
6) Reação de hipersensibilidade do tipo tardia na pata.....	43
7) Sensibilização e indução de recrutamento celular do tipo TH2 para os pulmões.....	44
8) Modelo experimental de fibrose pulmonar induzida por bleomicina.....	45
8.1) Lavado broncoalveolar.....	45
8.2) Retirada do pulmão e processamento das amostras.....	46
8.3) Ensaio para detecção dos níveis de n-acetilglicosaminidase (NAG) tecidual.....	46
8.4) Ensaio para detecção dos níveis de mieloperoxidase (MPO) tecidual.....	47
8.5) Citometria de fluxo.....	47
8.5.1) Análise dos resultados de FACS.....	48
8.6) Detecção de citocinas e quimiocinas.....	48
8.7) Análise histopatológica e morfométrica.....	49
9) Indução do recrutamento celular para a cavidade articular induzido por KC.....	50
10) Indução do recrutamento celular para a cavidade pleural induzido por lipopolissacarídeo (LPS) ou eotaxina/CCL11.....	51
11) Sensibilização e indução do recrutamento celular para a cavidade pleural induzido por ovalbumina (OVA).....	52
12) Análise estatística.....	54

#### IV. Resultados

1) Efeito da Evasina-1 sobre o recrutamento de leucócitos induzido por MIP-1 $\alpha$ /CCL3.....	56
2) Efeito da Evasina-1 sobre o processo de rolamento, adesão e migração de leucócitos induzido por MIP-1 $\alpha$ /CCL3.....	61
3) Efeito da Evasina-1 sobre a reação de hipersensibilidade do tipo tardia convencional.....	64
4) Efeito da Evasina-1 sobre a reação de hipersensibilidade do tipo tardia alternativa.....	67
5) Efeito do pré-tratamento com a Evasina-1 sobre a lesão pulmonar induzida pela bleomicina.....	69
5.1) Efeito do pré-tratamento com a Evasina-1 sobre o recrutamento celular induzido pela bleomicina.....	70

5.2) Efeito do pré-tratamento com a Evasina-1 sobre a produção de citocinas induzido pela bleomicina.....	73
5.3) Efeito do pré-tratamento com a Evasina-1 sobre a produção de quimiocinas induzido pela bleomicina.....	75
5.4) Efeito do pré-tratamento com a Evasina-1 sobre a lesão pulmonar e fibrose induzida pela bleomicina.....	77
5.5) Efeito do pré-tratamento com a Evasina-1 sobre a sobrevivência dos animais instilados com a bleomicina.....	81
6) Efeito do tratamento tardio com a Evasina-1 sobre a lesão pulmonar induzida pela bleomicina.....	83
7) Efeito da Evasina-3 sobre o recrutamento de neutrófilos.....	85
8) Efeito da Evasina-3 sobre o recrutamento de leucócitos induzido por antígeno....	88
9) Efeito da Evasina-4 sobre o recrutamento de eosinófilos.....	89
10) Efeito da Evasina-4 sobre o recrutamento de eosinófilos induzido por antígeno...	91
V. Discussão.....	93
VI. Conclusão.....	108
VII. Referências.....	110
VIII. Anexos.....	147

### Lista de figuras e tabelas

#### ❖ Figuras

Figura 1: Representação esquemática do mecanismo de recrutamento de leucócitos através do endotélio.

Figura 2: Representação esquemática das estruturas secundárias das quatro famílias de quimiocinas existentes.

Figura 3: Quimiocinas quanto a sua classificação e seus receptores.

Figura 4: Receptores de quimiocinas, seus ligantes, sua associação a doenças e fármacos desenvolvidos que interferem no sistema de quimiocinas e fase de testes clínicos.

Figura 5: Perfil da distribuição celular no gráfico de tamanho *versus* granulosidade.

Figura 6: Efeito da administração intraperitoneal de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 humano sobre recrutamento de granulócitos para a cavidade peritoneal.

Figura 7: Efeito do pré-tratamento com a Evasina-1 sobre o recrutamento de granulócitos para a cavidade peritoneal induzido pelo MIP-1 $\alpha$ /CCL3 humano em camundongos Balb/C.

Figura 8: Efeito do pré-tratamento com a Evasina-1 sobre o recrutamento de granulócitos para a cavidade peritoneal induzido pelo MIP-1 $\alpha$ /CCL3 humano em camundongos C57B6.

Figura 9: Efeito do pré-tratamento com a Evasina-1 sobre o recrutamento de granulócitos para a cavidade peritoneal induzido pelo MIP-1 $\alpha$  murino em camundongos Balb/C.

Figura 10: Efeito da Evasina-1 sobre o rolamento, adesão e emigração de leucócitos no músculo cremaster induzido por MIP-1 $\alpha$ /CCL3 humano.

Figura 11: Análise histopatológica do músculo cremaster de animais submetidos à microscopia intravital à partir de cortes corados com hematoxilina & eosina.

Figura 12: Efeito do tratamento com a Evasina-1 sobre o recrutamento de granulócitos, mononucleares, células CD3<sup>+</sup>, células CD3/CD4<sup>+</sup>, células CD3/CD8<sup>+</sup> e células CD11b<sup>+</sup> para a cavidade pleural induzido pelo antígeno em animais sensibilizados.

Figura 13: Efeito do tratamento com a Evasina-1 sobre o volume da pata induzido pelo antígeno em animais sensibilizados.

Figura 14: Efeito do tratamento com a Evasina-1 sobre o recrutamento de mononucleares e eosinófilos para os pulmões induzido pelo antígeno em animais sensibilizados.

Figura 15: Efeito do pré-tratamento com a Evasina-1 sobre o recrutamento de neutrófilos e mononucleares para o espaço alveolar e quantidade de mieloperoxidase e N-acetilglicosaminidase no pulmão induzido pela bleomicina.

Figura 16: Efeito do pré-tratamento com a Evasina-1 sobre o recrutamento de células CD3<sup>+</sup>, células CD3/CD4<sup>+</sup>, células CD3/CD8<sup>+</sup> e células CD11b<sup>+</sup> para o espaço alveolar induzido pela bleomicina.

Figura 17: Efeito do pré-tratamento com a Evasina-1 sobre a produção das citocinas TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  mensuradas no espaço alveolar induzido pela bleomicina.

Figura 18: Efeito do pré-tratamento com a Evasina-1 sobre a produção das quimiocinas MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MCP-1/JE/CCL2 e RANTES/CCL5 mensuradas no espaço alveolar induzido pela bleomicina.

Figura 19: Efeito do pré-tratamento com a Evasina-1 sobre a lesão pulmonar avaliada através de cortes histológicos corados com hematoxilina & eosina.

Figura 20: Efeito do pré-tratamento com a Evasina-1 sobre a deposição de colágeno pulmonar avaliada através de cortes histológicos corados Tricrômico de Gomori.

Figura 21: Efeito do pré-tratamento com a Evasina-1 sobre a deposição de colágeno pulmonar avaliada através da análise morfométrica de cortes histológicos corados com Tricrômico de Gomori.

Figura 22: Efeito do pré-tratamento com a Evasina-1 sobre a letalidade dos animais submetidos à fibrose pulmonar induzida pela bleomicina.

Figura 23: Efeito do pré-tratamento com a Evasina-3 sobre o recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular induzido por KC/CXCL1-3.

Figura 24: Efeito do pré-tratamento com a Evasina-3 sobre o recrutamento de neutrófilos para a cavidade pleural induzido por LPS.

Figura 25: Efeito do pré-tratamento com a Evasina-3 sobre o recrutamento de granulócitos para a cavidade pleural induzido pelo antígeno em animais sensibilizados.

Figura 26: Efeito do pré-tratamento com a Evasina-4 sobre o recrutamento de eosinófilos para a cavidade pleural induzido por eotaxina/CCL11 humana.

Figura 27: Efeito do tratamento com a Evasina-4 sobre o recrutamento de eosinófilos para a cavidade pleural induzido pelo antígeno em animais sensibilizados.

### **❖ Tabela**

Tabela I: Nomenclatura atual e antiga para quimiocinas humanas.

Tabela II: Efeito do pós-tratamento com a Evasina-1 (10 µg por animal) sobre o recrutamento celular, produção de citocinas e quimiocinas e deposição de colágeno induzidos pela instilação intratraqueal de bleomicina 0,0625 U por animal.

### Lista de abreviaturas

- ❖ AMPc: monofosfato cíclico de adenosina
- ❖ AP-1: proteína ativadora-1
- ❖ BSA: albumina de soro bovino
- ❖ °C: graus Celsius
- ❖ C5a: fragmento 5a do complemento
- ❖ Ca<sup>2+</sup>: íon cálcio
- ❖ CCR3: receptor de quimiocinas CCR 3
- ❖ cDNA: ácido desoxirribonucléico codificante
- ❖ CXCR2: receptor de quimiocinas CXCR 2
- ❖ DAG: diacilglicerol
- ❖ DNA: ácido desoxirribonucléico
- ❖ EAE: esclerose auto-imune experimental
- ❖ EDTA: ácido etilenodiaminotetracético
- ❖ ELISA: ensaio de imunoabsorção ligado à enzima
- ❖ g: gramas
- ❖ GAG: glicosaminoglicano
- ❖ GM-CSFR: receptor do fator estimulador de colônias de macrófagos-granulócitos
- ❖ GRO: “growth-regulated oncogene”
- ❖ h: horas
- ❖ 5-HETE: 5 hidroxieicosatetraenóico
- ❖ 15-HETE: 15 hidroxieicosatetraenóico
- ❖ HIV-1: vírus da imunodeficiência humana 1
- ❖ ICAM-1: molécula de adesão intercelular 1
- ❖ Ig( ): imunoglobulina
- ❖ IL(-): interleucina
- ❖ IFN- $\gamma$ : interferon gama
- ❖ i.p.: intraperitoneal
- ❖ IP<sub>3</sub>: 1,4,5-inositol trifosfato
- ❖ i.pl.: intrapleural
- ❖ i.v.: intravenosa
- ❖ kDa: quilo Dalton

- ❖ LPS: lipopolissacarídeo
- ❖ LTB<sub>4</sub>: leucotrieno B<sub>4</sub>
- ❖ LTC<sub>4</sub>: leucotrieno C<sub>4</sub>
- ❖ M: molar
- ❖ MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno
- ❖ µg: microgramas
- ❖ µL: microlitros
- ❖ mg: miligramas
- ❖ mBSA: albumina bovina metilada
- ❖ min: minutos
- ❖ mL: mililitros
- ❖ mRNA: ácido ribonucléico mensageiro
- ❖ NF-κB: fator nuclear κB
- ❖ NKA: neurocinina A
- ❖ NKB: neurocinina B
- ❖ nm: nanômetros
- ❖ OPD: o-fenilenediamino
- ❖ OVA: ovalbumina
- ❖ PAF: fator de ativação plaquetária
- ❖ PBS: tampão fosfato de sódio
- ❖ PECAM-1: molécula de adesão celular endotélio-plaqueta 1
- ❖ pH: potencial hidrogeniônico
- ❖ PI3K: fosfatidilinositol 3 quinase
- ❖ PKC: proteína quinase C
- ❖ PLC( ): fosfolipase C
- ❖ s.c.: subcutânea
- ❖ SCF: “stem cell factor”
- ❖ SEA: antígeno do ovo do *Schistosoma mansoni*
- ❖ SP: substância P
- ❖ Th( ): “célula T helper”
- ❖ TNF-α: fator de necrose tumoral α
- ❖ VCAM-1: molécula de adesão de células vasculares 1
- ❖ VLA-4: “very late antigen-4”



# **I. Introdução**

### 1) O processo inflamatório

A inflamação é uma designação geral para o conjunto de eventos que ocorre em tecidos vascularizados após uma lesão (mecânica, física ou química), infecções ou estimulação imunológica, a fim de eliminar o agente agressor e restabelecer a integridade tecidual (Abbas *et al.*, 2000). Embora, em geral, a inflamação constitua um mecanismo defensivo muito importante contra inúmeras agressões, em muitos casos a reação instalada pode ser maléfica, culminando em doenças debilitantes (ex: artrite reumatóide) ou mesmo levando ao óbito (Filho, 1998; Gerard & Rollins, 2001).

Ao nível macroscópico, a resposta inflamatória é geralmente acompanhada pelos sinais e sintomas cardinais: eritema, edema, sensação de calor, dor e alterações funcionais do tecido acometido (Filho, 1998).

O processo inflamatório é um fenômeno multi-mediado, no qual ocorre uma participação orquestrada de vários mediadores que se distribuem temporalmente e espacialmente, a fim de promoverem a iniciação, amplificação e resolução do evento.

Quando ocorre lesão tecidual, uma série evolutiva de mecanismos é ativada. A reação inflamatória local caracteriza-se primeiramente por uma vasoconstrição arteriolar passageira, causada pela contração do músculo liso vascular. Subseqüentemente, ocorre vasodilatação arteriolar que promove o aumento do fluxo de sangue para a área agredida, gerando hiperemia e fluxo sanguíneo rápido. Este fenômeno é seguido por um período em que a vasodilatação é mantida, mas a velocidade da circulação diminui. Já nas fases iniciais da hiperemia é possível observar alterações no endotélio vascular culminando na exsudação de líquidos para o tecido adjacente. Segue-se então, nas vênulas pós-capilares, a marginação leucocitária, processo em que os leucócitos deixam a região central da corrente de sangue e começam a se deslocar na margem do fluxo. Estes leucócitos rolam ao longo do endotélio e, posteriormente migram de forma direcional e seletiva do leito vascular para o interstício, sendo este evento referido como diapedese (Filho, 1998).

Após o recrutamento celular, os leucócitos presentes no tecido são ativados, tornando-se fontes importantes de vários mediadores inflamatórios. Além de promoverem destruição de um patógeno, podem contribuir para danificar os tecidos adjacentes e, portanto, aumentarem a gravidade dos sinais e sintomas (Cara *et al.*, 2000). Adicionalmente, alguns tipos celulares, como macrófagos e neutrófilos exercem importante atividade fagocítica que contribui para a destruição de patógenos, bem como na remoção de restos celulares e teciduais (Abbas *et al.*, 2000).

Finalmente, são iniciados os eventos de reparação e remodelamento tecidual mediante a substituição do tecido lesado por tecido conjuntivo vascularizado. O qual pode resultar em regeneração do tecido danificado, em reparo tecidual funcional (normal), ou em casos patológicos, pode resultar em cicatrização excessiva, insuficiente ou mesmo ausente, podendo comprometer o funcionamento normal do órgão. (Filho, 1998).

### 1.1) Mediadores inflamatórios

Mediadores inflamatórios são moléculas solúveis que atuam de forma local ou sistêmica, promovendo, controlando e modificando a inflamação. Estes mediadores podem se originar do plasma, de células inflamatórias ou do próprio tecido lesado (Abbas *et al.*, 2000).

Os primeiros mediadores liberados após a lesão tecidual são as aminas vasoativas (por exemplo: histamina) liberadas a partir de grânulos pré-formados de mastócitos, basófilos e plaquetas. Concomitantemente, sistemas enzimáticos derivados do plasma como o sistema do complemento, a cascata de coagulação e as vias fibrinolíticas e das cininas são ativadas e seus produtos de clivagem serão os mediadores propriamente ditos que promoverão as respostas inflamatórias características do sistema (Rang *et al.*, 2001).

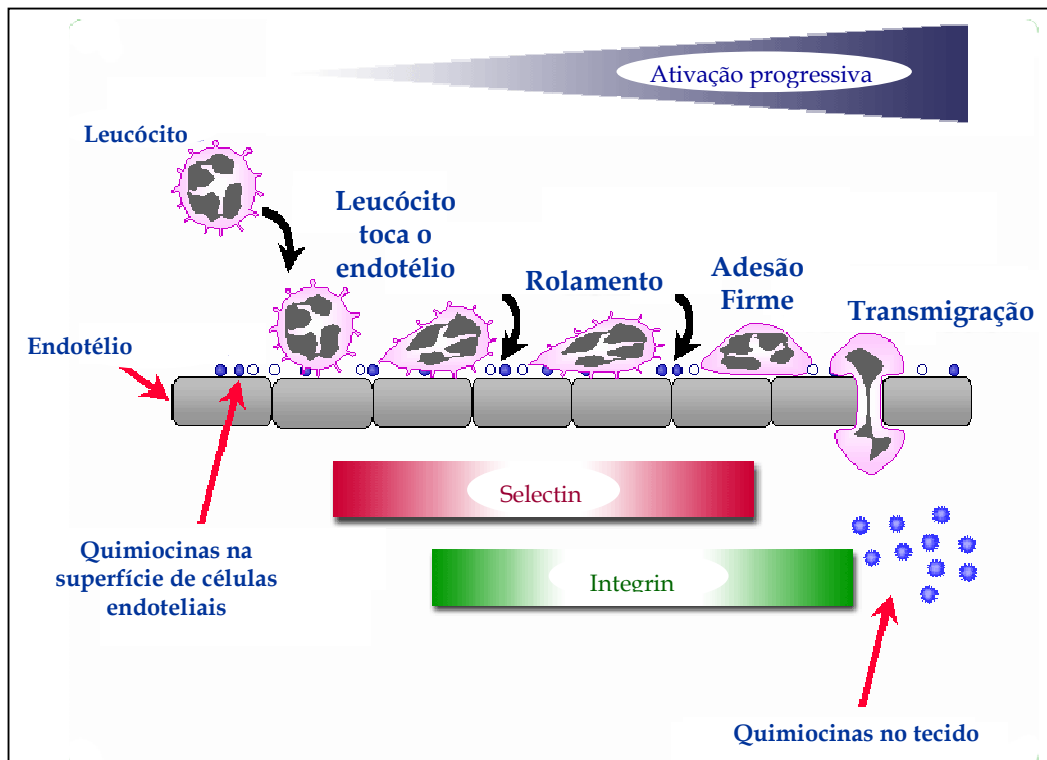
Os mediadores lipídicos, (por exemplo: prostaglandinas, leucotrienos e fator ativador plaquetário - PAF), os protéicos (citocinas e quimiocinas) e o óxido nítrico necessitam de nova síntese quando requeridos. Além disso, os leucócitos recrutados para o sítio inflamatório podem ser ativados e liberarem seus conteúdos granulares e espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio diretamente no interstício ou dentro dos fagossomos (Abbas *et al.*, 2000).

Além dos mediadores da inflamação supracitados é também válido ressaltar a participação da família de peptídeos chamada taucinininas, que inclui a substância P, neurocinina A e neurocinina B. Quando estes mediadores são liberados de forma antidrômica dos neurônios sensitivos sensíveis à capsaicina, produzem uma variedade de respostas características da inflamação, sendo chamada de inflamação neurogênica (Harrison & Geppetti, 2001). Assim, podemos observar que os mediadores inflamatórios contribuem tanto para o desencadeamento, quanto para a perpetuação e a resolução do processo inflamatório.

### 1.2) Recrutamento celular

No recrutamento dos leucócitos da medula óssea para os tecidos e manutenção desses no sítio inflamatório é necessária uma participação orquestrada de moléculas de adesão e mediadores inflamatórios. Conforme pode ser visualizado na Figura 1, este processo pode ser dividido nas seguintes fases: contato inicial com a parede do vaso (“tethering”); rolamento ao longo da parede do vaso; adesão firme do leucócito ao endotélio; transmigração.

Em resposta a um estímulo apropriado, os leucócitos circulantes interagem e rolam sobre as células endoteliais ativadas das vênulas pós-capilares. Este processo é mediado, predominantemente, por selectinas presentes sobre os leucócitos (L-selectinas) e células endoteliais (P e E-selectinas) e seus ligantes carboidratos (PSGL-1, ESL-1 e CD34) (Sako *et al.*, 1993; Steegmaier *et al.*, 1995; Kubes, 2002). Os leucócitos frouxamente ligados à célula endotelial podem ser ativados por fatores quimiotáticos incluindo, fator 5 do complemento (C5a), IL-8/CXCL8, PAF, eotaxina/CCL11 e leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), o que acarreta no aumento da regulação e da afinidade de integrinas (família CD11/CD18, “very late antigen-4” VLA-4) presentes na superfície dos leucócitos. Essas moléculas promovem uma adesão firme à célula endotelial devido a ligação aos seus ligantes, incluindo a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e a molécula de adesão de células vasculares 1 (VCAM-1) (Springer *et al.*, 1994). Subseqüentemente, os leucócitos migram para o interstício devido à participação de integrinas e das moléculas de adesão celular endotélio-plaqueta 1 (PECAM-1) presentes na junção intercelular. Quando estabelecidas no local da lesão, as células são ativadas por mediadores que induzem a liberação de produtos do leucócito (Kita *et al.*, 1992; Fujisawa *et al.*, 2000). Além disso, estas células podem sofrer ação de agentes que aumentam a sobrevivência da célula e, assim, contribuem para elevar o tempo de permanência desta no sítio inflamatório (Walsh, 2000; Serhan & Savill, 2005).



**Figura 1**

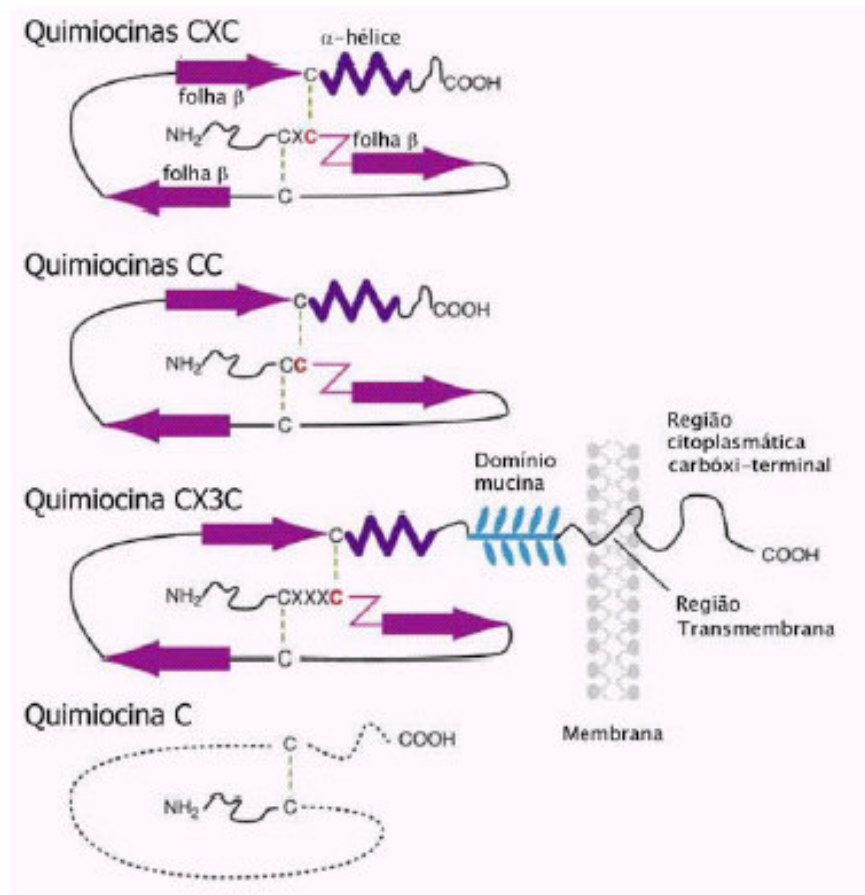
Representação esquemática do mecanismo de recrutamento de leucócitos através do endotélio. Adaptado de <http://bme.virginia.edu/ley/main.html>

### 2) Quimiocinas

As quimiocinas formam uma superfamília de pequenas citocinas (8-14 KDa) que participam do recrutamento de leucócitos. As primeiras quimiocinas a serem identificadas, MCP-1/CCL2, IL-8/CXCL8 e PF-4/CXCL4 foram isoladas na década de 1980 como fatores secretados durante o processo inflamatório e, capazes de atrair subtipos específicos de fagócitos e monócitos (Baggiolini, 1998; Rossi & Zlotnik, 2000; Loetscher *et al.*, 2000).

Já foram identificadas cerca de 50 quimiocinas em seres humanos. Apesar da seqüência de aminoácidos demonstrar baixa homologia entre algumas quimiocinas, uma característica desta subfamília é a presença de uma estrutura terciária bastante conservada, composta de três fitas beta-pregueadas seguidas de uma alfa-hélice, estabilizadas por alguns resíduos de cisteína. Assim, dependendo da presença ou ausência de resíduos de aminoácidos intercalados entre as cisteínas amino-terminais, as quimiocinas podem ser divididas em 4 grupos: CC (duas cisteínas ligadas diretamente), CXC (duas cisteínas separadas por um resíduo de aminoácido), C (apenas uma cisteína na porção amino-terminal) ou CX<sub>3</sub>C (duas cisteínas separadas por três resíduos de cisteína) (Lau *et al.*, 2004a). A Figura 2 mostra uma representação esquemática da estrutura secundária das quatro classes de quimiocinas existentes.

Comumente, as quimiocinas são classificadas como “inflamatórias” (induzidas) ou “homeostáticas” (constitutivas) (Campbell & Butcher, 2000). No entanto, as quimiocinas de uma classe podem ser capazes de influenciar a expressão e localização da outra classe e, algumas quimiocinas podem apresentar ambas as funções. (Moser & Loetscher, 2001). As quimiocinas inflamatórias são produzidas por diferentes tipos celulares e seu papel principal é a defesa do hospedeiro. Elas também podem ser expressas por leucócitos recrutados em resposta às toxinas bacterianas e mediadores inflamatórios como interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ). Em contrapartida, as quimiocinas homeostáticas são constitutivamente expressas em algumas áreas dos tecidos linfóides. Estas quimiocinas controlam o transporte de linfócitos durante a maturação, diferenciação e ativação. Também participam diretamente do “homing” destas células para os tecidos linfóides secundários. (Campbell & Butcher, 2000).



**Figura 2**

Representação esquemática das estruturas secundárias das quatro famílias de quimiocinas existentes. Adaptado de Frederick & Clayman, 2001.

### 2.1) Receptores de quimiocinas

O primeiro receptor de quimiocinas a ser isolado foi o receptor de IL-8/CXCL8 e, diferentemente das outras citocinas, observou-se que as quimiocinas exercem seus efeitos biológicos através da ativação de receptores com sete domínios transmembrana acoplados à proteína G (Holmes *et al.*, 1991; Murphy & Tiffany, 1991). Atualmente, já foram descritos cerca de 20 tipos de receptores para as quimiocinas (Allen *et al.*, 2007).

Na literatura são utilizados dois sistemas de nomenclaturas para nomear as quimiocinas e seus receptores. As abreviações tradicionais são originárias da época da descoberta de cada quimiocina. Na nomenclatura sistemática combina-se o número e o espaçamento das cisteínas da porção N-terminal com a letra L ou R para designar ligante ou receptor, respectivamente, acompanhados de uma numeração exclusiva para cada quimiocina ou receptor (Murphy *et al.*, 2000). A Tabela 1 mostra a nomenclatura atual e antiga para as quimiocinas humanas.

A ligação da quimiocina ao seu receptor promove uma mudança conformacional que culmina na dissociação das subunidades  $\alpha$  e  $\beta\gamma$  da proteína G acoplada ao receptor. Subseqüentemente, a liberação de  $G_{\beta\gamma}$  ativa uma grande variedade de enzimas, incluindo quinases de fosfolípidos e lipases. Estas enzimas regulam a fosforilação de segundos mensageiros lipídicos e a produção e liberação de segundos mensageiros como, (1,4,5-inositol trifosfato)  $IP_3$ , (íon cálcio)  $Ca^{2+}$  e (diacilglicerol) DAG. Por outro lado, a liberação da subunidade  $G_{\alpha}$  pode regular a liberação e geração de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) (Wong & Fish, 1998; Wong *et al.*, 2001; Scandella *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2004).

Essas cascatas de transdução de sinal promovem rearranjo do citoesqueleto dos leucócitos e aumento da regulação de moléculas de adesão dos mesmos, contribuindo para o processo de quimiotaxia. Além disso, as quimiocinas podem promover o aumento da explosão respiratória, desgranulação, fagocitose e aumento da produção de mediadores lipídicos (Horuk, 2001a).

A Figura 3 mostra os receptores de quimiocinas e seus pares até então identificados. Os receptores que são expressos constitutivamente são mostrados em azul, enquanto aqueles que são induzidos por inflamação são mostrados em vermelho.

O sistema de quimiocinas é complexo, uma vez que já foram descritas mais de 50 quimiocinas e somente cerca de 20 receptores. Além disso, existe uma aparente sobreposição



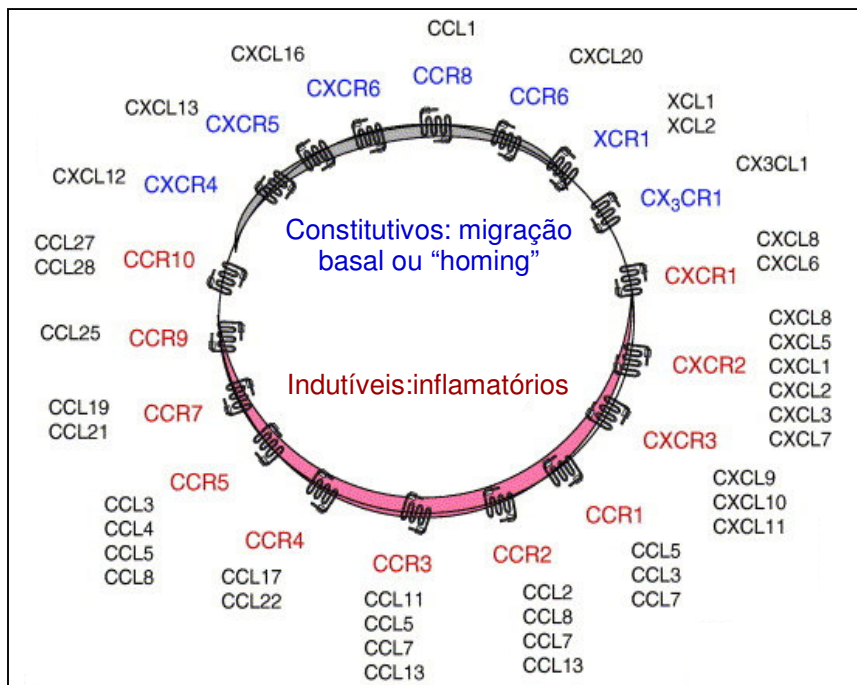
e redundância de ligantes e receptores. Uma quimiocina pode se ligar a diferentes receptores e, um receptor pode interagir com várias quimiocinas (Murphy *et al.*, 2000). Este fato pode ser visualizado na Figura 3, onde, por exemplo, RANTES/CCL5 é capaz de se ligar e ativar os receptores CCR1, CCR3 e CCR5. Por outro lado, CCR5 é ativado por MIP-1 $\alpha$ /CCL3 e MIP-1 $\beta$ /CCL4, RANTES/CCL5 e MCP-2/CCL8.

**Tabela 1**

Nomenclatura atual e antiga para quimiocinas humanas.

Classe	Nome atual	Abreviatura antiga	Origem inglesa da abreviatura antiga/Outros nomes
CXC	CXCL1	GRO $\alpha$	Growth-related oncogene $\alpha$
	CXCL2	GRO $\beta$	Growth-related oncogene $\beta$
	CXCL3	GRO $\gamma$	Growth-related oncogene $\gamma$
	CXCL4	PF	4 Platelet factor
	CXCL5	ENA	Epithelial cell-derived neutrophil-activating factor 78
	CXCL6	GCP	Granulocyte chemoattractant protein
	CXCL7	NAP-2	Neutrophil activating protein-2
	CXCL8	IL-8	Interleukin-8
	CXCL9	Mig	Monokine induced by $\gamma$ interferon
	CXCL10	IP10	$\gamma$ -Interferon-inducible protein-10
	CXCL11	ITAC	Interferon-inducible T-cell $\alpha$ -chemoattractant
	CXCL12	SDF-1	Stromal cell-derived factor-1
	CXCL13	BCA-1	B-cell-activating chemokine-1
	CXCL14	BRAK	Breast and kidney chemokine
	CXCL16		
	CC	CCL1	I-309
CCL2		MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
CCL3		MIP-1 $\alpha$	Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$
CCL4		MIP-1 $\beta$	Macrophage inflammatory protein-1 $\beta$
CCL5		RANTES	Regulated on activation normal T-cell-expressed and secreted
CCL6*		C10	
CCL7		MCP-3	Monocyte chemoattractant protein-3
CCL8		MCP-2	Monocyte chemoattractant protein-2
CCL9*		MRP-2	MIP-related protein
CCL10*			
CCL11			Eotaxin
CCL12*		MCP-5	Monocyte chemoattractant protein-5
CCL13		MCP-4	Monocyte chemoattractant protein-4
CCL14		HCC-1	Hemofiltrate CC-chemokine-1
CCL15		HCC-2	Hemofiltrate CC-chemokine-2
CCL16		HCC-3	Hemofiltrate CC-chemokine-3
CCL17		TARC	Thymus- and activation-related chemokine
CCL18		PARC	Pulmonary- and activation-regulated chemokine
CCL19		ELC	Epstein-Barr virus-induced receptor ligand chemokine
CCL20		LARC	Liver- and activation-related chemokine / Exodus
CCL21	SLC	Secondary lymphoid tissue chemokine	
CCL22	MDC	Macrophage-derived chemokine	
CCL23	MPIF-1	Myeloid progenitor inhibitory factor-1	
CCL24	MPIF-2	Myeloid progenitor inhibitory factor-2	
CCL25	TECK	Thymus-expressed chemokine	
CCL26		Eotaxin-3	
CCL27	ESKine	Skinkine	
CCL28	MEG	Mucosa-associated epithelial chemokine	
C	XCL1		Lymphotactin a
	XCL2		Lymphotactin-b
C3XC	C3XCL1		Fractalkine

\* Nomes reservados para quimiocinas murinas que ainda não tiveram seu ortólogo humano identificado. Adaptado de MURPHY *et al.* (2000).



**Figura 3**

Quimiocinas quanto a sua classificação e seus receptores. Adaptado de Johnson *et al.*, 2005.

### 2.2) Funções biológicas das quimiocinas

Além de apresentarem atividade quimiotática sobre diversos tipos celulares (Murphy, 1994; Sozzani *et al.*, 1997; Takano *et al.*, 1999), as quimiocinas e seus receptores estão envolvidos em uma ampla série de outros fenômenos fisiológicos e patológicos, entre eles: diferenciação celular, ativação celular, organogênese, hematopoiese, angiogênese, condições auto-imunes (psoríase, artrite reumatóide e esclerose múltipla), doenças pulmonares (asma e doença pulmonar obstrutiva crônica), formação de metástases e rejeição a transplantes (Gerard & Rollins, 2001; Godessart & Kunkel, 2001; Luther & Cyster, 2001; Mackay, 2001; Lukacs *et al.*, 2001; Azenshtein *et al.*, 2002; Robinson *et al.*, 2003; Amin, *et al.*, 2005; Allen *et al.*, 2007). O vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (HIV-1) também utiliza os receptores de quimiocinas como cofatores essenciais durante a entrada do vírus na célula alvo (Zaitseva *et al.*, 2003; Lusso, 2006).

A seguir será abordado mais especificamente o papel das quimiocinas MIP-1 $\alpha$ /CCL3, eotaxina/CCL11 e IL-8/CXCL8 que foram o foco do nosso trabalho.

### 2.2.1) MIP-1 $\alpha$ /CCL3

MIP-1 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein  $\alpha$ ) é uma proteína da família CC de quimiocinas que foi primeiramente identificada e purificada por Wolpe e cols. em 1988. De acordo com a nomenclatura atual, essa quimiocina passa a ser chamada de CCL3 (Murphy *et al.*, 2000).

O gene que codifica MIP-1 $\alpha$ /CCL3 é induzido na maioria das células hematopoiéticas maduras. Monócitos, linfócitos T, linfócitos B, neutrófilos, células dendríticas, mastócitos e células NK podem produzir grandes quantidades de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 (vários nanogramas/10<sup>6</sup> células), enquanto plaquetas, osteoblastos, astrócitos e microglia, células endoteliais, fibroblastos e outras células produzem menor quantidade de quimiocina quando estimuladas. A produção de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 pode ser induzida por vários agentes pró-inflamatórios incluindo lipopolissacarídeo (LPS), substância P, infecções virais, TNF- $\alpha$ , interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e IL-1 $\alpha$ / $\beta$ . Entretanto, o tratamento com interleucina 4 (IL-4), interleucina 10 (IL-10) ou dexametasona inibe a produção de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 (Hachicha *et al.*, 1995; Rodenburg *et al.*, 1998; Teixeira *et al.*, 1998; Becker & Soukup, 1999; Gosset *et al.*, 1999; Sallusto *et al.*, 1999; Maurer & Von Stebut, 2004).

Os efeitos biológicos de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 são mediados pelos receptores CCR1 e CCR5, que pertencem à família de receptores acoplados à proteína G e expressos em vários tipos celulares, incluindo monócitos, linfócitos T, neutrófilos, eosinófilos e células dendríticas (Alkhatib *et al.*, 1996; Granelli-Piperno *et al.*, 1996; Bleul *et al.*, 1997; Sica *et al.*, 1997; Wong & Fish, 1998; Bonecchi *et al.*, 1999; Elsner *et al.*, 2000).

Concentrações aumentadas de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 têm sido observadas em várias condições inflamatórias graves, incluindo artrite reumatóide, fibrose pulmonar idiopática, sarcoidose, asma e dermatite atópica (Standiford, 1993; Koch, *et al.*, 1994; Cruikshank, *et al.*, 1995; Hatano, *et al.*, 1999).

*In vitro*, MIP-1 $\alpha$ /CCL3 demonstra atividade quimiotática para linfócitos B, linfócitos T ativados (CD8<sup>+</sup> > CD4<sup>+</sup>), células NK, basófilos, células dendríticas, eosinófilos e neutrófilos (Rot *et al.*, 1992; Bischoff *et al.*, 1993; Schall *et al.*, 1993; Taub *et al.*, 1993; Maghazachi *et al.*, 1994; Sozzani *et al.*, 1997; Takano *et al.*, 1999). Vários estudos em modelos animais têm demonstrado que o tratamento com anticorpo anti-MIP-1 $\alpha$ /CCL3 promove diminuição do recrutamento e/ou ativação de linfócitos, monócitos, eosinófilos, mastócitos e neutrófilos (Smith *et al.*, 1994; Lukacs *et al.*, 1995; Tedla *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999).

*al.*, 1998; Das *et al.*, 1999). Outra atividade importante desta quimiocina é a regulação da resposta imune pela modulação da diferenciação de linfócitos T acessórios. Este fato é confirmado pela polarização de “células T helper 2” (Th2) apresentada por animais deficientes do gene que codifica o receptor CCR5, um dos receptores de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 e pela maior produção de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 por linfócitos Th1 comparado aos linfócitos Th2 (Schrum *et al.*, 1996).

Pelo exposto acima podemos observar que MIP-1 $\alpha$ /CCL3 participa da patogênese de muitas condições inflamatórias e doenças, incluindo asma, formação de granuloma, cicatrização, artrite reumatóide, esclerose múltipla, pneumonia e psoríase (Murdoch & Finn, 2000). Além disso, MIP-1 $\alpha$ /CCL3 participa da resposta imune contra patógenos, como vírus ou parasitas (Aliberti *et al.*, 2000; Menten *et al.*, 2002). Desta forma, o desenvolvimento de fármacos capazes de neutralizar a ação de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 poderia ser uma útil estratégia terapêutica no tratamento de doenças autoimunes, além de doenças inflamatórias.

No presente trabalho nós utilizamos modelos experimentais de doenças descritas como dependentes da liberação e função de MIP-1 $\alpha$ /CCL3, incluindo hipersensibilidade do tipo tardia (Doyle *et al.*, 1997) e fibrose pulmonar induzida por bleomicina (Standiford *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1994; Ishida *et al.*, 2007)

### 2.2.2) Eotaxina/CCL11

A eotaxina/CCL11 é uma quimiocina da família CC que tem sido considerada uma molécula quimioatraente relevante para o recrutamento de eosinófilos para locais de reação alérgica (Jose *et al.*, 1994; Gonzalo *et al.*, 1996; Das *et al.*, 1997; Humbles *et al.*, 1997; Teixeira *et al.*, 1997; Rothenberg, 1999; Klein *et al.*, 2001), bem como para a manutenção basal dessas células em alguns tecidos (Humbles *et al.*, 1997; Rothenberg *et al.*, 1997; Matthews *et al.*, 1998). Diversos trabalhos têm demonstrado aumento local da expressão de mRNA para eotaxina/CCL11 ou mesmo da proteína em reações alérgicas em modelos experimentais ou em pacientes asmáticos (Gonzalo *et al.*, 1996; Humbles *et al.*, 1997; Lamkhieued *et al.*, 1997; Ying *et al.*, 1997). Na verdade, esse aumento da eotaxina/CCL11 correlaciona-se à migração de eosinófilos para o sítio inflamatório (Gonzalo *et al.*, 1996; Humbles *et al.*, 1997).

Os efeitos biológicos da eotaxina/CCL11 são mediados pelo receptor de quimiocinas CCR 3 (CCR3) que é um receptor acoplado à proteína G e expresso em vários tipos celulares, incluindo eosinófilos, basófilos, linfócitos Th2 e mastócitos (Ugucioni *et al.*, 1997; Ochi *et al.*, 1999; Bandeira-Melo *et al.*, 2001a). A ligação da eotaxina/CCL11 ao receptor CCR3 expresso na superfície dos eosinófilos ativa proteínas G $\alpha$  inibitórias (G $\alpha_i$ ) e culmina no influxo transiente de íons cálcio (Ca<sup>2+</sup>) seguido rapidamente pela polimerização da actina e mudança de forma do granulócito (Elsner *et al.*, 1996; Tenscher *et al.*, 1996; Boehme *et al.*, 1999). Posteriormente, a sinalização de CCR3 para quimiotaxia envolve a fosforilação e ativação de tirosinas quinase (El-Shazly *et al.*, 1999) e proteínas quinase ativadas por mitógeno (MAPK) (Boehme *et al.*, 1999; Kampen *et al.*, 2000). Além de promover quimiotaxia, a ligação da eotaxina/CCL11 ao CCR3 ativa os eosinófilos. As respostas efetoras mediadas por CCR3 em eosinófilos incluem produção de espécies reativas do oxigênio (Elsner *et al.*, 1996; Tenscher *et al.*, 1996), produção de leucotrieno C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>) e formação de corpos lipídicos (Bandeira-Melo *et al.*, 2001b), liberação de grânulos contendo proteínas catiônicas (El-Shazly *et al.*, 1998; Kampen *et al.*, 2000) e liberação de IL-4 pré-formada (Bandeira-Melo *et al.*, 2001c).

Além da eotaxina/CCL11, CCR3 possui outros ligantes, incluindo RANTES/CCL5, MCP-3/CCL7, MCP-4/CCL13, eotaxina-2/CCL24, eotaxina-3/CCL26 (Bandeira-Melo *et al.*, 2001a). Entretanto, RANTES/CCL5, MCP-3/CCL7 e MCP-4/CCL13 não são seletivos para CCR3 e podem agir em outros receptores (Rothenberg, 1999). De maneira similar à

eotaxina/CCL11, o receptor CCR3 tem sido associado ao recrutamento de eosinófilos em modelos murinos de reação alérgica e em pacientes com asma (Health *et al.*, 1997; Ying *et al.*, 1997; Ma *et al.*, 2002). Além disso, o antagonismo de CCR3 ou a depleção do gene que codifica CCR3 diminui significativamente a migração de eosinófilos e a hiperreatividade das vias aéreas em modelo murino de asma (Gonzalo *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 2002).

No presente trabalho, nós utilizamos o modelo experimental de pleurisia alérgica induzida por ovalbumina onde é possível avaliar o recrutamento de eosinófilos dependente de eotaxina/CCL11 (Klein *et al.*, 2001).



### 2.2.3) Interleucina-8/CXCL8

A interleucina-8 (IL-8)/CXCL8 foi purificada e molecularmente clonada como um fator quimiotático de neutrófilos originado do sobrenadante de células mononucleares estimuladas com LPS (Matsushima *et al.*, 1988; Yoshimura *et al.*, 1987). Esta identificação foi sucedida pela descoberta de outras proteínas da família CXC de quimiocinas.

As quimiocinas CXC podem ser subdivididas de acordo com a presença do motivo ELR (glutamina-leucina-arginina) que precede a porção N-terminal destas proteínas. Essa classificação correlaciona-se às diferenças funcionais. As quimiocinas CXC ELR+ (GRO- $\alpha$ /CXCL1, GRO- $\beta$ /CXCL2, GRO- $\gamma$ /CXCL3, ENA-78/CXCL5, GCP-2/CXCL6, NAP-2/CXCL7 e IL-8/CXCL8) ligam-se aos receptores CXCR1 e/ou CXCR2 com grande afinidade e apresentam efeito quimiotático potente, particularmente sobre neutrófilos (Murphy, 1994; Ahuja & Murphy, 1996) e, exibem potente atividade angiogênica (Strieter *et al.*, 1995). Já as quimiocinas CXC ELR- (PF-4/CXCL4, MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, ITAC/CXCL11, SDF-1 $\alpha/\beta$ /CXCL12, BCA-1/CXCL13 e BRAK/CXCL14) são mais seletivas para linfócitos e monócitos e, inibem a angiogênese (Frederick & Clayman, 2001). Acredita-se que proteínas relacionadas ao “growth-regulated oncogene” (GRO), como CXCL1, 2, e 3 funcionam como substitutos de IL-8/CXCL8 em ratos e camundongos, uma vez que estes animais não produzem IL-8/CXCL8 e CXCR1 (Zagorski & Delarco, 1993; Zhang *et al.*, 2001).

A IL-8/CXCL8 pode ser produzida por vários tipos celulares, incluindo células leucocitárias (monócitos, células T, neutrófilos e células NK) e células somáticas não leucocitárias (células endoteliais, fibroblastos e células epiteliais) (Oppenheim *et al.*, 1991; Mukaida *et al.*, 1992; Baggiolini *et al.*, 1997; Mukaida, 2000). A produção de IL-8/CXCL8 não é constitutiva, mas induzida por citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e TNF- $\alpha$  (Matsushima *et al.*, 1988). Além disso, a produção de IL-8/CXCL8 pode ser induzida por bactérias (*Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa*) (DiMago *et al.*, 1995; Aihara *et al.*, 1997), produtos bacterianos (LPS) (Oppenheim *et al.*, 1991; Baggiolini *et al.*, 1997), vírus (adenovírus, rinovírus, vírus respiratório formador de sincício, citomegalovírus) (Johnston *et al.*, 1997; Casola *et al.*, 2000; Murayama *et al.*, 1997; Alcorn *et al.*, 2001) e por produtos virais (proteína X do vírus B de hepatite) (Mahe *et al.*, 1991; Polyak *et al.*, 2001). Fatores ambientais também podem induzir a produção de IL-8/CXCL8 por diversos tipos celulares. Condições de hipóxia estimulam vários tipos de células tumorais a produzir grande

quantidade de IL-8/CXCL8 através da ativação cooperativa de fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) e proteína ativadora-1 (AP-1) (Kunz *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1999). Devido ao fato de IL-8/CXCL8 possuir uma atividade angiogênica (Koch *et al.*, 1992; Strieter *et al.*, 1995; Belperio *et al.*, 2000), condições de hipóxia podem promover neovascularização pela indução da produção de IL-8/CXCL8.

Os efeitos biológicos de IL-8/CXCL8 são mediados pelos receptores CXCR1 e CXCR2, que pertencem à família de receptores acoplados à proteína G e expressos em vários tipos celulares, incluindo neutrófilos, monócitos, células NK e linfócitos (Chuntharapai *et al.*, 1994; Morohashi *et al.*, 1995). *In vitro*, CXCR1 exibe uma menor afinidade por IL-8/CXCL8 e requer uma maior concentração da proteína para internalização e reciclagem, comparado à CXCR2 (Chuntharapai & Kim, 1995).

Vários trabalhos têm evidenciado uma participação relevante de IL-8/CXCL8 na migração de neutrófilos (Carveth *et al.*, 1989; Huber *et al.*, 1991; Burns *et al.*, 1996; Mul *et al.*, 2000). Além disso, esta quimiocina pode ativar muitas funções dos neutrófilos, como desgranulação e explosão respiratória (Oppenheim *et al.*, 1991; Mukaida, 2000). IL-8/CXCL8 ativa 5-lipoxigenase com liberação de LTB<sub>4</sub> e ácido 5-hidroxiieicosatetranóico na presença de ácido araquidônico exógeno (Schroder, 1989) e, induz a síntese de PAF (Bussolino *et al.*, 1992). Embora as funções de IL-8/CXCL8 sejam muito citadas com relação aos neutrófilos, esta citocina também exibe atividade quimiotática e ativadora sobre outros tipos celulares, como basófilos, linfócitos e monócitos (Dahinden *et al.*, 1989; Larsen *et al.*, 1989; Bischoff *et al.*, 1991; Kuna *et al.*, 1991; Geiser *et al.*, 1993; Bacon *et al.*, 1994; Gerszten *et al.*, 1999).

Conforme ressaltado anteriormente, uma atividade angiogênica tem sido documentada para todas as quimiocinas CXCL8 ELR+ (Koch *et al.*, 1992; Strieter *et al.*, 1995). Estas quimiocinas podem induzir a migração de células endoteliais que expressam CXCR1 e CXCR2. Além disso, IL-8/CXCL8 induz a perda de adesão dos fibroblastos e promove quimiotaxia e quimiocinese dos mesmos (Dunlevy & Couchman, 1995).

Diversos estudos têm mostrado concentrações aumentadas de IL-8/CXCL8 em algumas condições patológicas onde os neutrófilos representam um importante papel na patogênese da doença como artrite reumatóide (Kraan *et al.*, 2001), fibrose pulmonar idiopática (Carre *et al.*, 1991; Car *et al.*, 1994; Ziegenhagen *et al.*, 1998) e infecções bacterianas (Mukaida, 2000).

No presente trabalho, nós utilizamos modelos experimentais onde é possível avaliar o recrutamento de neutrófilos dependente de KC/CXCL1-3 e MIP-2/CXCL1-2, incluindo migração celular para a cavidade articular e para a cavidade pleural.

### 3) Estratégias utilizadas para interferir no sistema de quimiocinas

Uma vez que é notória a participação das quimiocinas no processo fisiopatológico de várias doenças, o desenvolvimento de estratégias farmacológicas que interfiram no sistema de quimiocinas apresenta grande potencial terapêutico. No entanto, existe uma freqüente resistência quanto ao uso do sistema de quimiocinas como forma de terapia, devido à aparente redundância e promiscuidade entre ligantes e receptores, o que poderia culminar em falta de especificidade e ocorrência de efeitos indesejáveis. Em contrapartida, resultados obtidos utilizando-se animais “knockout”, anticorpos monoclonais e antagonistas de receptores (Kennedy *et al.*, 1998; Balashov *et al.*, 1999; Rottman *et al.*, 2000; Izikson *et al.*, 2000; Peters *et al.*, 2001) dão suporte para o entendimento de que o sistema de quimiocinas apresenta-se “finamente” regulado *in vivo* tanto temporalmente quanto espacialmente para alcançar um sofisticado grau de especificidade.

A seguir serão apresentadas as principais formas de intervenção no sistema de quimiocinas utilizadas por companhias farmacêuticas.

#### 3.1) Pequenas moléculas como antagonistas de receptores de quimiocinas

A estratégia mais amplamente utilizada para impedir a interação entre uma quimiocina e seu receptor é administrar pequenas moléculas antagonistas. Os primeiros receptores de quimiocinas CXC, CXCR1 e CXCR2, foram identificados em 1991 (Holmes *et al.*, 1991; Murphy & Tiffany, 1991), seguidos pelo primeiro receptor de quimiocinas CC, CCR1, em 1993 (Neote *et al.*, 1993). O interesse em desenvolver antagonistas para os receptores de quimiocinas ganhou impulso em 1996, após a demonstração do papel de CCR5 com um co-receptor essencial para a infecção pelo vírus HIV-1 (Liu *et al.*, 1996; Samson *et al.*, 1996). Em paralelo, muitos progressos foram feitos a respeito da criação de animais “knockouts” e transgênicos, que contribuíram para mostrar a participação de quimiocinas e seus receptores em doenças inflamatórias e auto-imunes (Cacalano *et al.*, 1994; Cook *et al.*, 1995; Boring *et al.*, 1998). Desta forma, várias indústrias farmacêuticas começaram a investir em programas para desenvolver pequenas moléculas antagonistas de receptores de quimiocinas. Basta dizer que os receptores com sete domínios transmembrana acoplados à proteína G são os alvos mais utilizados para o desenvolvimento de novos medicamentos e, que cerca de 30 % dos fármacos atualmente comercializados interferem neste sítio. Entretanto, somente em 1998 é que foram

relatadas as primeiras pequenas moléculas antagonistas (Hesselgesser *et al.*, 1998; White *et al.*, 1998).

A identificação de antagonistas para os receptores de quimiocinas não foi uma tarefa fácil, pois muitos dos ligantes destes receptores são pequenas moléculas como a histamina, dopamina e outros peptídeos, enquanto as quimiocinas são relativamente grandes. Além disso, grande parte dos receptores de quimiocinas interage com diferentes ligantes, logo, uma pequena molécula que impede o sítio de ligação de uma quimiocina, não necessariamente inibe os outros ligantes, demonstrando que uma inibição competitiva não é adequada para impedir a ligação de todos os ligantes (Cox *et al.*, 2001; Xanthou *et al.*, 2003). Outro fator agravante para a geração de antagonistas foi encontrar modelos animais apropriados para testar a eficácia do fármaco, uma vez que estes apresentavam baixa afinidade por receptores não humanos (Berger *et al.*, 1999) e eram necessárias altas doses nos ensaios (Auten *et al.*, 2001; Horuk *et al.*, 2001b, c).

Hoje existem diversas patentes e artigos sobre pequenas moléculas antagonistas. Além disso, várias destas moléculas já estão sendo testadas em fases avançadas de ensaios clínicos. A Figura 4 mostra os receptores de quimiocinas, seus ligantes, sua associação a algumas doenças e fármacos que interferem nesse sistema em estágio de estudo clínico no ano de 2006. Os receptores mostrados em vermelho são induzidos por citocinas pró-inflamatórias e, assim, são frequentemente associados às doenças inflamatórias e auto-imunes. Os receptores mostrados em azul são expressos constitutivamente e participam do tráfego basal de células.

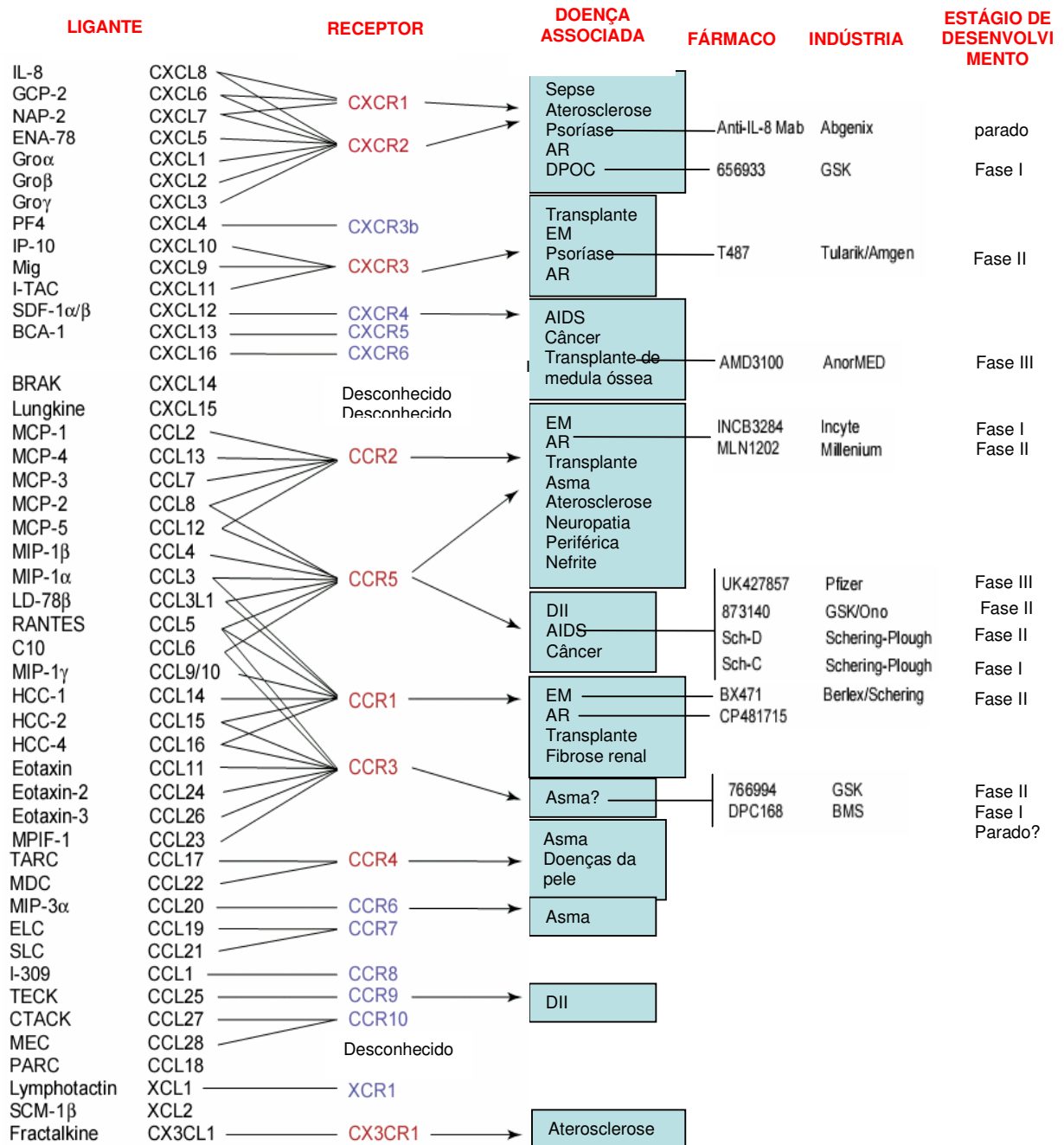
A seguir serão apresentados três exemplos de alvos estudados atualmente em ensaios clínicos: CCR1, CCR5 e CXCR4.

Alguns trabalhos têm evidenciado a participação do receptor CCR1 em doenças auto-imunes como artrite reumatóide, doença inflamatória intestinal e esclerose múltipla (Schwarz & Wells, 1999; Liang *et al.*, 2000; Horuk *et al.*, 2001b, c). Várias moléculas antagonistas do receptor já foram descritas (Liang *et al.*, 2000, Horuk *et al.*, 2001b, Anders *et al.*, 2002). O membro mais promissor desta classe de compostos, BX 471, é capaz de se ligar com grande afinidade ao receptor e impedir sua ativação pelas quimiocinas MIP-1 $\alpha$ /CCL3, RANTES/CCL5 e MCP-3/CCL7. Assim, os efeitos biológicos mediados por este receptor, incluindo mobilização de cálcio, aumento da expressão de CD11b e migração celular são inibidos (Liang *et al.*, 2000). Em animais foi observado que esse antagonista é capaz de diminuir a gravidade clínica em modelo de esclerose auto-imune experimental (EAE) (Liang *et al.*, 2000), retardar a rejeição de transplante cardíaco (Horuk *et al.*, 2001b), bem como reduzir acúmulo celular e a fibrose em modelo de obstrução unilateral do ureter (Anders *et al.*,

2002). Ensaios farmacocinéticos mostram que BX 471 é ativo oralmente com uma biodisponibilidade de 60 % em cães (Liang *et al.*, 2000). No ano de 2006, o antagonista BX 471 encontrava-se na Fase II de estudo clínico para tratamento de esclerose múltipla.

Conforme ressaltado anteriormente, os receptores CXCR4 e CCR5 são muito relevantes para a infecção pelo HIV-1, sendo que após a ligação da proteína viral gp120 ao CD4 da célula alvo, ocorre a ligação ao correceptor CCR5 ou CXR4 celular promovendo rearranjo molecular na membrana do envelope viral resultando na fusão das membranas da célula e do vírus (Zaitseva *et al.*, 2003; Lusso, 2006). Dessa maneira, torna-se notório o interesse das indústrias farmacêuticas em desenvolver estratégias que regulem a ação desses receptores. Embora ainda não tenha sido aprovado nenhum antagonista de receptor de quimiocinas para o tratamento do HIV, muitas moléculas antagonistas de CXCR4 e CCR5 estão sendo desenvolvidas e testadas com potencial terapêutico (De Clercq, 2005; Goebel & Juelg, 2005).

Em adição aos problemas usuais associados à geração novos fármacos (seletividade, biodisponibilidade oral, toxicidade, etc), as tentativas de desenvolver inibidores da entrada do HIV-1 são muitas vezes excluídas por questões associadas à rápida evolução do vírus, acarretando em resistência aos fármacos. Por exemplo, ao impedir apenas um dos caminhos utilizados pelo HIV-1 para entrar na célula, o outro caminho pode ser tornar dominante. Na tentativa de resolver este problema, a AnorMed anunciou o desenvolvimento de um antagonista que é capaz de agir sobre CCR5 e CXCR4 (Anormed Inc., 2002), mas pouco é sabido sobre seu mecanismo de ação.



**Figura 4**

Receptores de quimiocinas, seus ligantes, sua associação a doenças, fármacos desenvolvidos que interferem no sistema de quimiocinas e fase de testes clínicos. Abreviações: AR, artrite reumatóide; DPOC, doença pulmonar obstrutiva crônica; DII, doença inflamatória intestinal; EM, esclerose múltipla. Adaptado de Wells *et al.*, 2006.

### 3.2) Proteínas modificadas

Uma segunda abordagem de bloqueio da interação quimiocina-receptor é a utilização de quimiocinas modificadas, onde estas mantêm alta afinidade por seu receptor, mas não promovem sinalização intracelular, tornando-se, assim, agentes antagonistas. Esta estratégia foi criada a partir do fato que modificações na região N-terminal da quimiocina modificava a sinalização intracelular (Proudfoot *et al.*, 1996).

Em trabalhos desenvolvidos pela Merck-Serono é mostrado que quando CCL5/RANTES é expressa em *Escherichia coli*, a metionina inicial da molécula é mantida. A proteína resultante, nomeada Met-RANTES liga-se ao receptor CCR5 com potência de nanomolar e é capaz de inibir o recrutamento de linfócitos T e monócitos induzido por MIP-1 $\alpha$ /CCL3 e RANTES/CCL5 (Proudfoot *et al.*, 1996). Além disso, esta molécula se mostrou eficaz vários modelos de doenças, como de inflamação das vias aéreas e artrite induzida por colágeno (Plater-Zyberk *et al.*, 1997; Gonzalo *et al.*, 1998). Fenômeno similar foi visto com MCP-1/CCL2, onde a remoção da região N-terminal preveniu a ativação do receptor CCR2 (Gong & Clark-Lewis, 1995; Zhang & Rollins, 1995). Embora aparentemente promissoras, o desenvolvimento destas quimiocinas como agentes antiinflamatórios perdeu espaço, provavelmente porque estas moléculas são descritas como agonistas parciais fracos e, assim, podem apresentar efeitos pró-inflamatórios residuais (Proudfoot *et al.*, 1999). Recentemente, o foco de estudo de proteínas modificadas tem sido dado para aquelas que interfiram na formação do gradiente de quimiocinas.

Além de se ligar aos receptores expressos nos leucócitos, tem sido sugerido que as quimiocinas também se ligam aos glicosaminoglicanos (GAGs) imobilizados na superfície de células endoteliais e matriz extracelular (Rot, 1993; Middleton *et al.*, 1997). Esse seria um mecanismo de retenção e possível apresentação das quimiocinas aos leucócitos circulantes. Na ausência deste mecanismo, o gradiente de quimiocinas poderia dissipar-se por difusão, especialmente na presença de forças de fluxo presentes nos vasos sanguíneos e nos linfonodos (Rot, 1992; Rot, 1993; Hoogewerf *et al.*, 1997; Middleton *et al.*, 1997; Kuschert *et al.*, 1999). A interação com os GAGs também parece impedir uma clivagem proteolítica das quimiocinas (Webb *et al.*, 1993; Sadir *et al.*, 2004).

Os GAGs são biomoléculas formadas pela fusão de um núcleo protéico a polímeros lineares de carboidratos (Handel *et al.*, 2005). Além disso, os GAGs usualmente se associam a proteínas formando proteoglicanos (Johnson *et al.*, 2004). Os mais importantes são: sulfato de heparana, heparina, sulfato de dermatana, sulfato de condroitina e o ácido hialurônico

(Sugahara *et al.*, 2003; Lau *et al.*, 2004b). A interação com os GAGs também parece promover um outro nível de controle da migração celular, uma vez que a composição dos proteoglicanos de superfície celular depende da localização e tipo de endotélio (Kuschert *et al.*, 1999). Além disso, as quimiocinas apresentam seletividade pelos diferentes subtipos de GAGs (Witt & Lander, 1994; Hoogewerf *et al.*, 1997; Kuschert *et al.*, 1998; Kuschert *et al.*, 1999; Middleton *et al.*, 2002; Shriver *et al.*, 2002). Trabalhos têm demonstrado que esta interação quimiocina-GAG pode interferir na oligomerização da mesma e, portanto, sua atividade *in vivo* (Hoogewerf *et al.*, 1997; Ali *et al.*, 2000; Proudfoot *et al.*, 2003).

Proudfoot e colaboradores (2001) evidenciaram que a mutação da região da quimiocina RANTES/CCL5 que interage com os GAGs resulta em uma proteína que se liga com usual afinidade ao receptor e induz ativação *in vitro*. No entanto, esta molécula modificada atua como agente antiinflamatório *in vivo* e impede as ações biológicas da quimiocina natural, como por exemplo, a indução do recrutamento celular para o peritônio, bem como a migração de macrófagos induzida por um estímulo não específico como o tioglicolato. Além disso, a variante reduz a gravidade clínica no modelo de EAE (Johnson *et al.*, 2004). O mecanismo de ação dessa quimiocina modificada ainda não está totalmente elucidado, mas é sugerido que ela forme heterodímeros inativos e, assim, iniba a formação de oligômeros da molécula natural que são necessários para a função biológica da quimiocina (Proudfoot *et al.*, 2003, Johnson *et al.*, 2004). Desta forma, é sugerido que a utilização de proteínas modificadas na região de ligação aos GAGs apresenta-se como uma promissora estratégia antiinflamatória.

### 3.3) Anticorpos

Anticorpos neutralizantes contra as quimiocinas e seus receptores têm sido extensivamente utilizados em modelos experimentais, principalmente para validar o papel dessas proteínas nas doenças. Existem diversos estudos sobre o tema relatados na literatura, entre eles podemos destacar o trabalho pioneiro de Gonzalo e colaboradores (1998) no qual foi evidenciado o papel de várias quimiocinas como MCP-1/CCL2, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, eotaxina/CCL11, MCP-5/CCL12 e MDC/CCL22 no recrutamento celular em um modelo de imunização induzido por ovalbumina.

Já existem anticorpos contra quimiocinas e seus receptores sendo testados em fases clínicas. O MLN1202, um anticorpo monoclonal contra o receptor CCR2, foi desenvolvido



pela Millenium para o tratamento de artrite reumatóide e se encontrava em fase II de desenvolvimento a ano de 2006.

O anticorpo contra IL-8/CXCL8 chegou à fase II de ensaio de doença pulmonar obstrutiva crônica, mas apesar de promover melhora do índice de dispnéia, não culminou na melhora global da função pulmonar dos pacientes. Este mesmo composto também foi testado em pacientes com psoríase, mas corroborando resultados anteriores também não apresentou melhora clínica (Mahler *et al.*, 2004).

### 3.4) Proteínas ligantes de quimiocinas

A co-evolução de hospedeiros e agentes infecciosos tem exercido no sistema imunológico dos hospedeiros mecanismos para tentar controlar as infecções potencialmente fatais. Concomitantemente, os patógenos têm desenvolvido várias estratégias para modular e burlar a resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro, garantindo assim, o sucesso da infecção. Nos últimos anos tem sido muito evidenciado que microorganismos como vírus e protozoários apresentam estratégias de evasão do sistema imunológico do hospedeiro baseadas na interferência de citocinas e quimiocinas.

Um dos mecanismos de evasão adotados por vírus da família herpesvírus e poxvírus é codificar homólogos de citocinas, quimiocinas e receptores do hospedeiro, o que modula a resposta à infecção (Alcami, 2003). Adicionalmente, têm sido identificadas e isoladas várias proteínas ligantes de quimiocinas que apresentam a habilidade de inibir a atividade das quimiocinas tanto *in vitro*, quanto *in vivo* (Alcami, 2003).

Três tipos de proteínas ligantes de quimiocinas originadas de vírus já foram identificados: a proteína M-T7, liberada pelo mixomavírus, que se liga com baixa especificidade a todas as subfamílias de quimiocinas (Mossman *et al.*, 1996; Lalani *et al.*, 1997); a proteína M-T1, codificada por vários vírus da família pox, que se liga com alta afinidade apenas às quimiocinas CC (Graham *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997; Alcami *et al.*, 1998); e a proteína M3 que é a única liberada pelo gammaherpesvírus murino, que se liga com grande afinidade a todas as subfamílias de quimiocinas (Parry *et al.*, 2000; van Berkel *et al.*, 2000; Bridgeman *et al.*, 2001).

Liu e colaboradores (2004) mostraram que no modelo de lesão arterial induzido por angioplastia em ratos, uma única administração de doses entre 5 a 5000 pg de M-T7 promoveu uma importante redução de hiperplasia da camada íntima e vasculopatia associada a uma inibição do infiltrado inflamatório. Estes resultados foram corroborados pelo uso de

animais transgênicos para M3, que mostraram uma redução significativa da hiperplasia da camada íntima, fundamental para o desenvolvimento da aterosclerose (Pyo *et al.*, 2004).

A liberação de proteínas ligantes de quimiocinas também foi demonstrada em helmintos através do trabalho de Smith e colaboradores (2005), no qual é evidenciado que os ovos de *Schistosoma mansoni* secretam uma proteína nos tecidos do hospedeiro que se liga à IL-8/CXCL8, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, fractalina/CX3CL1, MCP-1/CCL2 e RANTES/CCL5, inibindo a ligação destas quimiocinas aos seus respectivos receptores. A proteína ligante de quimiocinas purificada apresentou a habilidade de inibir a atividade biológica das quimiocinas tanto *in vitro*, quanto em modelos de inflamação aguda. Por exemplo, no modelo murino de bolha de ar subcutânea, os animais que receberam o recombinante apresentaram menor infiltrado neutrofílico induzido por IL-8/CXCL8. Os resultados obtidos no modelo de lesão pulmonar induzido por IL-8/CXCL8 reafirmaram esta habilidade da proteína em reduzir a migração celular e alterações teciduais.

Adicionalmente aos patógenos supracitado, tem sido observado que os carrapatos também apresentam mecanismos similares de evasão do sistema imune do hospedeiro para garantir a sua sobrevivência. Os carrapatos são ectoparasitas que podem parasitar uma grande variedade de mamíferos, incluindo seres humanos. Espécies da família *Ixodidae* são caracterizadas por alimentar-se do sangue de seus hospedeiros por longos períodos de tempo, variando entre poucos dias até 2-3 semanas. Ao perceber a entrada de um agente estranho em sua pele, o hospedeiro desencadeia uma resposta imune na tentativa de neutralizar, ou mesmo destruir o invasor. Para tentar burlar este mecanismo de defesa e garantir a perpetuação da infestação, os carrapatos possuem em sua saliva uma grande variedade de agentes vasodilatadores, anticoagulantes, anestésicos e antiinflamatórios (Wikel, 1999; Gillespie *et al.*, 2000). Muitos patógenos transmitidos por carrapatos, como a bactéria *Borrelia burgdorferi* causadora da doença de Lyme, a bactéria causadora da febre das montanhas rochosas e vírus (vírus causador da febre de Colorado e vírus causador da encefalite), possivelmente também exploram essa habilidade dos carrapatos para facilitar a sua própria transmissão e replicação.

Vários estudos mostraram os efeitos dos componentes da saliva de carrapatos sobre a expressão ou atividade de citocinas (Fuchsberger *et al.*, 1995; Ferreira & Silva, 1999; Macaluso & Wikel, 2001), mas a primeira evidência de um inibidor específico de citocinas só foi vista no trabalho de Gillespie e colaboradores (2001). Neste estudo observou-se que a saliva do *Ixodes scapularis* continha uma proteína que se ligava à interleucina 12 (IL-12) humana e murina, promovendo um mecanismo de supressão da proliferação de células T e

outras respostas induzidas por IL-12. Hajnická e colaboradores (2001) evidenciaram a presença de uma proteína anti-IL-8/CXCL8 na saliva de cinco espécies de carrapatos *Ixodidae* e, recentemente foi mostrada que a saliva isolada de várias espécies de carrapatos contém uma grande variedade de proteínas com atividade inibitória direcionada contra citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e IL-4, além das quimiocinas MCP-1/CCL2, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, RANTES/CCL5 e eotaxina/CCL11 (Hajnická *et al.*, 2005).

Frauenschuh e colaboradores do grupo Merck-Serono (2007) publicaram recentemente um trabalho onde foi descrita a clonagem e a caracterização de uma proteína ligante de quimiocinas secretada na saliva de carrapatos. Uma biblioteca de ácido desoxirribonucléico codificante (cDNA) foi preparada a partir das glândulas salivares do carrapato *Ixodidae*, *Rhipicephalus sanguineus* (carrapato comum de cachorros). Os clones de cDNA da biblioteca foram transfectados para células HEK293 e o meio destas células foi testado para avaliar se havia atividade de se ligar a MIP-1 $\alpha$ /CCL3. A partir deste método foi identificada uma família de proteínas ligantes de quimiocinas distintas das conhecidas proteínas ligantes de quimiocinas de origem viral e do *Schistosoma mansoni*, chamada evasinas. A primeira evasina identificada foi a Evasina-1 (Frauenschuh *et al.*, 2007) que se liga seletivamente à MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL4 e PARC/CCL18 com alta afinidade e, cujos valores de KD são 0,16; 0,81 e 3,21 nM, respectivamente. Além disso, a afinidade por MIP-1 $\alpha$ /CCL3 e MIP-1 $\beta$ /CCL4 foi confirmada por “ensaios de binding”. Subseqüentemente, foram identificadas outras duas proteínas ligantes de quimiocinas chamadas Evasina-3 e Evasina-4. A Evasina-3 liga-se seletivamente à GRO- $\alpha$ /CXCL1, IL-8/CXCL8 e homólogos murinos (KC/CXCL1-3 e MIP-2/CXCL1-2) com alta afinidade e, cujos valores de KD são 1,32; 1,43; 3,97 e 1,4 nM, respectivamente. Já a Evasina-4 liga-se à eotaxina/CCL11 e RANTES/CCL5. No entanto os valores de KD ainda não foram descritos.

## **II. Justificativa e Objetivos**

Estudos recentes têm demonstrado que vários vírus, parasitas (*Schistosoma mansoni*) e ectoparasitas (carrapatos) expressam proteínas ligantes de quimiocinas ou de citocinas que parecem ser relevantes para a patogênese de doenças causadas por esses microorganismos (Alcami, 2003; Hajnickà *et al.*, 2005; Gillespe *et al.*, 2001, Smith *et al.*, 2005). Por outro lado, proteínas ligantes de quimiocinas podem ser úteis para o tratamento de doenças inflamatórias agudas e crônicas ou para o desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas, uma vez que desempenham papel imunomodulatório e antiinflamatório (Jonhoson *et al.*, 2005).

A proposta do presente trabalho é avaliar a atividade farmacológica de uma família de proteínas ligantes de quimiocina descoberta pela Merck Serono Pharmaceuticals derivada da saliva do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* chamada Evasinas. Ensaios *in vitro* mostram que a Evasina-1 liga-se preferencialmente à MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP1- $\beta$ /CCL4 e PARC/CCL18. A Evasina-3 liga-se seletivamente à GRO- $\alpha$ /CXCL1, IL-8/CXCL8 e homólogos murinos (KC/CXCL1-3 e MIP-2/CXCL1-2). Já a Evasina-4 liga-se à eotaxina/CCL11 e RANTES/CCL5.

### **OBJETIVO PRINCIPAL:**

Avaliar os efeitos farmacológicos da Evasina-1, Evasina-3 e Evasina-4 em modelos animais de inflamação.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS E ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL:**

- 1) Avaliar a eficácia da Evasina-1 em bloquear a função de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 *in vivo* e definir o regime terapêutico que deverá ser usado nos modelos de inflamação aguda e crônica descritos como dependentes de MIP-1 $\alpha$ /CCL3.
- 2) Avaliar os efeitos da Evasina-1 sobre o processo inflamatório desencadeando em uma reação de hipersensibilidade do tipo tardia induzida por albumina bovina metilada (mBSA) ou pelo antígeno do ovo do *Schistosoma mansoni* (SEA)
- 3) Avaliar os efeitos da Evasina-1 sobre a lesão pulmonar e letalidade no modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina.
- 4) Avaliar a habilidade da Evasina-3 *in vivo* em interferir no recrutamento de neutrófilos induzido por KC/CXCL1-3 e LPS.
- 5) Avaliar a habilidade da Evasina-3 em interferir no recrutamento de neutrófilos induzido por ovalbumina (OVA) em animais previamente sensibilizados.

- 6) Avaliar a eficácia da Evasina-4 em prevenir *in vivo* o recrutamento de eosinófilos induzido pela eotaxina/CCL11.
- 7) Avaliar a habilidade da Evasina-4 em inibir o recrutamento de eosinófilos induzido por ovalbumina (OVA) em animais imunizados.

### **III. Material e Métodos**

### 1) Animais

Foram usados camundongos Balb/C machos (18-25 g) ou C57BL/6 machos (18-25 g) com 8-12 semanas de idade, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram acondicionados em ambiente com temperatura controlada e acesso livre à água e comida.

### 2) Drogas e reagentes

Albumina de soro bovino (BSA), albumina de soro bovino metilada (mBSA), ovalbumina (OVA), 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidina, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), lipopolissacarídeo (LPS), o-fenilenediamino (OPD) e adjuvante completo de Freud foram comprados da Sigma (St Louis, MO, U.S.A.). Hidróxido de alumínio foi comprado da Reheiss (Diblin, Ireland) e Tween 80 foi adquirido da Difco (Detroit, MI, U.S.A.). A eotaxina/CCL11 humana, o MIP-1 $\alpha$ /CCL3 murino e o KC/CXCL1-3 foram comprados da PeproTech (Rocky Hill, NJ, U.S.A.). As Evasinas-1, 3 e 4, bem como o MIP-1 $\alpha$ /CCL3 humano foram cedidos pela Merck Serono. Nos experimentos foram usados xilazina (Rompum<sup>®</sup>), ketamina (Dopalen<sup>®</sup>), heparina sódica (Cellporin<sup>®</sup>) e sulfato de bleomicina (Bonar<sup>®</sup>, Laboratório Biossintética). Para realização dos ensaios de FACS os anticorpos anti-CD8-PE, anti-CD4-FITC, anti-CD3-APC, anti-CD11b-APC e anti-Fc foram comprados da R&D systems (Minneapolis, U.S.A.). Para detecção de citocinas e quimiocinas foram utilizados kits murinos específicos TNF- $\alpha$ , TFG- $\beta$ , MCP-1/JE/CCL2, MIP-1 $\alpha$ /CCL3 e RANTES/CCL5 (R&D Systems, Minneapolis, U.S.A.). Os ovos de *Schistosoma mansoni* e o antígeno do ovo de *Schistosoma mansoni* (SEA) foram cedidos pela professora Déborah Negrão do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

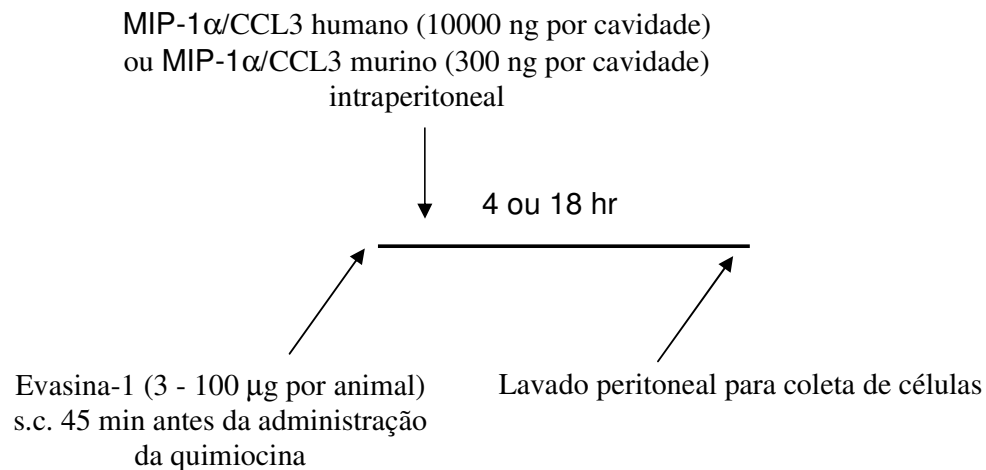
### 3) Migração de leucócitos para a cavidade peritoneal induzida por MIP-1 $\alpha$ /CCL3

Camundongos Balb/C ou C57BL/6 receberam uma injeção intraperitoneal com 200  $\mu$ L de salina tamponada (PBS, pH 7,4) ou MIP-1 $\alpha$ /CCL3 humano (1-10000 ng por cavidade peritoneal) ou MIP-1 $\alpha$ /CCL3 murino (300 ng por cavidade peritoneal) diluído em 200  $\mu$ L de PBS. Para testar a inibição, doses de Evasina-1 variado de 3 a 100  $\mu$ g por animal em 200  $\mu$ L de PBS foram administradas subcutaneamente 45 minutos antes da injeção de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 humano ou MIP-1 $\alpha$ /CCL3 murino. Após 4, 18 ou 24 h horas, os animais foram sacrificados e



a cavidade peritoneal lavada 2 vezes com 3 mL de PBS gelado, sendo as lavagens reunidas para um único animal. A contagem total foi realizada em câmara de Neubaur utilizando corante de Turk. A contagem diferencial foi feita em preparações de citospin (Shandon II) coradas com May Grunwald-Giemsa utilizando critérios morfológicos para identificar os tipos celulares. Os resultados são apresentados como número de células por cavidade.

### Delineamento experimental I



#### 4) Microscopia intravital

Para cada experimento, 300 ng de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 humano diluído em 100  $\mu$ L de PBS foi administrado localmente através de uma injeção subcutânea abaixo da pele escrotal direita utilizando uma agulha de 30G, 1 hora antes da exposição do tecido. Para testar a inibição, uma solução de Evasina-1 (10  $\mu$ g por animal) e MIP-1 $\alpha$ /CCL3 humano (300 ng por animal) em 100  $\mu$ L de PBS foi preparada 15 minutos antes da administração intraescrotal. O cremaster esquerdo foi preparado para a microscopia intravital conforme descrito previamente (Cara & Kubes, 2004). Resumidamente, uma incisão foi feita na pele escrotal para exposição do músculo cremaster esquerdo. Este foi então delicadamente removido da fascia associada. Uma incisão foi feita na superfície ventral do músculo cremaster utilizando um cauterizador. O testículo e o epidídimo foram separados do músculo que os envolvia e foram removidos para o interior da cavidade abdominal. Subsequentemente, o músculo foi esticado sobre uma superfície translúcida e preso nas bordas com uma sutura 4-0. Um microscópio intravital (Olympus BX50F4; Japão) com lentes objetivas de 20X e as oculares de 10X foi utilizado para avaliação da microcirculação do cremaster. Uma câmera de vídeo (5100 HS; Panasonic, Osaka, Japão) foi utilizada para

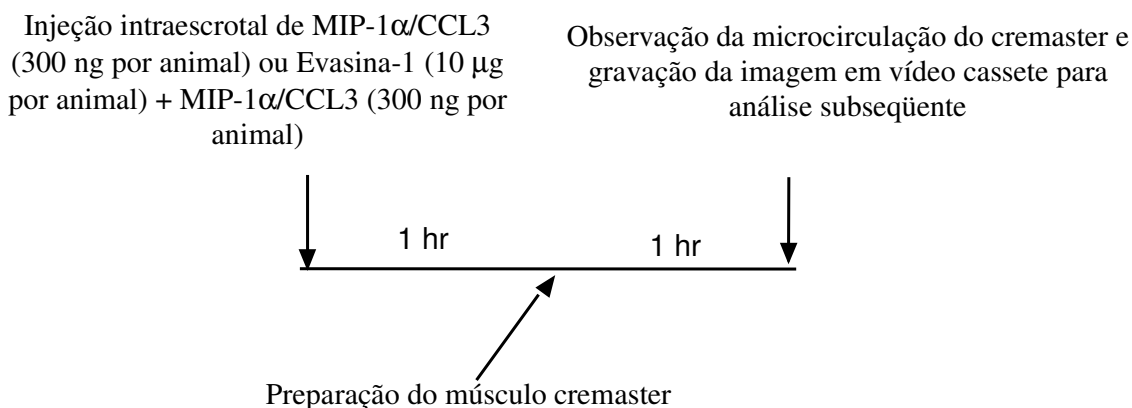
projeção das imagens em um monitor e, as imagens foram gravadas para análise posterior utilizando um fita de video cassete convencional.

Vênulas cremastéricas (25-40  $\mu\text{m}$  de diâmetro) foram escolhidas e, para diminuir a variabilidade, a mesma sessão da vênula cremastérica foi observada durante o experimento. O número de leucócitos rolantes, aderentes e que emigraram para o tecido adjacente foi determinado posteriormente durante a análise da fita de vídeo. Definiu-se como leucócitos rolantes aquelas células que moviam-se a uma velocidade menor a dos eritrócitos do mesmo vaso. O fluxo de leucócitos rolantes foi mensurado como o número de células rolantes que passavam por um dado ponto da vênula por minuto. Definiu-se como leucócitos aderentes aquelas células que se mantinham estacionárias por no mínimo 30 segundos e, a adesão total de leucócitos foi quantificada como o número de células aderentes existentes em 100  $\mu\text{m}$  de comprimento da vênula. Definiu-se como leucócitos emigrantes aquelas células que se encontravam no espaço extravascular dentro de uma área de 50  $\mu\text{m}$  de distância do vaso. Apenas as células adjacentes e visivelmente fora do vaso eram consideradas como emigrantes. No final de cada experimento, o sangue total do animal era recolhido por punção do plexo braquial. A contagem total foi realizada em câmara de Neubaur utilizando corante de Turk.

### **4.1) Análise histopatológica**

Ao final de cada experimento de microscopia intravital, o músculo cremaster era removido e fixado em uma solução contendo 10% de formalina tamponada neutra. Posteriormente, o tecido era gradualmente desidratado em etanol, embebido em parafina, cortado em sessões de 4  $\mu\text{m}$ , corado com hematoxilina & eosina e examinado ao microscópio óptico.

### Delineamento experimental II



**A solução de Evasina-1 + MIP-1 $\alpha$ /CCL3 foi preparada 15 min antes da injeção intraescrotal**

### 5) Reação de hipersensibilidade do tipo tardia na cavidade pleural induzida por mBSA

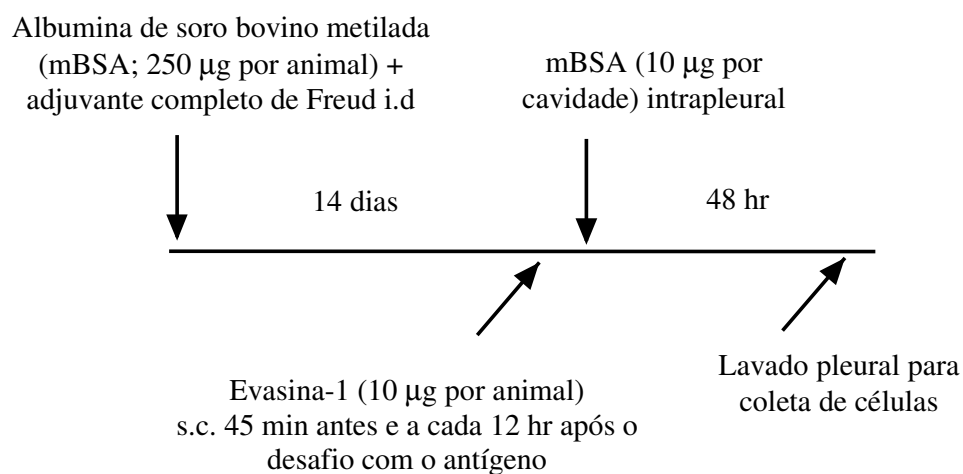
Camundongos Balb/C foram imunizados com uma emulsão 1:1 de mBSA (5 mg/mL em PBS) e adjuvante completo de Freud. Esta preparação foi delicadamente emulsificada até que uma mistura consistente foi obtida. A consistência da emulsão foi testada periodicamente durante a preparação através da adição de uma gota da mistura sobre uma superfície de água gelada. Quando a gota se manteve intacta, a emulsão foi acondicionada em uma seringa de vidro e injetado o volume de 100  $\mu$ L intradermicamente próximo do linfonodo inguinal. Cada animal recebeu na imunização 250  $\mu$ g de antígeno. Quatorze dias após a sensibilização, 100  $\mu$ L do veículo ou do antígeno (mBSA 10  $\mu$ g por cavidade pleural) em 100  $\mu$ L de PBS foi injetado intrapleuralmente nos animais imunizados. Para testar a inibição, a Evasina-1 (10  $\mu$ g por animal) em 200  $\mu$ L de PBS foi administrada subcutaneamente 45 minutos antes do desafio e posteriormente à cada 12 horas. Os animais foram sacrificados 48 horas após o desafio com o antígeno. A cavidade pleural foi lavada 2 vezes com 1 mL de PBS gelado, sendo as lavagens reunidas para um único animal. A contagem total foi realizada em câmara de Neubaur utilizando corante de Turk. A contagem diferencial foi feita em preparações de citospin (Shandon II) coradas com May Grunwald-Giemsa utilizando critérios

morfológicos para identificar os tipos celulares. Os resultados são apresentados como número de células por cavidade.

### 5.1) Citometria de fluxo

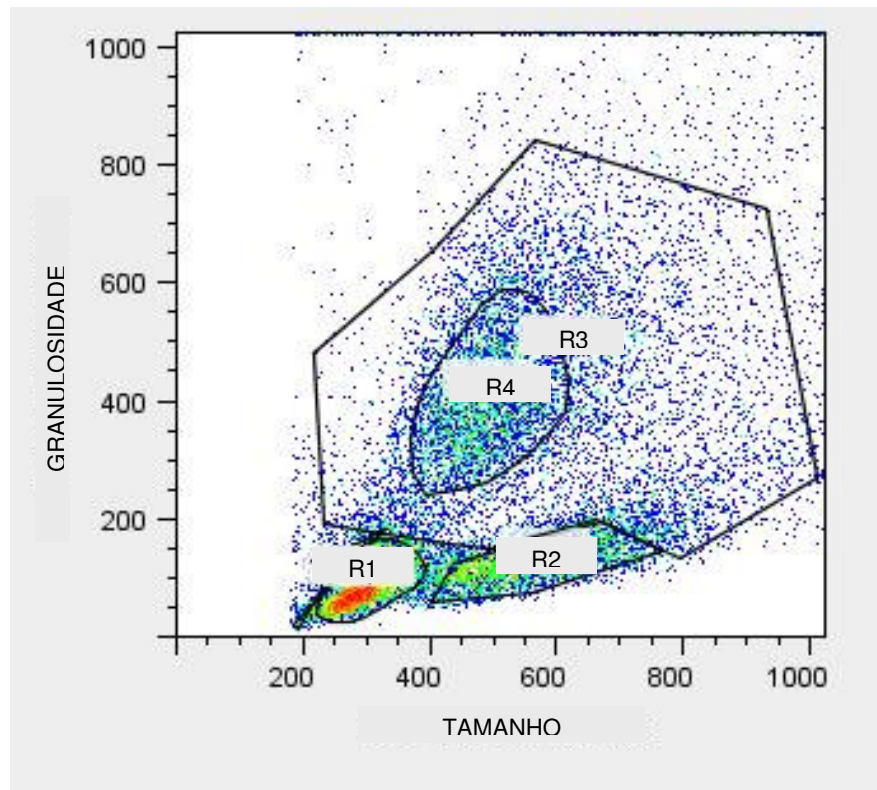
Quarenta e oito horas após o desafio, os animais foram sacrificados e a cavidade pleural lavada com 200  $\mu$ L de uma solução contendo 1% de mBSA em PBS. Os eritrócitos foram lisados e as amostras centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm. O pellet foi ressuscitado em 200  $\mu$ L de um tampão contendo 5% de albumina de soro bovino e 0,01% de azida sódica. As células foram coradas com anticorpos marcados com isotiocianato de fluorescina (FITC) ou ficoeritrina (PE) ou alofocianina (APC) por 20 minutos a 4<sup>o</sup>C. Para prevenir ligações não específicas aos receptores Fc um reagente de bloqueio foi adicionado à mistura de anticorpos monoclonais. Posteriormente, as células foram lavadas com uma solução de 0,01% de azida sódica em PBS e fixadas em uma solução contendo 2% de formaldeído em PBS. Os anticorpos utilizados para marcação extracelular foram: anti-CD8-PE, anti-CD4-FITC, anti-CD3-APC e anti-CD11b-APC. As células coradas foram analisadas utilizando um programa FACSVANTAGE ou FACScan (Becton&Dickinson) e o programa da software Cell Quest.

### Delineamento experimental III



## 5.2) Análise dos resultados de FACS

Os leucócitos foram analisados através do perfil de distribuição tamanho *versus* granulosidade e pelas frequências dos marcadores de superfície utilizando o programa Cell Quest (Becton&Dickinson) conforme pode ser visualizado na Figura 5. Os limites para cada quadrante de marcadores foram sempre analisados baseando-se nas populações negativas e nos isotipos controles.



**Figura 5**

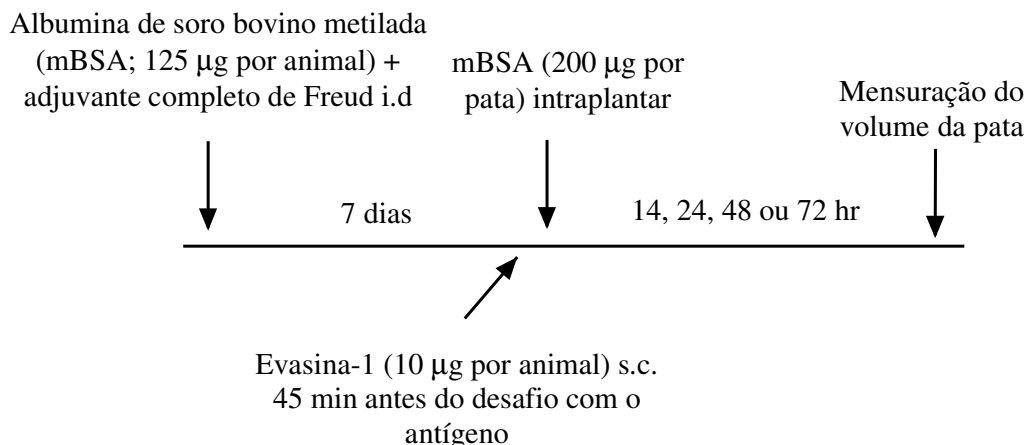
Perfil da distribuição celular no gráfico de tamanho *versus* granulosidade. Regiões contendo linfócitos pequenos estão representadas por R1, células blásticas por R2, monócitos/macrófagos por R3 e granulócitos por R4. Os resultados apresentados foram obtidos por análises da região R1 (linfócitos) avaliando a expressão de moléculas de superfície (CD3, CD4 e CD8). Também foi analisada a região R3 para avaliação da expressão da molécula de superfície CD11b.

**6) Reação de hipersensibilidade do tipo tardia na pata**

Camundongos Balb/C receberam uma injeção intradérmica na base da cauda de uma emulsão 1:1 contendo 200 µL de 1,25 mg/mL de mBSA e adjuvante completo de Freud no dia 1 como descrito previamente (Sutherland *et al.*, 2005). No dia 7, os animais foram desafiados em uma das patas traseiras com uma injeção de 20 µL de 10 mg/mL de uma solução de mBSA, a pata oposta recebeu 20 µL de PBS. Para testar a inibição, Evasina-1 (10 µg por animal) em 200 µL de PBS foi administrada subcutaneamente 45 minutos antes do desafio. O aumento de volume da pata foi avaliado 14-72 horas após o desafio utilizando-se o pletismômetro (UGO BASILE, MOD. 7140: ITALIA). O edema foi calculado como sendo a diferença (µL) entre o volume da pata em diferentes tempos pelo valor basal a partir da equação seguinte. Os resultados são apresentados com a variação de volume.

$$\frac{\text{volume da pata no tempo analisado } (\mu\text{L}) - \text{volume da pata antes do desafio } (\mu\text{L})}{\text{volume da pata antes do desafio } (\mu\text{L})} \times 100$$

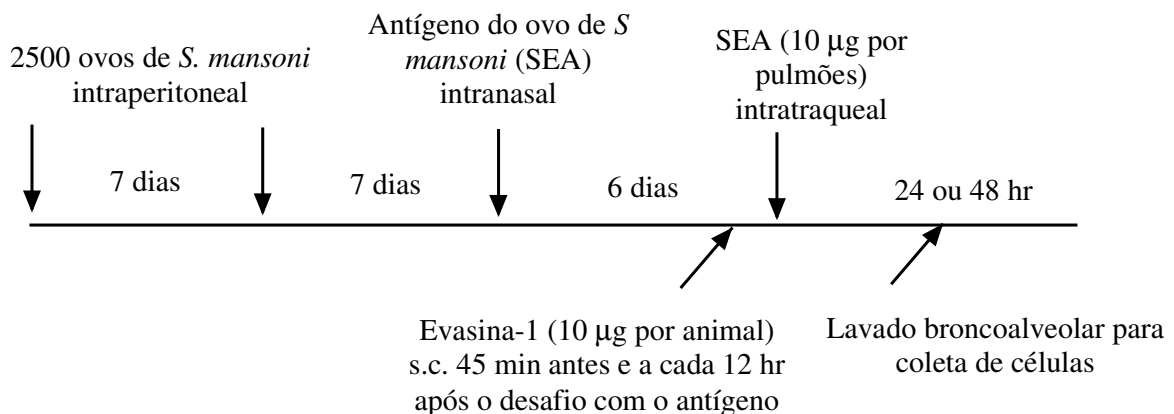
**Delineamento experimental IV**



### 7) Sensibilização e indução de recrutamento celular do tipo TH2 para os pulmões

Camundongos Balb/C foram imunizados intraperitonealmente com 2500 ovos de *Schistosoma mansoni* nos dias 0 e 7 como descrito previamente (Lukacs *et al.*, 1996). No dia 14 os animais receberam um desafio intranasal com 10 µg de antígeno de ovo de *Schistosoma mansoni* (SEA) em 10 µL de PBS para localizar a resposta para as vias aéreas. Após 6 dias, os animais foram desafiados novamente através da administração intratraqueal de 10 µg de SEA em 25 µL de PBS ou somente PBS (veículo). Para testar a inibição, Evasina-1 (10 µg por animal) foi administrada subcutaneamente 45 minutos antes do desafio intratraqueal e posteriormente à cada 12 horas. Os animais foram sacrificados 24 ou 48 horas após a injeção intratraqueal e, os pulmões foram lavados 3 vezes com 1 mL de PBS gelado através de uma cânula traqueal. O fluido era recuperado dos pulmões após uma delicada massagem para remover as células, sendo as lavagens reunidas para um único animal. A contagem total foi realizada em câmara de Neubaur utilizando corante de Turk. A contagem diferencial foi feita em preparações de citospin (Shandon II) coradas com May Grunwald-Giemsa utilizando critérios morfológicos para identificar os tipos celulares. Os resultados são apresentados como números de células por pulmões.

#### Delineamento experimental V



### 8) Modelo experimental de fibrose pulmonar induzida por bleomicina

Sulfato de bleomicina (Bonar<sup>®</sup>, Laboratório Biossintética) foi utilizado como estímulo para a indução do modelo experimental de fibrose pulmonar (Izbicki *et al.*, 2002). Camundongos C57Bl/6 foram anestesiados por via intraperitoneal com 80 µL de uma solução à base de ketamina e xilazina (respectivamente 3,2 mg e 0,16 mg por animal, em solução salina 0,9%, em uma proporção 4:1:5, 4 mL de ketamina, 1 mL de xilazina e 5 mL de PBS) para subsequente traqueotomia. Cada animal recebeu uma injeção por via intratraqueal de 25 µL de veículo (salina 0,9% estéril) ou bleomicina (0,0625 U ou 0,125U). Para testar a inibição, Evasina-1 10 µg por animal em 200 µL de PBS foi administrada subcutaneamente 45 minutos antes da instilação de bleomicina e posteriormente duas vezes ao dia. Para avaliar o efeito do início tardio do tratamento com a Evasina-1, os animais começaram a ser tratados somente no oitavo dia após a instilação com a bleomicina. Após 4, 8 ou 25 dias os animais foram sacrificados com uma dose letal de anestésico ketamina e xilazina (500 µL por animal) com subsequente deslocamento cervical para posterior realização do lavado broncoalveolar e retirada do pulmão. Foram realizados contagens celulares do lavado, ensaios enzimáticos com o lavado broncoalveolar e pulmão, e análises morfológicas e morfométricas descritas abaixo.

#### 8.1) Lavado broncoalveolar

O lavado broncoalveolar foi realizado para se obter leucócitos presentes no espaço alveolar. Após sacrifício nos tempos determinados, a traquéia de cada animal foi exposta novamente e canulada com um catéter de polipropileno de 1,7 mm. O lavado foi feito através da injeção de duas alíquotas de 1 mL de PBS gelado, injetadas e recolhidas 3 vezes cada uma, obtendo-se 1,7 – 2,0 mL de volume final recuperado do lavado. O líquido recolhido do lavado foi centrifugado em tubos de 5 mL a 4°C, por 5 minutos, a uma velocidade de 1500 rpm, formando um *pellet* de células utilizado para contagem total e diferencial de células. O sobrenadante do centrifugado foi congelado para posteriores ensaios de detecção citocinas e quimiocinas. A contagem total foi realizada em câmara de Neubaur utilizando corante de Turk. A contagem diferencial foi feita em preparações de citospin (Shandon II) coradas com May Grunwald-Giemsa utilizando critérios morfológicos para identificar os tipos celulares. Os resultados são apresentados como número de células por pulmões.



### 8.2) Retirada do pulmão e processamento das amostras

Ao término do lavado broncoalveolar, os pulmões dos animais foram perfundidos com 5 mL de PBS pelo ventrículo direito do coração, para remoção de sangue do leito vascular pulmonar, e imediatamente extraídos. O pulmão direito foi congelado para posterior dosagem de NAG e MPO; o pulmão esquerdo foi utilizado para análise histopatológica. Foram pesados 100 mg do pulmão direito e homogeneizados em 0,9 mL de uma solução contendo NaCl 0,4 M, NaPO<sub>4</sub> 10 mM, PMSF 0,1 mM, cloreto de benzetônio 0,1 mM, EDTA 10 mM, Tween 20 0,05%, 0,5% de BSA, 20 KI aprotinina, numa relação de 10% peso/volume, e posteriormente centrifugados a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C. A detecção das atividades de NAG e MPO foi feita no *pellet*, após processamento das amostras para estes ensaios. Desta maneira, o *pellet* foi ressuspensão em 2 mL de tampão fosfato (0,1 M NaCl, 0,02 M NaPO<sub>4</sub>, 0,015 M NaEDTA; pH 4.7), homogeneizado por 1 minuto; 1,5 mL de NaCl 0,2% foi adicionado e homogeneizado novamente; 1,5 mL de NaCl 1,6% com 5% de glicose foi adicionado, homogeneizado e vortexado. Após esta etapa, o volume total (1,6 mL) foi dividido em dois tubos, 0,8 mL para cada tubo, para determinação de NAG e MPO. Estas amostras foram centrifugadas a 4°C, por 15 minutos, a uma velocidade de 10.000 rpm e o sobrenadante foi posteriormente descartado. Para o ensaio de NAG, as amostras foram ressuspensas e homogeneizadas em 0,8 mL de salina 0,9% com 0,1% v/v de Triton X-100, centrifugadas a 4°C, por 10 minutos a 1.500 rpm e o ensaio foi feito com o sobrenadante destas amostras. Para o ensaio de MPO, as amostras foram ressuspensas e homogeneizadas em 0,8 mL de tampão fosfato (0,05 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5% HETAB; pH 5,4), congeladas em nitrogênio líquido e então descongeladas, sendo este processo repetido por 3 vezes. Após esta etapa, as amostras para MPO foram centrifugadas à 4° C, por 15 minutos a 10.000 rpm e o sobrenadante utilizado para o ensaio.

### 8.3) Ensaio para detecção dos níveis de n-acetilglicosaminidase (NAG) tecidual

A quantidade de macrófagos acumulados nos pulmões foi mensurada pelo ensaio da atividade de NAG conforme descrito anteriormente (Barcelos *et al.*, 2005). A reação é iniciada pela adição de 100 µL de p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminidina (Sigma), diluído em tampão citrato/fosfato (ácido cítrico 0,1 M; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M; pH 4,5) na concentração final de 2,24 mM, a 100 µL de sobrenadante das amostras previamente processadas e diluídas em tampão citrato/fosfato, em placas de 96 poços, por 10 minutos à 37°C. Ao final desta etapa

adicionou-se 100 µL de tampão glicina 0,2 M (pH 10,6) para término da reação. As placas de 96 poços foram lidas em leitor de ELISA (Emax, Molecular Devices) a 405 nm. O conteúdo de macrófagos foi calculado com base na curva-padrão de NAG, feita pela coleta de macrófagos peritoneais recolhidos de animais estimulados com 3 mL de tioglicolato 3% (dados não mostrados). Os resultados são apresentados como número relativo de células por pulmões.

### 8.4) Ensaio para detecção dos níveis de mieloperoxidase (MPO) tecidual

A quantidade de neutrófilos acumulados nos pulmões foi mensurada pelo ensaio da atividade de MPO conforme descrito anteriormente (Souza *et al.*, 2002). O ensaio utiliza 25 µL de 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, Sigma) dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) com concentração final de 1,6mM; 100 µL de tampão fosfato (0,05 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5% H-TAB; pH 5,4) com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluído numa concentração final de 0,003% v/v, e 25 µL de sobrenadante das amostras de tecidos previamente processadas. A reação se inicia pela adição de tetrametilbenzidina as amostras em placas de 96 poços, a 37°C por 5 minutos. Após esta etapa, adicionou-se H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluída em tampão fosfato e encubou-se A 37°C por 5 minutos. Ao final desta etapa adicionou-se 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 M para término da reação. As placas de 96 poços foram lidas em leitor de ELISA (Emax, Molecular Devices) a 450 nm. O conteúdo de neutrófilos foi calculado com base em curva padrão de MPO, feita pela coleta de neutrófilos peritoneais recolhidos de animais estimulados com 3 mL de caseína 5% (dados não mostrados). Os resultados são apresentados como número relativo de neutrófilos por pulmões.

### 8.5) Citometria de fluxo

Oito dias após a estimulação com a bleomicina, os animais foram sacrificados e realizado um lavado broncoalveolar com 200 µL de uma solução contendo 1% de mBSA em PBS. Os eritrócitos foram lisados e as amostras centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm. O pellet foi ressuspenso em 200 µL de um tampão contendo 5% de albumina de soro bovino e 0,01% de azida sódica. As células foram coradas com anticorpos marcados com isotiocianato de fluorescina (FITC) ou ficoeritrina (PE) ou alofococianina (APC) por 20 minutos A 4°C. Para prevenir ligações não específicas aos receptores Fc um reagente de bloqueio foi adicionado à mistura de anticorpos monoclonais. Posteriormente, as células foram lavadas com uma solução de 0,01% de azida sódica em PBS e fixadas em uma solução contendo 2% de formaldeído em PBS. Os anticorpos utilizados para marcação extracelular foram: anti-CD8-PE (R&D systems),

anti-CD4-FITC (R&D systems), anti-CD3-APC (R&D systems) e anti-CD11b-APC (R&D systems). As células coradas foram analisadas utilizando um programa FACSVANTAGE ou FACScan (Becton&Dickinson) e o programa da software Cell Quest.

### 8.5.1) Análise dos resultados de FACS

Os leucócitos foram analisados através do perfil de distribuição tamanho *versus* granulosidade e pelas frequências dos marcadores de superfície utilizando o programa Cell Quest (Becton&Dickinson) conforme pode ser visualizado na Figura 5. Os limites para cada quadrante de marcadores foram sempre analisados baseando-se nas populações negativas e nos isotipos controles.

### 8.6) Detecção de citocinas e quimiocinas

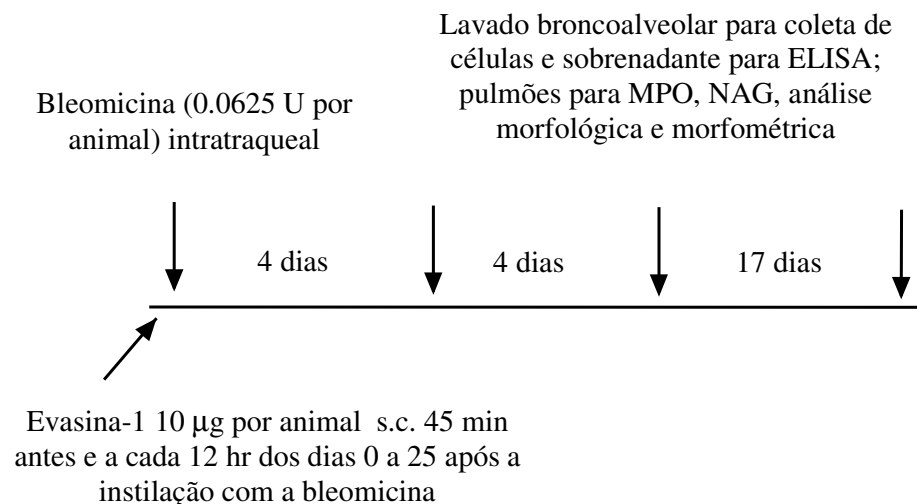
Para a dosagem das citocinas TNF- $\alpha$  e TFG- $\beta$ ; e das quimiocinas MCP-1/JE/ CCL2, MIP-1 $\alpha$ /CCL3 e RANTES/CCL5 foram utilizados kits murinos específicos (R&D Systems, Minneapolis) onde foram seguidas as instruções do fabricante. Basicamente, 100  $\mu$ L/poço do anticorpo de captura (5,5  $\mu$ L/mL) diluído em PBS estéril foram adicionados a cada placa (NUNC FLAT, 96-well, FALCON). Estas foram vedadas e incubadas a 4°C “overnight”. O conteúdo de cada placa foi retirado e esta foi lavada 3 vezes (300  $\mu$ L/poço) com um tampão de lavagem (PBS/Tween 20 0,05%). Após este procedimento, adicionou-se 300  $\mu$ L/poço do tampão de bloqueio (BSA 1% em PBS). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por no mínimo uma hora. Repetiu-se o procedimento de lavagem e adicionou-se 100  $\mu$ L/poço das amostras, lavado broncoalveolar e padrões, diluídos em tampão de diluição (BSA 0,1% em PBS 1X). As placas foram novamente incubadas “overnight”. Repetiu-se o procedimento de lavagem e foram adicionados 100 $\mu$ L/poço do anticorpo de detecção biotilado (5,55  $\mu$ L/mL) diluído em tampão de diluição (o mesmo das amostras e padrões). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 2 horas. Após mais um procedimento de lavagem, adicionou-se 100  $\mu$ L/poço de estreptavidina – HRP 1:200 em tampão de diluição e incubou-se as placas à temperatura ambiente por 20 minutos. Novamente as placas foram lavadas e adicionou-se 100  $\mu$ L/poço do substrato OPD (em tampão citrato pH 5 com adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). As placas foram incubadas por 20-30 minutos, à temperatura ambiente, protegidas da luz. Após este período observou-se a formação de cor e foram adicionados 50  $\mu$ L/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M para interromper a reação. As placas foram lidas em leitor de ELISA (Emax, Molecular

Devices) a 492 nm. Os resultados são apresentados como quantidade de proteína por 100 mg de tecido.

### 8.7) Análise histopatológica e morfométrica

O pulmão esquerdo foi retirado da cavidade torácica e colocado em PBS 1X com 10% de formaldeído, para posterior inclusão em parafina. Estas amostras foram colocadas em uma câmara de vácuo, com pressão negativa de  $1.33 \times 10^4$  Pa (van Kuppevelt *et al.*, 2000), equivalentes a 99.758246 mmHg, durante 10 minutos, para que os pulmões fossem inflados, restabelecendo sua estrutura morfológica normal. A lesão pulmonar e fibrose foram analisadas qualitativamente, após coloração por hematoxilina & eosina e Tricrômico de Gomori respectivamente, em microscópios ópticos com objetiva de 20 e 40X. Para análise quantitativa da área corada com Tricrômico de Gomori, eram capturadas imagens abrangendo  $326.000 \mu\text{m}^2$  de pulmão com uma câmera digital (Optronics DEI-470) conectada a um microscópio (Olympus IX70). As áreas de colágeno (coradas em verde) eram mensuradas com o software Image Pro-Plus. Pelo menos 20 imagens eram obtidas para cada animal, sendo 6 animais por grupo. Os resultados são expressos com média de área verde por  $\mu\text{m}^2$ . Este índice morfométrico foi utilizado para descrever deposição de colágeno nos pulmões.

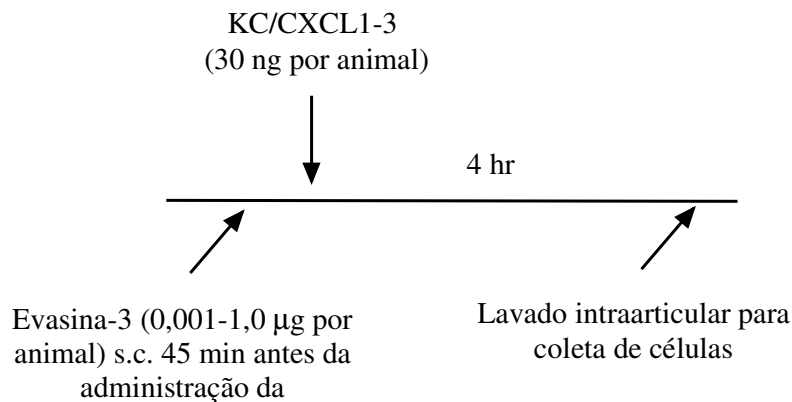
### Delineamento experimental VI



**9) Indução do recrutamento celular para a cavidade articular induzido por KC**

Camundongos Balb/C receberam uma injeção na articulação tíbia-femural de KC/CXCL1-3 (30 ng por cavidade articular) ou veículo (10 µL por cavidade articular). Para testar a inibição, a Evasina-3 (0,001-1,0 µg por animal) em 200 µL de PBS foi administrada subcutaneamente 45 minutos antes da injeção intraarticular de KC/CXCL1-3. Quatro horas após a estimulação, os camundongos foram sacrificados e as células presentes na cavidade foram recolhidas com 10 µL de uma solução contendo 3% de BSA em PBS. A contagem total foi realizada em câmara de Neubauer usando corante de Turk. A contagem diferencial foi feita em preparações de cytopspin (Shandon III) coradas com May Grunwald-Giemsa utilizando critérios morfológicos para identificar os tipos celulares. Os resultados são apresentados como número de células por cavidade.

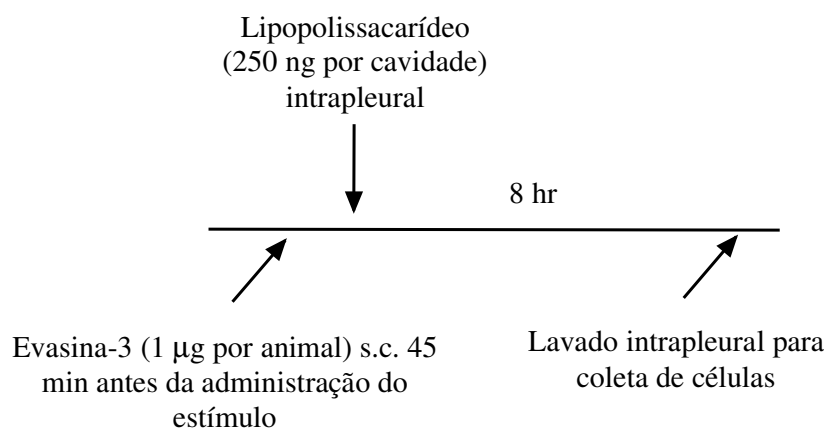
**Delineamento experimental VII**



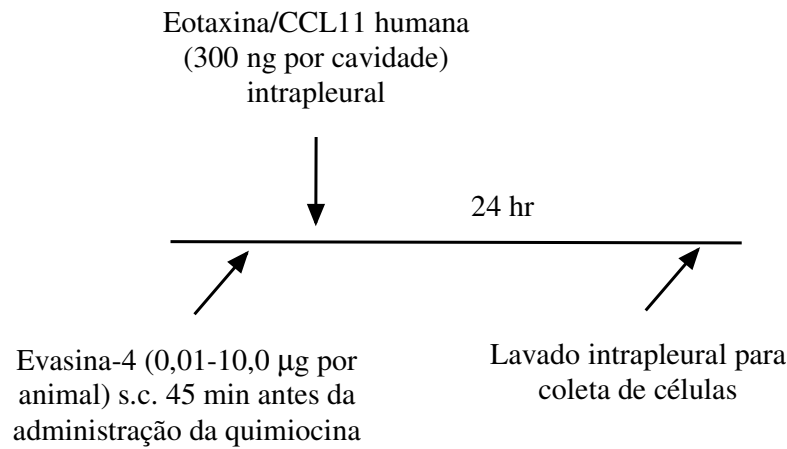
### 10) Indução do recrutamento celular para a cavidade pleural induzido por lipopolissacarídeo (LPS) ou eotaxina/CCL11

Camundongos Balb/C receberam uma injeção intrapleural de LPS (250 ng por cavidade pleural) (Delineamento experimental VIII) ou eotaxina/CCL11 humana (300 ng por cavidade pleural) (Delineamento experimental IX) ou veículo (100  $\mu$ L por cavidade pleural). Para testar a inibição, a Evasina-3 (1  $\mu$ g por animal) em 200  $\mu$ L de PBS foi administrada subcutaneamente 45 minutos antes da injeção intrapleural de LPS. A Evasina-4 (0,01-10,0  $\mu$ g por animal) em 200  $\mu$ L de PBS foi administrada subcutaneamente 45 minutos antes da injeção intrapleural de eotaxina/CCL11. Após 8 horas (animais estimulados com LPS) ou 24 horas (animais estimulados com eotaxina/CCL11) os camundongos foram sacrificados e as células presentes na cavidade foram recolhidas com 2 mL de PBS. A contagem total foi realizada em câmara de Neubauer usando corante de Turk. A contagem diferencial foi feita em preparações de cytopspin (Shandon III) coradas com May Grunwald-Giemsa utilizando critérios morfológicos para identificar os tipos celulares. Os resultados são apresentados como número de células por cavidade.

#### Delineamento experimental VIII



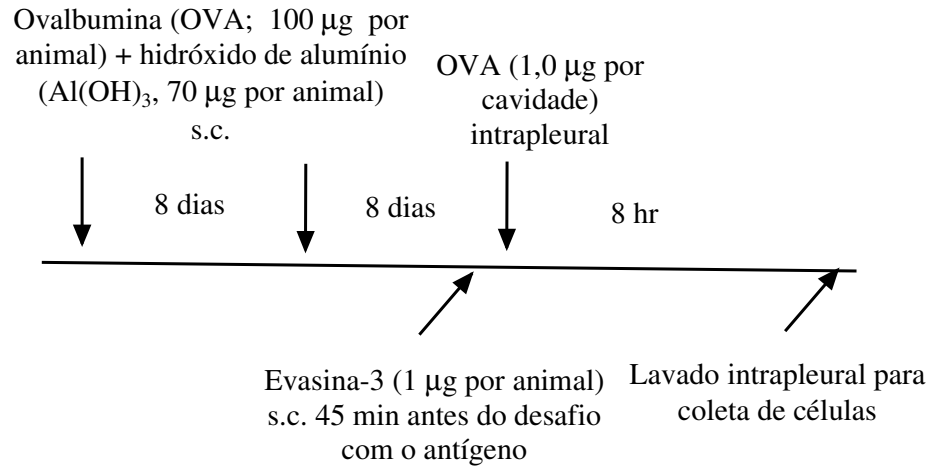
### Delineamento experimental IX



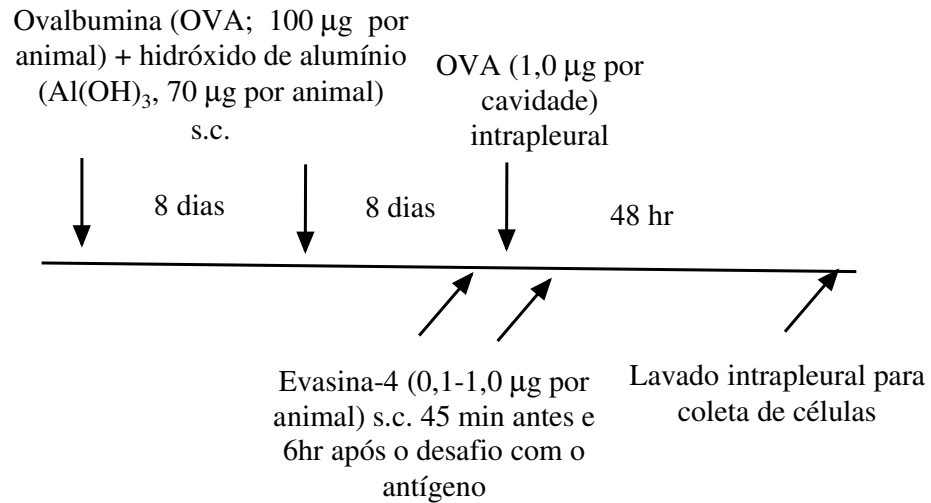
#### 11) Sensibilização e indução do recrutamento celular para a cavidade pleural induzido por ovalbumina (OVA)

Camundongos Balb/C foram imunizados com ovalbumina (OVA) adsorvida em gel de hidróxido de alumínio como descrito previamente (Das *et al.*, 1997). Resumidamente, os animais foram injetados subcutaneamente nos dias 1 e 8 com 0,2 mL de uma solução contendo 100 µg de OVA e 70 µg de hidróxido de alumínio. Oito dias depois da última imunização, o antígeno (OVA, 1,0 µg por cavidade pleural) ou veículo (100 µL por cavidade pleural) foi injetado intrapleuralmente nos animais sensibilizados. Para testar a inibição, a Evasina-3 (1 µg por animal) ou a Evasina-4 (0,1-1,0 µg por animal) em 200 µL de PBS foram administradas subcutaneamente 45 minutos antes do desafio com OVA. Os animais que receberam Evasina-4 foram novamente tratados 6 horas após o desafio. Após 8 horas (animais tratados com Evasina-3) (Delineamento experimental X) ou 24 horas (animais tratados com Evasina-4) (Delineamento experimental XI) os camundongos foram sacrificados e as células presentes na cavidade foram recolhidas com 2 mL de PBS. A contagem total foi realizada em câmara de Neubauer usando corante de Turk. A contagem diferencial foi feita em preparações de cytopspin (Shandon III) coradas com May Grunwald-Giemsa utilizando critérios morfológicos para identificar os tipos celulares. Os resultados são apresentados como número de células por cavidade.

**Delineamento experimental X**



**Delineamento experimental XI**





### 12) Análise estatística

Os resultados são apresentados com média  $\pm$  erro padrão da média. A diferença estatística entre os grupos foi determinada pela one-way ANOVA e complementada pelo teste Student-Newman-Keuls. O valor  $P < 0,05$  foi considerado significativo.

## **IV. Resultados**

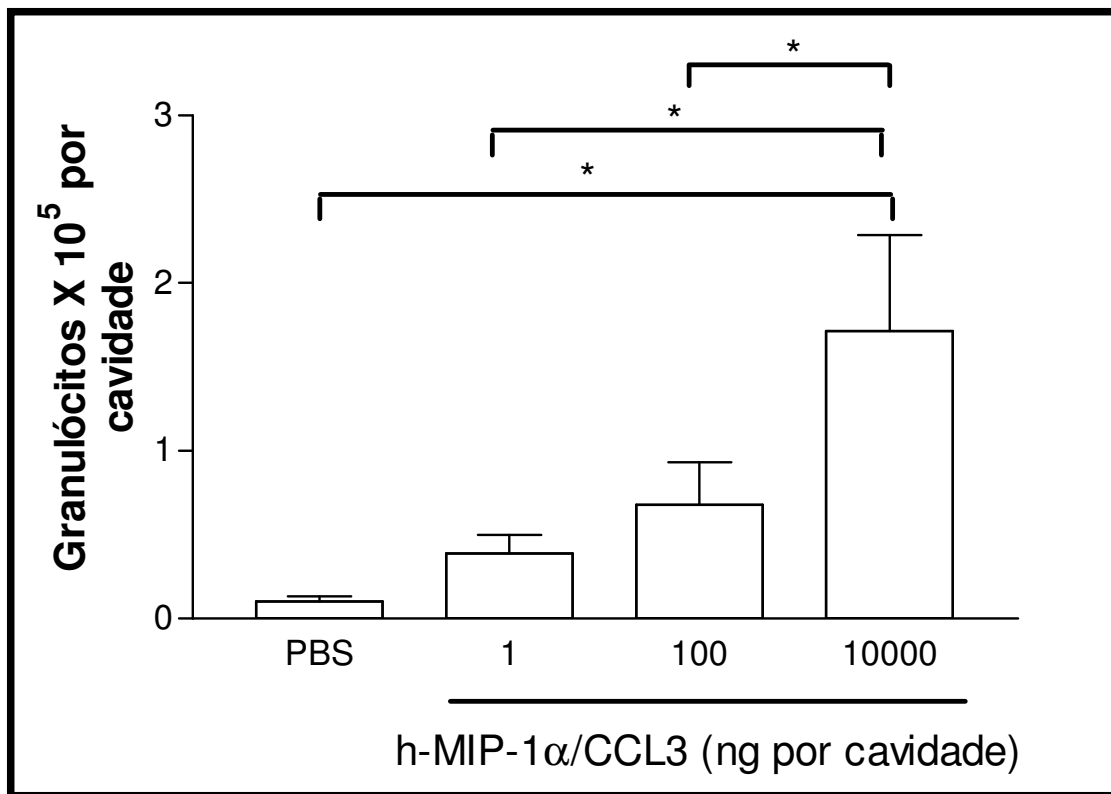
### **1) Efeito da Evasina-1 sobre o recrutamento celular induzido por MIP-1 $\alpha$ /CCL3**

Os experimentos iniciais foram realizados com o objetivo de avaliar a habilidade do MIP-1 $\alpha$ /CCL3 humano, cedido pela Merck Serono, em induzir o influxo de leucócitos nas condições do nosso laboratório e investigar o possível efeito da Evasina-1 sobre este evento.

A quimiocina MIP-1 $\alpha$ /CCL3 humana induziu de maneira dose-dependente (Figura 6) e tempo-dependente (dados não mostrados) um influxo de granulócitos quando injetada na cavidade peritoneal. Assim, foi escolhida a dose de 10.000 ng de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 humano e o tempo de 18 horas para a realização dos próximos ensaios, os quais desejávamos avaliar migração de granulócitos.

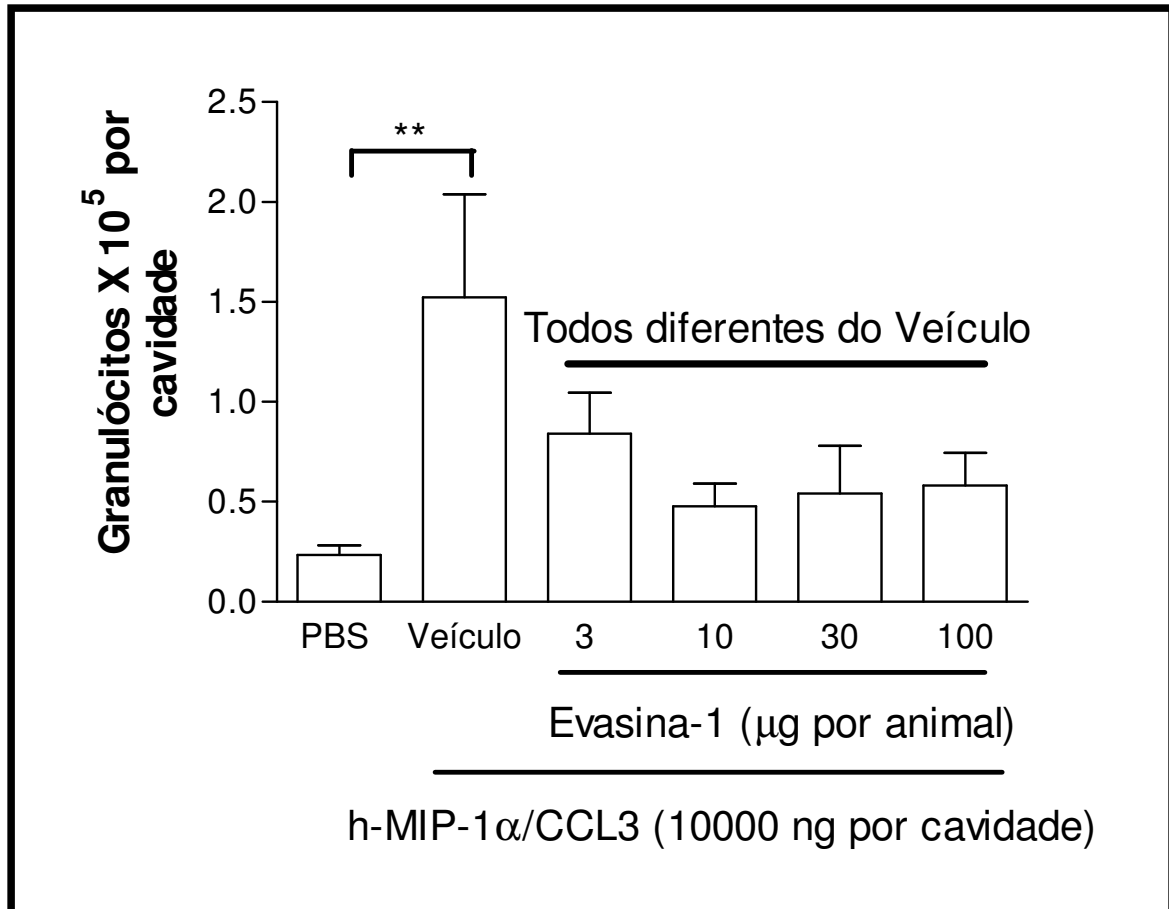
O pré-tratamento com a Evasina-1 45 minutos antes da injeção de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 humano preveniu este aumento do recrutamento celular tanto em camundongos Balb/C (Figura 7) quanto em animais C57BL/6 (Figura 8).

Corroborando os resultados obtidos com a quimiocina MIP-1 $\alpha$ /CCL3 humana, o pré-tratamento com a Evasina-1 45 minutos antes da injeção de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 murino reduziu a migração de granulócitos para a cavidade peritoneal induzida pelo MIP-1 $\alpha$  murino (Figura 9).



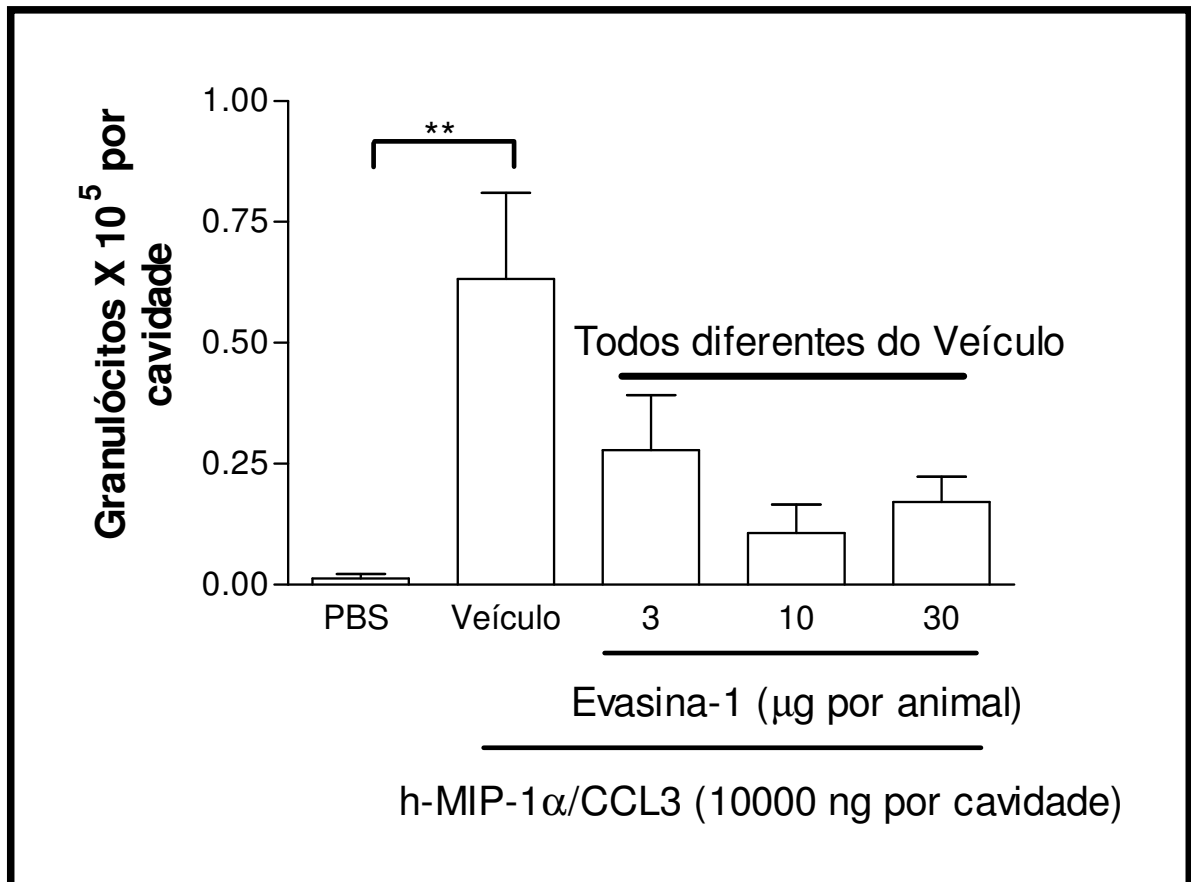
**Figura 6**

Efeito da administração intraperitoneal de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 humano sobre recrutamento de granulócitos para a cavidade peritoneal. Os animais receberam uma injeção intraperitoneal de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 humano (1-10000 ng por cavidade) ou veículo (200  $\mu$ L por cavidade) e 18 h após o estímulo o número de leucócitos foi avaliado. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média de 5-6 animais em cada grupo. \* P < 0,05

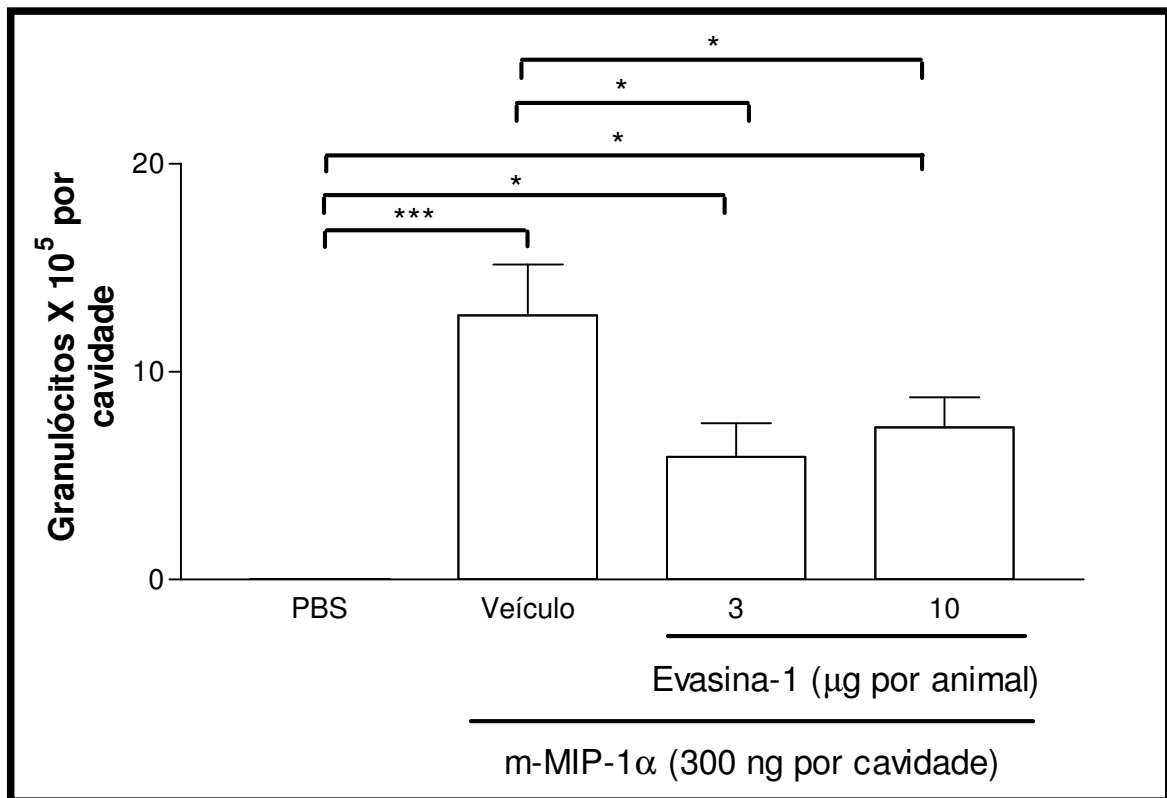


**Figura 7**

Efeito do pré-tratamento com a Evasina-1 sobre o recrutamento de granulócitos para a cavidade peritoneal induzido pelo MIP-1α/CCL3 humano em camundongos Balb/C. Os animais receberam uma injeção intraperitoneal de MIP-1α/CCL3 humano (10000 ng por cavidade) ou PBS (200 µL por cavidade) e 18 h após o estímulo o número de leucócitos foi avaliado. Para testar a inibição, os animais foram injetados s.c. com Evasina-1 (3-100 µg por animal) 45 min antes do estímulo com MIP-1α/CCL3 humano. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média de 5-6 animais em cada grupo. \* P < 0,05 e \*\* P < 0,01.

**Figura 8**

Efeito do pré-tratamento com a Evasina-1 sobre o recrutamento de granulócitos para a cavidade peritoneal induzido pelo MIP-1 $\alpha$ /CCL3 humano em camundongos C57BL/6. Os animais receberam uma injeção intraperitoneal de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 humano (10000 ng por cavidade) ou PBS (200  $\mu$ L por cavidade) e 18 h após o estímulo o número de leucócitos foi avaliado. Para testar a inibição, os animais foram injetados s.c. com Evasina-1 (3-30  $\mu$ g por animal) 45 min antes do estímulo com MIP-1 $\alpha$ /CCL3 humano. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média de 5-6 animais em cada grupo. \* P < 0,05 e \*\* P < 0,01.



**Figura 9**

Efeito do pré-tratamento com a Evasina-1 sobre o recrutamento de granulócitos para a cavidade peritoneal induzido pelo MIP-1 $\alpha$ /CCL3 murino em camundongos Balb/C. Os animais receberam uma injeção intraperitoneal de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 murino (300 ng por cavidade) ou PBS (200  $\mu$ L por cavidade) e 4 h após o estímulo o número de leucócitos foi avaliado. Para testar a inibição, os animais foram injetados s.c. com Evasina-1 (3-10  $\mu$ g por animal) 45 min antes do estímulo com MIP-1 $\alpha$ /CCL3 murino. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média de 5-6 animais em cada grupo. \* P < 0,05 e \*\*\* P < 0,001.

## **2) Efeito da Evasina-1 sobre o processo de rolamento, adesão e migração de leucócitos induzido por MIP-1 $\alpha$ /CCL3**

O próximo experimento foi realizado utilizando-se microscopia intravital com o objetivo de avaliar se a Evasina-1 poderia interferir nos processos de rolamento, adesão e emigração de leucócitos induzido pelo MIP-1 $\alpha$ /CCL3 humano. Utilizamos a dose de 300 ng por animal de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 baseada em estudos prévios, que demonstraram ser esta dose adequada para o estudo em microscopia intravital (Wan *et al.*, 2003).

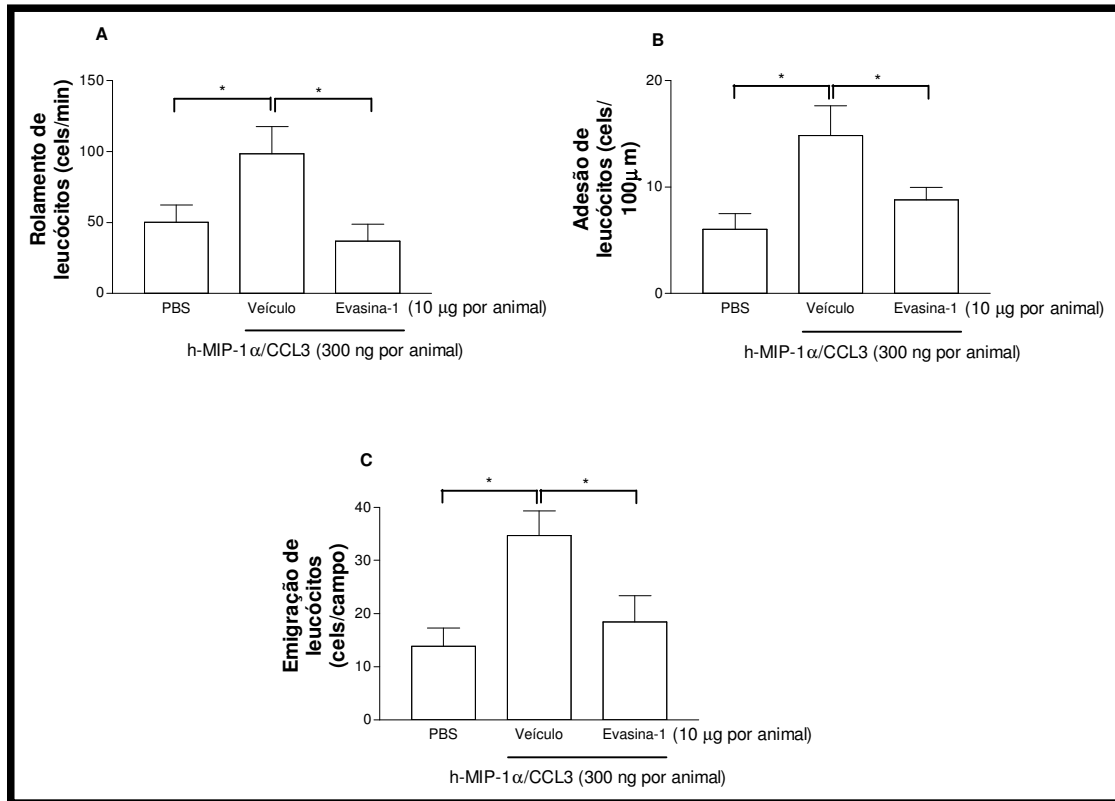
A administração intraescrotal de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 humano promoveu um aumento do rolamento, adesão e emigração de leucócitos (Figura 10A, 10B e 10C). A pré-incubação da Evasina-1 com o MIP-1 $\alpha$ /CCL3 humano diminuiu de forma significativa o rolamento, adesão e emigração de leucócitos (Figura 10A, 10B e 10C). Assim, a Evasina-1 preveniu a habilidade de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 de facilitar o influxo celular.

Para identificar o tipo celular recrutado para o sítio inflamatório após a administração intraescrotal de MIP-1 $\alpha$ /CCL3, ao término do ensaio, o tecido foi corado com hematoxilina & eosina. Nos animais que receberam apenas veículo, visualiza-se um número irrisório de leucócitos aderidos ao endotélio, ou mesmo ao músculo (Figura 11A). Observa-se que nos animais que receberam MIP-1 $\alpha$ /CCL3 a maioria das células aderidas às células endoteliais, bem como recrutadas para o tecido adjacente ao vaso, eram neutrófilos (Figura 11B). Além disso, é possível visualizar através dos cortes histológicos um menor número de células aderidas ao endotélio, bem como no tecido adjacente ao vaso nos animais que receberam Evasina-1 conjuntamente ao MIP-1 $\alpha$ /CCL3 (Figura 11C).

O número de leucócitos circulantes não era diferente nos animais que receberam veículo ou MIP-1 $\alpha$ /CCL3 ou Evasina-1 + MIP-1 $\alpha$ /CCL3 (dado não mostrado).

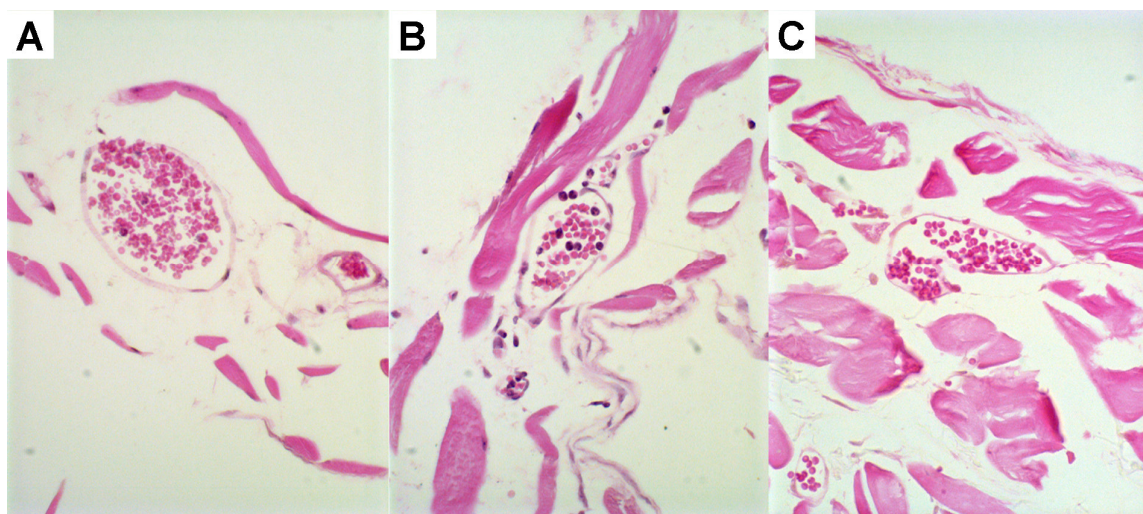
Juntos, estes resultados descritos mostram uma boa evidência que nos possibilita sugerir que a Evasina-1 é eficaz em bloquear a migração de leucócitos induzida por MIP-1 $\alpha$ /CCL3 em vários modelos *in vivo*. Desta maneira, os próximos ensaios foram realizados com o objetivo de avaliar o efeito da Evasina-1 em modelos de inflamação aguda e crônica descritos como dependentes de MIP-1 $\alpha$ /CCL3.





**Figura 10**

Efeito da Evasina-1 sobre o rolamento (A), adesão (B) e emigração (C) de leucócitos no músculo cremaster induzido por MIP-1α/CCL3 humano. Os animais receberam uma injeção intraescrotal de MIP1α/CCL3 humano (300 ng por animal) ou veículo (100 μL por animal) e 2 h após os parâmetros foram observados. Para testar a inibição, os animais receberam uma solução de Evasina-1 (10 μg por animal) e MIP-1α/CCL3 humano (300 ng por animal) em 100 μL de PBS preparada 15 minutos antes da administração intraescrotal. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média de 5-6 animais em cada grupo. \* P < 0,05.



**Figura 11**

Análise histopatológica do músculo cremaster de animais submetidos à microscopia intravital a partir de cortes corados com hematoxilina & eosina. Uma análise qualitativa foi realizada quanto à presença de células aderidas ao endotélio e na região adjacente ao vaso. Os animais receberam uma injeção intraescrotal de veículo (A) ou MIP1 $\alpha$ /CCL3 humano (B) ou uma solução de Evasina-1 + MIP-1 $\alpha$ /CCL3 humano (C). As fotos foram tiradas em aumento de 60X

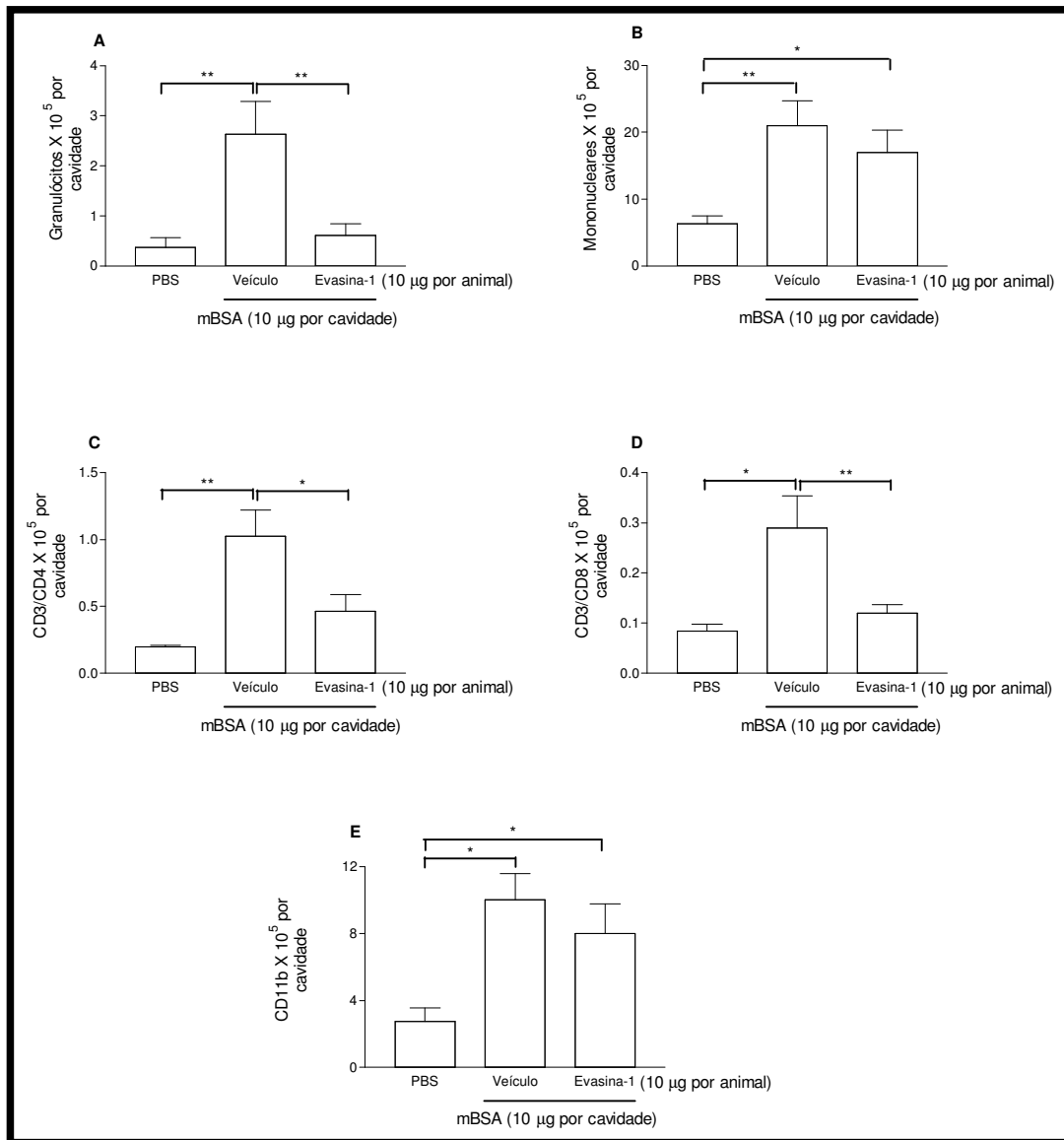
### **3) Efeito da Evasina-1 sobre a reação de hipersensibilidade do tipo tardia convencional (DTH com predominância de resposta Th1)**

Como a dose de 10 µg de Evasina-1 foi adequada para a inibição do influxo de leucócitos nos experimentos descritos acima, esta foi escolhida para a realização dos ensaios subseqüentes. A meia-vida da Evasina-1 é de 12 horas (dado não mostrado). Desta forma, a droga foi administrada a cada 12 horas por via subcutânea nos modelos os quais múltiplas administrações eram necessárias.

Inicialmente nós avaliamos o efeito da Evasina-1 no modelo de hipersensibilidade do tipo tardia convencional (delay type hypersensitivity - DTH), ou seja aquele modelo onde é visto uma predominância de resposta Th1. Nos experimentos de hipersensibilidade do tipo tardia clássica, os animais são imunizados com antígeno (mBSA) em adjuvante completo de Freud e, então desafiados com o antígeno. No ensaio inicial foi utilizado o modelo intrapleural de influxo de leucócitos .

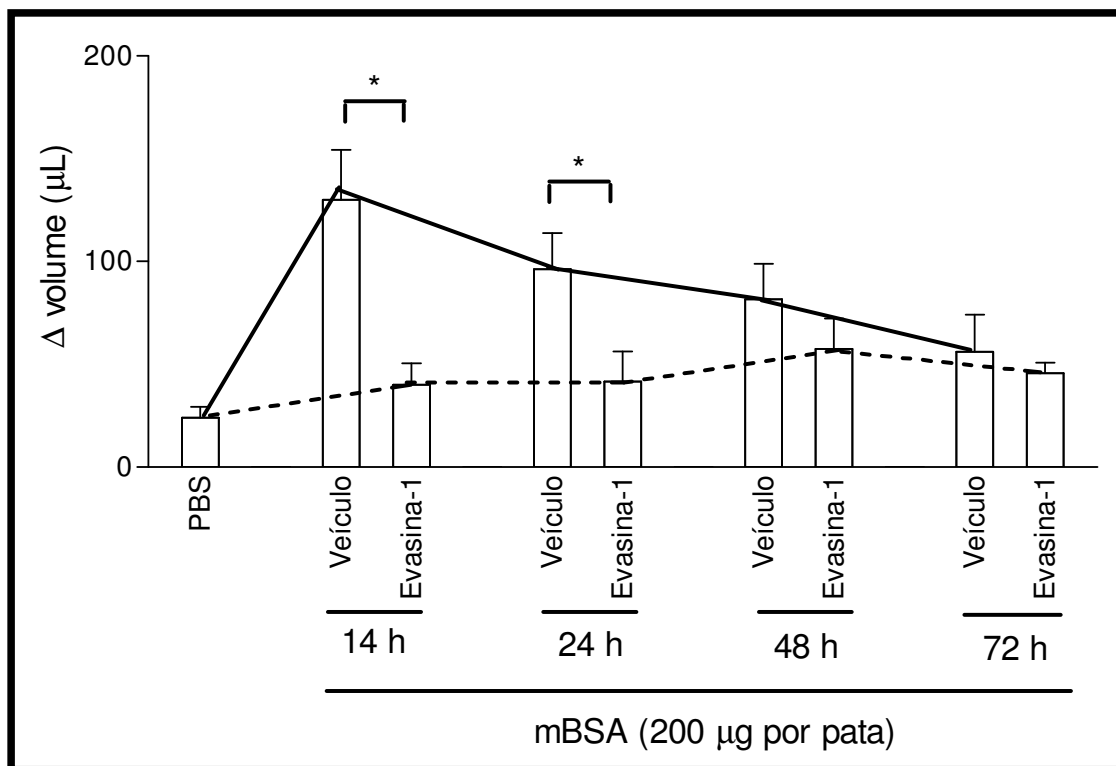
A administração de Evasina-1 45 minutos antes e a cada 12 horas após o desafio preveniu a migração de granulócitos induzido pelo antígeno nos animais sensibilizados (Figura 12A). Em contraste, a Evasina-1 não afetou o recrutamento aumentado de mononucleares induzido por mBSA (Figura 12B). Na verdade, a Evasina-1 foi capaz de promover a diminuição do influxo de linfócitos, tanto do tipo CD4<sup>+</sup> quanto do tipo CD8<sup>+</sup>, induzido pelo antígeno (Figuras 12C e 12D), mas não influenciou de forma significativa o recrutamento de macrófagos (Figura 12E). Como o número de macrófagos era muito superior ao número de linfócitos, nós não visualizamos uma diminuição global do número de mononucleares (Figura 12B).

Quando os animais foram imunizados de forma similar, mas desafiados subcutaneamente na pata com o antígeno, o pré-tratamento com Evasina-1 promoveu uma inibição da resposta de hipersensibilidade do tipo tardia nas primeiras 14 e 24 horas, avaliado pelo volume da pata (Figura 13).



**Figura 12**

Efeito do tratamento com a Evasina-1 sobre o recrutamento de granulócitos (A), mononucleares (B), células CD3/CD4<sup>+</sup> (C), células CD3/CD8<sup>+</sup> (D) e células CD11b<sup>+</sup> (E) para a cavidade pleural induzido pelo antígeno em animais sensibilizados. Animais imunizados foram desafiados com antígeno (mBSA, 10 µg por cavidade pleural) ou com PBS (100 µL por cavidade pleural) e 48 h após o estímulo o número de leucócitos foi avaliado. Para testar a inibição, os animais foram injetados s.c. com Evasina-1 (10 µg por animal) 45 min antes do desafio com mBSA e a cada 12 horas após. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média de 5-6 animais em cada grupo. \* P < 0,05 e \*\* P < 0,01.

**Figura 13**

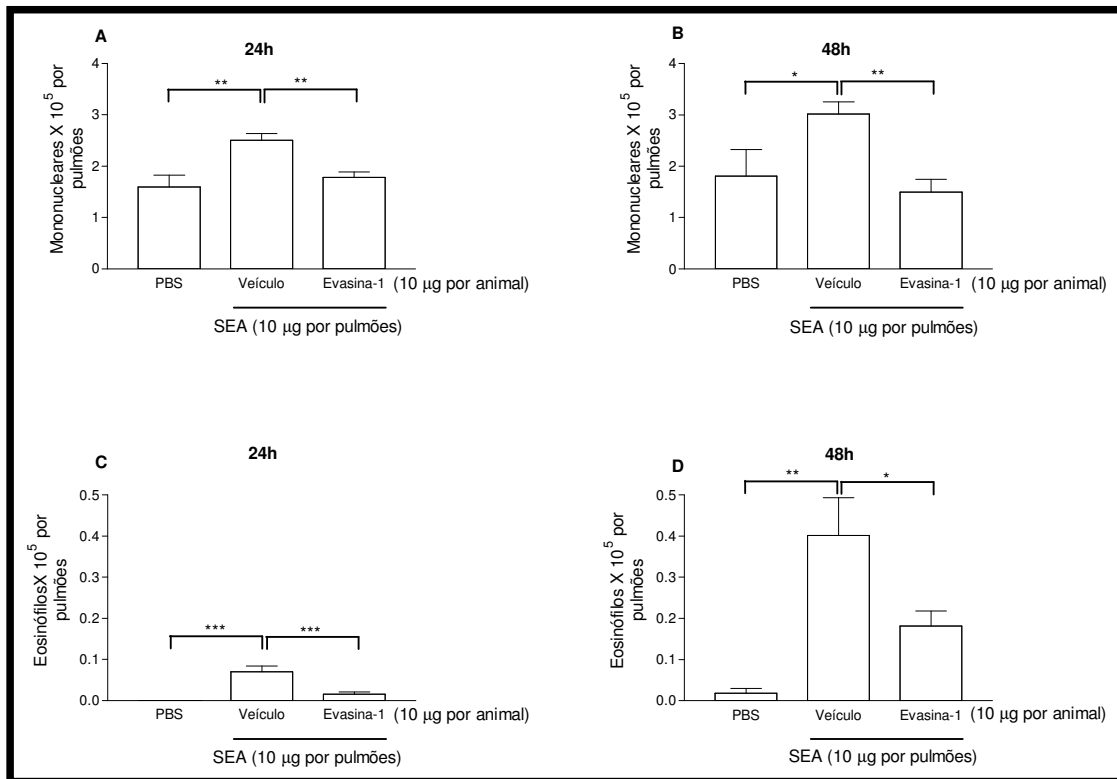
Efeito do tratamento com a Evasina-1 sobre o volume da pata induzido pelo antígeno em animais sensibilizados. Animais imunizados foram desafiados com antígeno (mBSA, 200 μg por pata) ou com PBS (20 μL por pata) e 14, 24, 48 ou 72 h após o estímulo, o volume da pata foi avaliado. Para testar a inibição, os animais foram injetados s.c. com Evasina-1 (10 μg por animal) 45 min antes do desafio com mBSA. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média de 5-6 animais em cada grupo. \* P < 0,05

### **4) Efeito da Evasina-1 sobre a reação de hipersensibilidade do tipo tardia alternativa (DTH com predominância de resposta Th2)**

Na reação de hipersensibilidade do tipo tardia alternativa, ou seja aquela onde é vista uma predominância de resposta Th2, é possível observar 24 a 48 horas após o desafio com antígeno em indivíduos previamente sensibilizados, um infiltrado inflamatório formado principalmente por mononucleares, bem como eosinófilos (Teixeira *et al.*, 2001).

Corroborando os resultados obtidos com os modelos de hipersensibilidade do tipo tardia convencional, o tratamento com a Evasina-1 foi capaz de prevenir o recrutamento tanto de mononucleares (Figuras 14A e 14B), quanto de eosinófilos (Figuras 14C e 14D) para os pulmões 24 e 48 horas após o desafio com o antígeno em animais previamente sensibilizados.

Juntos, estes resultados nos permitem sugerir que a Evasina-1 apresenta significativo efeito antiinflamatório em modelos de hipersensibilidade tardia, seja ele com predomínio de linfócitos Th1 ou de Th2.



**Figura 14**

Efeito do tratamento com a Evasina-1 sobre o recrutamento de mononucleares (A e B) e eosinófilos (C e D) para os pulmões induzido pelo antígeno em animais sensibilizados. Animais imunizados foram desafiados com antígeno (SEA, 10 µg por animal) ou com PBS (25 µL por animal) e 24 ou 48 h após o estímulo o número de leucócitos foi avaliado. Para testar a inibição, os animais foram injetados s.c. com Evasina-1 (10 µg por animal) 45 min antes do desafio com SEA e a cada 12 horas após. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média de 5-6 animais em cada grupo. \* P < 0,05, \*\* P < 0,01 e \*\*\* P < 0,001.

### 5) Efeito da Evasina-1 sobre a lesão pulmonar induzida pela bleomicina

Uma vez visto o potencial terapêutico da Evasina-1 em modelos de inflamação aguda, resolvemos avaliar o efeito da Evasina-1 em um modelo de inflamação crônica. O modelo de lesão pulmonar induzido pela bleomicina é provavelmente o modelo experimental mais utilizado para estudo da fibrose pulmonar. Estudos publicados sugerem que MIP-1 $\alpha$ /CCL3 participa da cascata de eventos que levam ao influxo de leucócitos e lesão pulmonar após a administração de bleomicina em camundongos (Smith *et al.*, 1994). Desta forma, avaliamos o efeito da Evasina-1 na migração celular, produção de quimiocinas e citocinas, alterações histopatológicas e letalidade no modelo.

Para o estudo do efeito da Evasina-1 no processo de fibrose pulmonar induzido pela bleomicina foi escolhida a dose de 10  $\mu$ g por animal de Evasina-1, uma vez que esta foi eficaz nos modelos de inflamação aguda. A dose de bleomicina utilizada foi de 0,0625 U por animal. Esta dose foi baseada em trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório que mostram que a instilação intratraqueal de bleomicina na referida dose promove aumento significativo do infiltrado celular no lavado brancoalveolar e no tecido pulmonar, bem como aumento dos níveis de mediadores inflamatórios e alterações histopatológicas (dados não mostrados). Os animais foram sacrificados nos dias 4, 8 e 25, pois nestes dias era possível observarmos diferentes aspectos do processo inflamatório, incluído aumento do infiltrado neutrofílico, aumento dos níveis de citocinas e quimiocinas e, tardiamente, um processo de fibrose instalado.

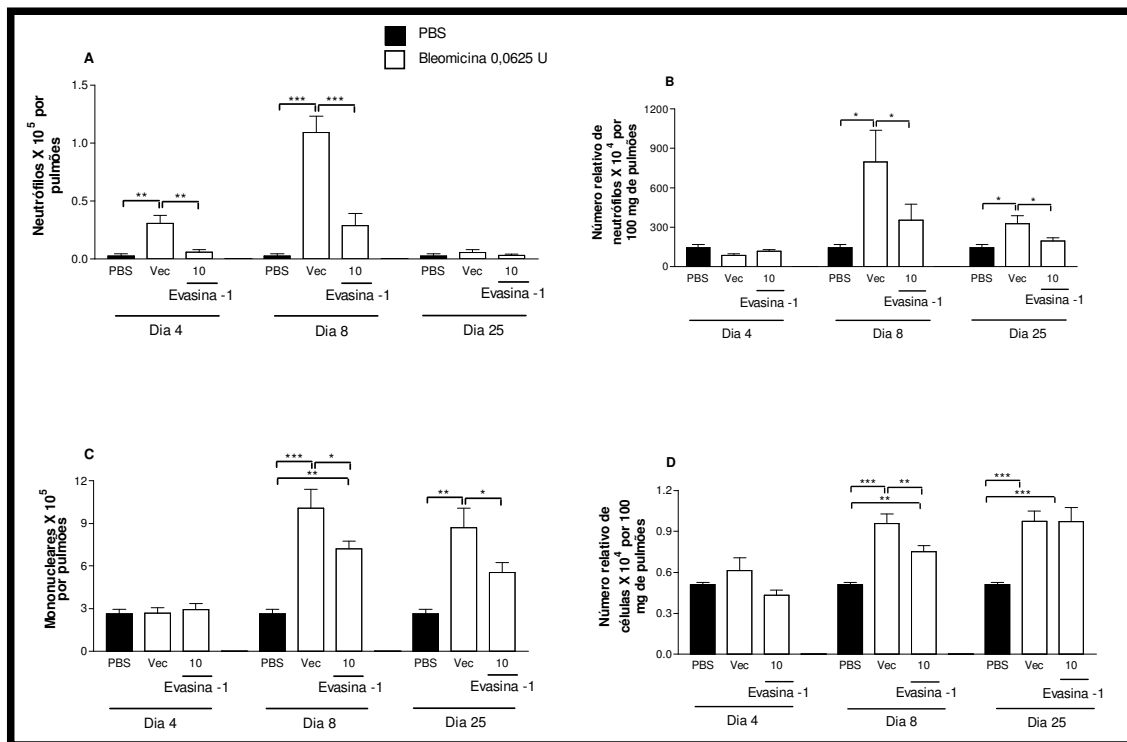


### **5.1) Efeito do pré-tratamento com a Evasina-1 sobre o recrutamento celular induzido pela bleomicina**

Nos animais instilados com bleomicina 0,0625 U por animal observa-se um aumento gradativo do infiltrado neutrofílico no lavado broncoalveolar já no dia 4, que alcança um pico marcante de resposta no dia 8, seguido de uma diminuição no dia 25 (Figura 15A). Através da quantificação da mieloperoxidase no tecido pulmonar é possível visualizar um aumento marcante da migração neutrofílica para o pulmão 8 dias após a instilação de bleomicina que persiste no dia 25 (Figura 15B). A administração de Evasina-1 45 minutos antes e a cada 12 horas após a instilação de bleomicina preveniu de forma significativa o aumento do recrutamento de neutrófilos para o espaço alveolar, bem como no pulmão induzido pela bleomicina em comparação aos animais que receberam apenas o veículo (Figuras 15A e 15B).

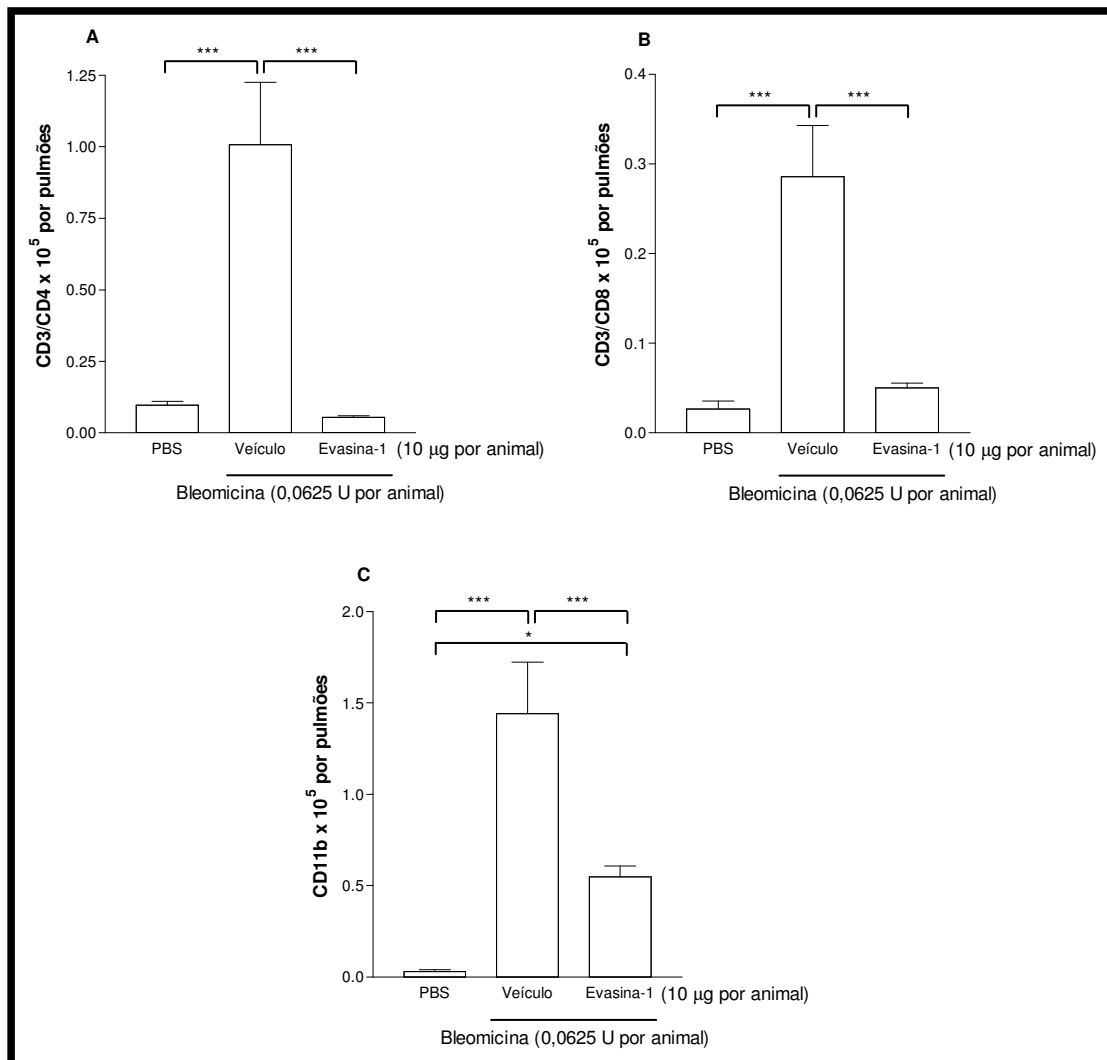
Mononucleares são encontrados aumentados nos dias 8 e 25 no lavado broncoalveolar (Figura 15C). Da mesma forma, os índices de N-acetilglicosaminidase indicam a presença relativa de macrófagos no tecido pulmonar nos dias 8 e 25 (Figura 15D). A administração de Evasina-1 45 minutos antes da instilação de bleomicina e a cada 12 horas após reduziu de forma significativa o aumento do recrutamento de mononucleares para o espaço alveolar nos dias 8 e 25, bem como no pulmão no dia 8 induzido pela bleomicina em comparação aos animais que receberam apenas o veículo (Figuras 15C e 15D).

No intuito de avaliarmos quais eram os tipos de células mononucleares diminuídos pelo tratamento com a Evasina-1 no dia 8, que representa o pico de resposta inflamatória no modelo, nós realizamos um ensaio de citometria de fluxo a partir das células recolhidas no lavado broncoalveolar. O tratamento com a Evasina-1 foi capaz de promover a diminuição do influxo de linfócitos, tanto do tipo CD4<sup>+</sup> quanto do tipo CD8<sup>+</sup> (Figuras 16A e 16B), bem como o recrutamento de macrófagos (Figura 16C).



**Figura 15**

Efeito do pré-tratamento com a Evasina-1 sobre o recrutamento de neutrófilos (A) e mononucleares (C) para o espaço alveolar e quantidade de mieloperoxidase (B) e N-acetilglicosaminidase (D) no pulmão induzido pela bleomicina. Os animais receberam uma injeção intratraqueal de bleomicina (0,0625 U por animal) ou veículo (25  $\mu$ L por animal) e 4, 8 ou 25 dias após o estímulo os parâmetros foram avaliados. Para testar a inibição, os animais foram injetados s.c. com Evasina-1 (10  $\mu$ g por animal) 45 min antes do estímulo com a bleomicina e à cada 12 horas. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média de 5-6 animais em cada grupo. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$ .



**Figura 16**

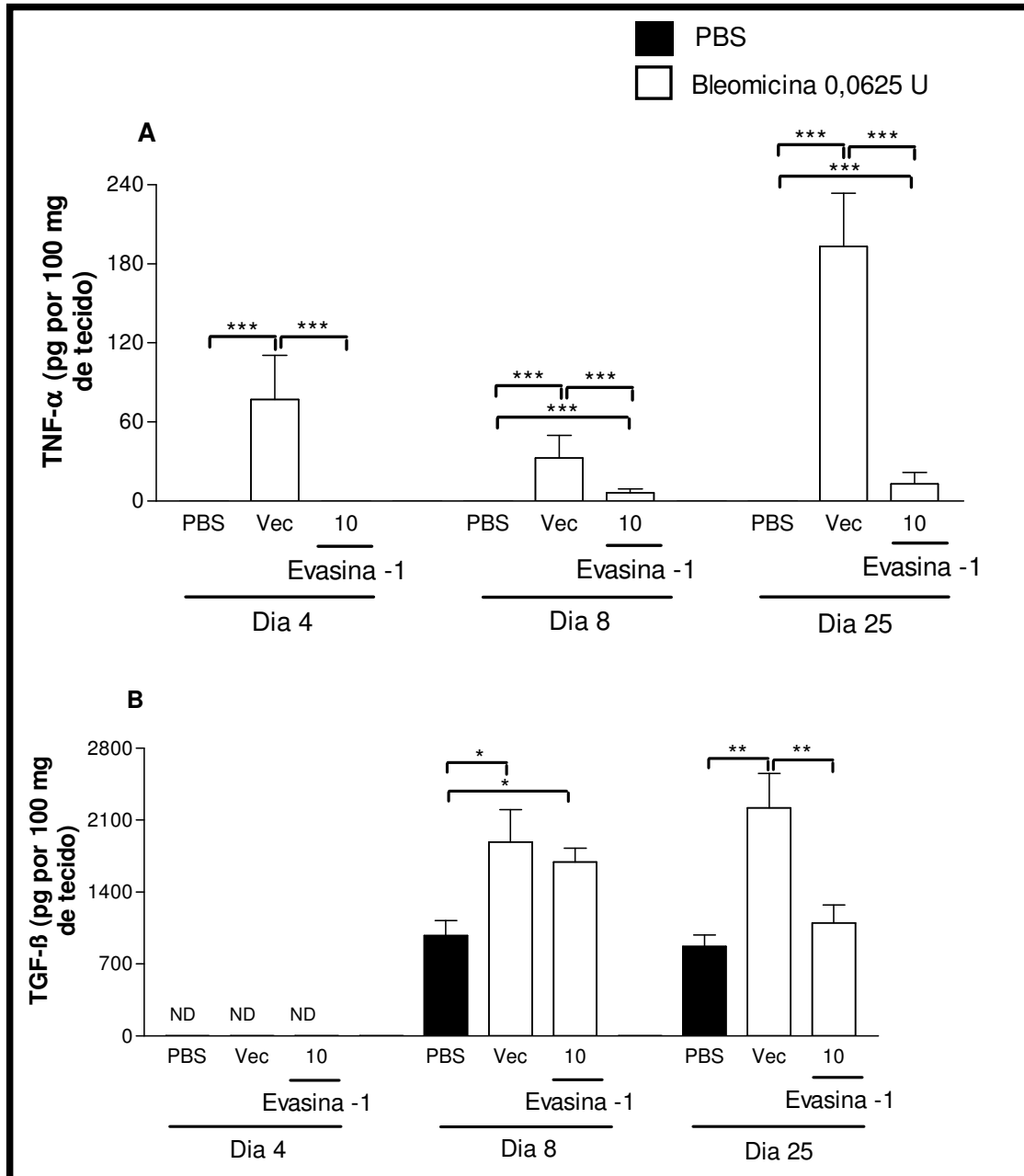
Efeito do pré-tratamento com a Evasina-1 sobre o recrutamento de células CD3/CD4<sup>+</sup> (A), células CD3/CD8<sup>+</sup> (B) e células CD11b<sup>+</sup> (C) para o espaço alveolar induzido pela bleomicina. Os animais receberam uma injeção intratraqueal de bleomicina (0,0625 U por animal) ou veículo (25 µL por animal) e 8 dias após o estímulo o recrutamento de leucócitos foi avaliado. Para testar a inibição, os animais foram injetados s.c. com Evasina-1 (10 µg por animal) 45 min antes do estímulo com a bleomicina e à cada 12 horas. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média de 5-6 animais em cada grupo. \* P < 0,05 e \*\*\* P < 0,001.

### **5.2) Efeito do pré-tratamento com a Evasina-1 sobre a produção de citocinas induzido pela bleomicina**

Após a observação do efeito da Evasina-1 sobre o perfil celular, quantificamos o efeito da droga estudada sobre a produção de TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  que são citocinas descritas como participantes do processo inflamatório promovido pela bleomicina (Giri *et al.*, 1993; Piguet *et al.*, 1997).

Nos animais instilados com bleomicina 0,0625 U por animal observa-se um aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  comparado ao controle no lavado broncoalveolar durante todos os pontos estudados, dias 4, 8 e 25 (Figura 17A). De maneira semelhante, observamos concentrações aumentadas de TGF- $\beta$  nos animais instilados com bleomicina no lavado broncoalveolar nos dias 8 e 25, sendo que não conseguimos detectar níveis quantificáveis de TGF- $\beta$  no dia 4 (Figura 17B).

A administração de Evasina-1 45 minutos antes da instilação de bleomicina e à cada 12 horas após reduziu a produção TNF- $\alpha$  encontrado no lavado broncoalveolar em todos os pontos observados em relação ao grupo de animais tratados com veículo (Figuras 17A). De modo similar, o pré-tratamento com Evasina-1 também preveniu o aumento da concentração de TGF- $\beta$  encontrado no lavado broncoalveolar no dia 25 em relação ao grupo de animais tratados apenas com veículo (Figuras 17B).



**Figura 17**

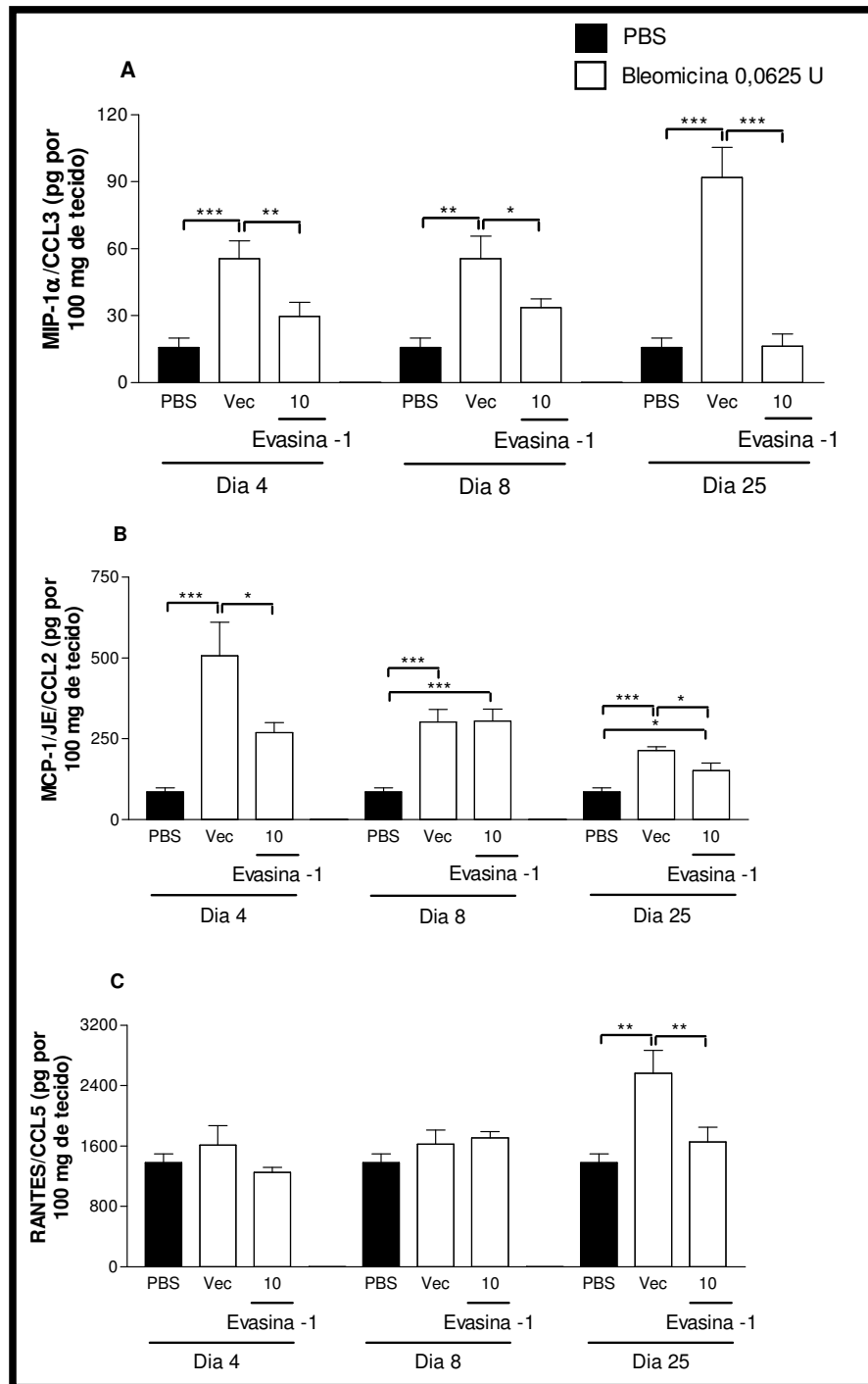
Efeito do pré-tratamento com a Evasina-1 sobre a produção das citocinas TNF- $\alpha$  (A) e TGF- $\beta$  (B) mensuradas no espaço alveolar induzido pela bleomicina. Os animais receberam uma injeção intratraqueal de bleomicina (0,0625 U por animal) ou veículo (25  $\mu$ L por animal) e 4, 8 ou 25 dias após o estímulo os parâmetros foram avaliados. Para testar a inibição, os animais foram injetados s.c. com Evasina-1 (10  $\mu$ g por animal) 45 min antes do estímulo com a bleomicina e à cada 12 horas. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média de 5-6 animais em cada grupo. \* P < 0,05, \*\* P < 0,01 e \*\*\* P < 0,001.

### 5.3) Efeito do pré-tratamento com a Evasina-1 sobre a produção de quimiocinas induzido pela bleomicina

Nós também avaliamos a influência da Evasina-1 sobre a produção de quimiocinas reconhecidamente importantes no modelo de fibrose pulmonar induzido pela bleomicina, incluindo MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MCP-1/JE/CCL2 e RANTES/CCL5 (Smith *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1994; Keane *et al.*, 1999a, b).

Nos animais instilados com bleomicina 0,0625 U por animal, MIP-1 $\alpha$ /CCL3 apresentou níveis elevados já observados no dia 4 persistindo durante os 25 dias de estudo (Figura 18A). De maneira semelhante, a concentração de MCP-1/JE/CCL2 apresentou-se elevada durante todos os dias avaliados (Figura 18B). RANTES/CCL5 apresentou aumento de seus níveis no lavado broncoalveolar apenas no dia 25 (Figura 18C).

A administração de Evasina-1 45 minutos antes da instilação de bleomicina e à cada 12 horas após inibiu a produção MIP-1 $\alpha$ /CCL3 encontrado no lavado broncoalveolar em todos os pontos observados em relação ao grupo de animais tratados com veículo (Figuras 18A). De modo similar, o pré-tratamento com Evasina-1 também preveniu o aumento da concentração de MCP-1/JE/CCL2 encontrado no lavado broncoalveolar no dia 4 e 25 (Figuras 18B) e RANTES/CCL5 no dia 25 (Figura 18C) em relação ao grupo de animais tratados apenas com veículo.



**Figura 18**

Efeito do pré-tratamento com a Evasina-1 sobre a produção das quimiocinas MIP-1 $\alpha$ /CCL3 (A), MCP-1/JE/CCL2 (B) e RANTES/CCL5 (C) mensuradas no espaço alveolar induzido pela bleomicina. Os animais receberam uma injeção intratraqueal de bleomicina (0,0625 U por animal) ou veículo (25  $\mu$ L por animal) e 4, 8 ou 25 dias após o estímulo os parâmetros foram avaliados. Para testar a inibição, os animais foram injetados s.c. com Evasina-1 (10  $\mu$ g por animal) 45 min antes do estímulo com a bleomicina e à cada 12 horas. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média de 5-6 animais em cada grupo. \* P < 0,05, \*\* P < 0,01 e \*\*\* P < 0,001.

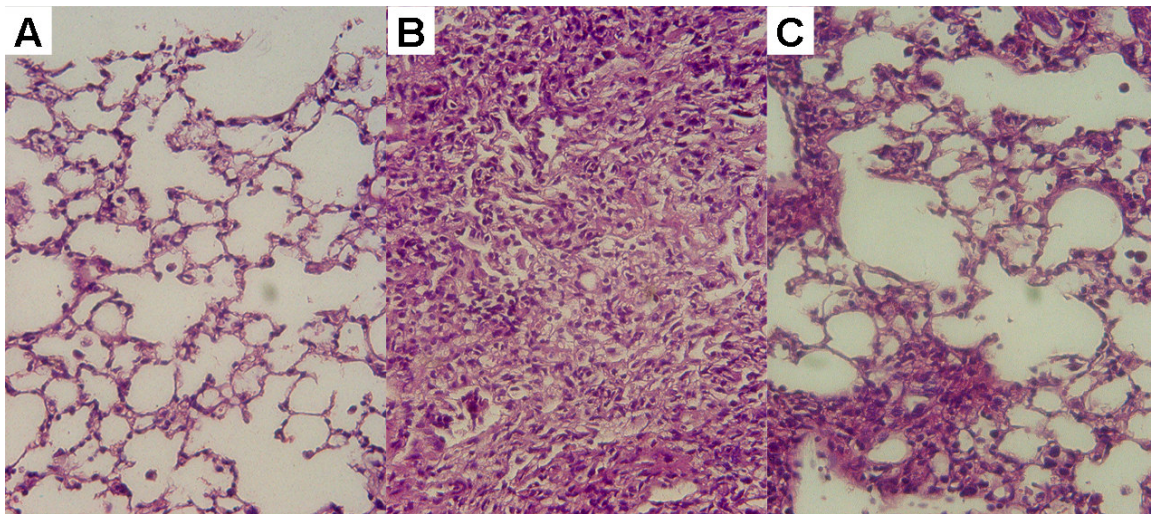
### **5.4) Efeito do pré-tratamento com a Evasina-1 sobre a lesão pulmonar e fibrose induzida pela bleomicina**

A análise histopatológica revelou diferenças nas alterações morfológicas do tecido pulmonar observadas entre os grupos tratados com Evasina-1 ou veículo após administração intratraqueal de bleomicina. Na avaliação do pulmão com vinte e cinco dias após a instilação de bleomicina foi observado um quadro de fibrose intersticial difusa grave com formações císticas em forma de colméia alterando a arquitetura pulmonar (Figura 19B). O infiltrado inflamatório, neste grupo era predominantemente mononuclear. No grupo de animais que receberam Evasina-1 45 minutos antes da instilação de bleomicina e à cada 12 horas, adjacente às áreas de fibrose eram observadas áreas de parênquima pulmonar mais preservadas, caracterizando um quadro de fibrose difusa multifocal com discreto infiltrado inflamatório (Figura 19C).

A deposição de colágeno foi melhor evidenciada pela coloração de Tricrômico de Gomori que cora o tecido conjuntivo em verde. Intensa deposição de colágeno foi observada no dia 25 nos animais tratados apenas com veículo, bem como perda da arquitetura pulmonar normal (Figura 20B). Também foi observada progressiva deposição de colágeno na parede alveolar dos animais tratados com Evasina-1, mas de maneira menos acentuada e de forma multifocal, apresentado ainda áreas preservadas próximas as áreas de comprometimento tecidual pulmonar, causado pelo espessamento alveolar (Figura 20C).

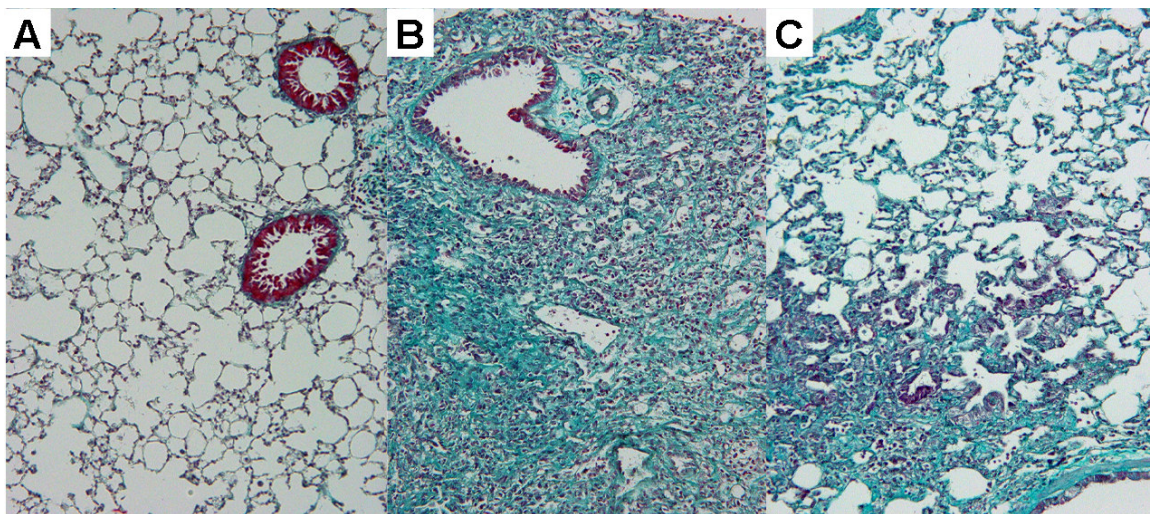
Os resultados descritos anteriormente para a coloração de Tricrômico de Gomori podem ser descritos de modo quantitativo através da análise morfométrica, onde é possível mensurar as áreas de colágeno. Conforme podemos observar na Figura 20, os animais que foram instilados com bleomicina 0,0625 U por animal apresentam no dia 25 uma maior área de colágeno comparados aos animais que receberam PBS. A administração de Evasina-1 45 minutos antes da instilação de bleomicina e à cada 12 horas após reduziu de modo significativo a elevação da quantidade de colágeno no dia 25 em relação ao grupo de animais tratados apenas com veículo (Figura 21).





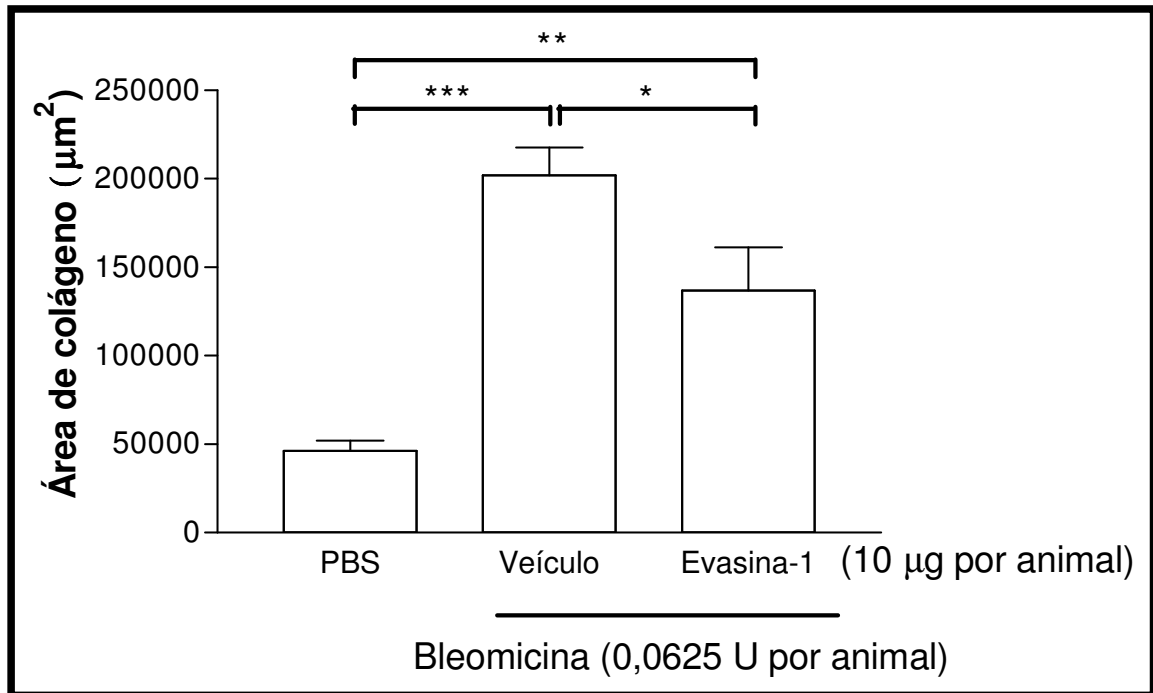
**Figura 19**

Efeito do pré-tratamento com a Evasina-1 sobre a lesão pulmonar avaliada através de cortes histológicos corados com hematoxilina & eosina. Os animais receberam uma injeção intratraqueal de bleomicina (0,0625 U por animal) ou veículo (25  $\mu$ L por animal) e 25 dias após o estímulo os parâmetros foram avaliados. Para testar a inibição, os animais foram injetados s.c. com Evasina-1 (10  $\mu$ g por animal) 45 min antes do estímulo com a bleomicina e à cada 12 horas. Controle (A), Veículo + Bleomicina (B) e Evasina-1 + Bleomicina (C). As fotos foram tiradas em aumento de 40X



**Figura 20**

Efeito do pré-tratamento com a Evasina-1 sobre a deposição de colágeno pulmonar avaliada através de cortes histológicos corados Tricrômico de Gomori. Os animais receberam uma injeção intratraqueal de bleomicina (0,0625 U por animal) ou veículo (25  $\mu$ L por animal) e 25 dias após o estímulo os parâmetros foram avaliados. Para testar a inibição, os animais foram injetados s.c. com Evasina-1 (10  $\mu$ g por animal) 45 min antes do estímulo com a bleomicina e à cada 12 horas. Controle (A), Veículo + Bleomicina (B) e Evasina-1 + Bleomicina (C). As fotos foram tiradas em aumento de 20X



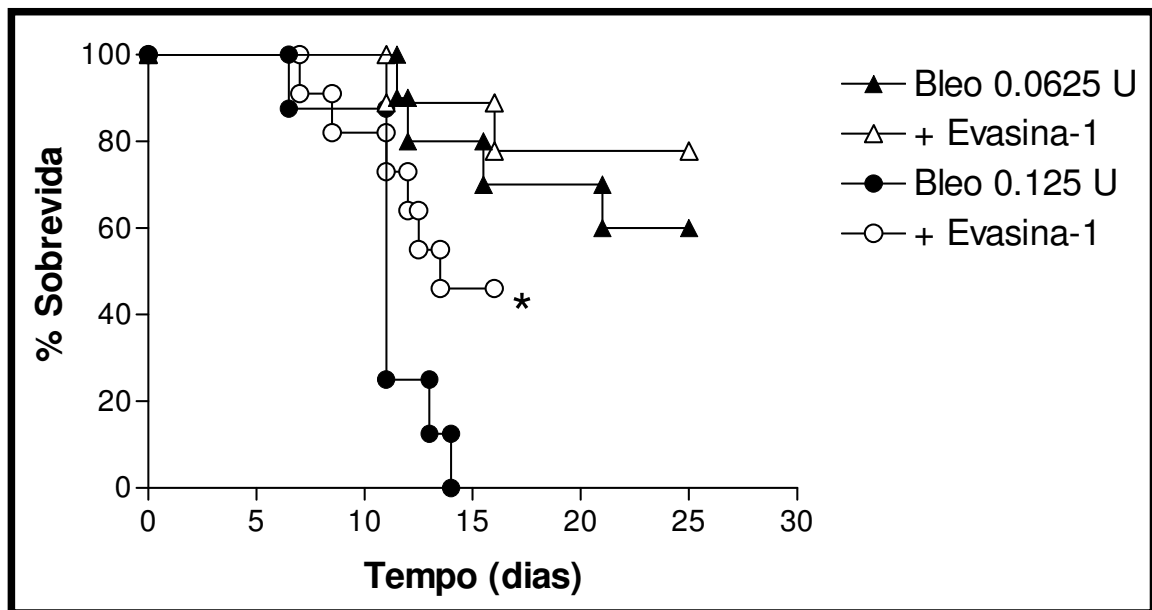
**Figura 21**

Efeito do pré-tratamento com a Evasina-1 sobre a deposição de colágeno pulmonar avaliada através da análise morfométrica de cortes histológicos corados com Tricrômico de Gomori. Os animais receberam uma injeção intratraqueal de bleomicina (0,0625 U por animal) ou veículo (25 µL por animal) e 25 dias após o estímulo, a área de colágeno foi quantificada. Para testar a inibição, os animais foram injetados s.c. com Evasina-1 (10 µg por animal) 45 min antes do estímulo com a bleomicina e à cada 12 horas. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média de 5-6 animais em cada grupo. \* P < 0,05, \*\* P < 0,01 e \*\*\* P < 0,001.

### **5.5) Efeito do pré-tratamento com a Evasina-1 sobre a sobrevivência dos animais instilados com a bleomicina**

Após verificarmos a habilidade da Evasina-1 em diminuir o recrutamento celular para o espaço alveolar e tecido pulmonar, diminuir a lesão pulmonar e deposição de colágeno intersticial, bem como a produção de citocinas e quimiocinas, estudamos o efeito do tratamento com a Evasina-1 sobre a letalidade dos animais estimulados com bleomicina.

Nos animais instilados com bleomicina 0,0625 U por animal e tratados com a Evasina-1 45 minutos antes da instilação de bleomicina e à cada 12 horas observamos no dia 25 uma taxa de sobrevivência 17,76% maior em relação ao grupo de animais tratados apenas com veículo (Figura 22). Para certificarmos que este fato não ocorreu porque a dose de bleomicina era baixa, realizamos um experimento onde os animais receberam uma dose de bleomicina de 0,125 U por animal. Corroborando os resultados anteriores, os animais que foram tratados com Evasina-1 apresentaram no dia 14 uma taxa de sobrevivência 46% maior comparado ao grupo tratado apenas com veículo (Figura 22). No entanto, é importante ressaltar que todos os animais instilados com bleomicina na dose de 0,125 U por animal (tratados ou não com Evasina-1) morreram mais precocemente em relação aos animais que receberam bleomicina na dose de 0,0625 U por animal.



**Figura 22**

Efeito do pré-tratamento com a Evasina-1 sobre a letalidade dos animais submetidos à fibrose pulmonar induzida pela bleomicina. Os animais receberam uma injeção intratraqueal de bleomicina (0,0625-0,125 U por animal) ou veículo (25 µL por animal). Para testar a inibição, os animais foram injetados s.c. com Evasina-1 (10 µg por animal) 45 min antes do estímulo com a bleomicina e à cada 12 horas. \* P < 0,05 com relação veículo + Bleo 0,125U

### **6) Efeito do tratamento tardio com a Evasina-1 sobre a lesão pulmonar induzida pela bleomicina**

Conforme mostrado anteriormente, nossos resultados sugerem que a administração da Evasina-1 45 minutos antes da instilação com a bleomicina e à cada 12 horas é capaz de melhorar todos os aspectos inflamatórios, de remodelamento e sobrevida dos animais submetidos ao modelo de fibrose pulmonar. Assim, nós posteriormente avaliamos qual seria o efeito do tratamento com a Evasina-1 caso esta fosse implementada tardiamente, após a instalação da resposta.

Os animais foram instilados com bleomicina 0,0625 U por animal e começaram a receber Evasina-1 à cada 12 horas a partir do dia 8 após a instilação, sendo sacrificados no dia 25. Os resultados foram compilados na Tabela 2. O tratamento com a Evasina-1 reduziu de forma significativa o influxo de mononucleares para o espaço alveolar em relação aos animais que receberam apenas o veículo. Em contrapartida, a Evasina-1 não interferiu na quantidade de mieloperoxidase e de N-acetilglicosaminidase no tecido pulmonar. Em acordo com os resultados obtidos com o pré-tratamento com a Evasina-1, esta quando dada a partir do dia 8, também foi capaz de diminuir a produção TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e MIP-1 $\alpha$ /CCL3 encontrados no lavado broncoalveolar em relação ao grupo de animais tratados apenas com veículo. De maneira contrária, Evasina-1 não diminuiu as concentrações aumentadas de MCP-1/JE/CCL2 e RANTES/CCL5 nos animais estimulados com a bleomicina. Apesar do pós-tratamento com a Evasina-1 promover a diminuição de alguns parâmetros inflamatórios, essa foi incapaz de melhorar a lesão tecidual em comparação ao grupo tratado com veículo, visualizada pela quantificação das áreas de colágeno coradas pelo Tricrômico de Gomori.

**Tabela 2:** Efeito do pós-tratamento com a Evasina-1 (10 µg por animal) sobre o recrutamento celular, produção de citocinas e quimiocinas e deposição de colágeno induzidos pela instilação intratraqueal de bleomicina 0,0625 U por animal.

Parâmetro avaliado	PBS	Veículo + Bleomicina 0,0625U	Evasina-1 + Bleomicina 0,0625U
Neutrófilos X 10 <sup>5</sup> por pulmões	Não detectado	Não detectado	Não detectado
MPO X 10 <sup>4</sup> por 100 mg de pulmões	368,3 ± 22,7	508,8 ± 32,7 *	508,1 ± 51,6 *
Mononucleares X 10 <sup>5</sup> por pulmões	0,8 ± 0,1	7,1 ± 0,5 *	5,5 ± 0,6 * #
NAG X 10 <sup>4</sup> por 100 mg de pulmões	0,5 ± 0,0	1,3 ± 0,1 *	1,3 ± 0,1 *
TNF-α (pg por 100 mg de tecido)	0,0 ± 0,0	16,0 ± 4,4 *	5,0 ± 1,9 * #
TGF-β (pg por 100 mg de tecido)	869,1 ± 113,0	4084,0 ± 548,0 *	2232,0 ± 143,3 * #
MIP-1α/CCL3 (pg por 100 mg de tecido)	15,9 ± 4,2	140,8 ± 9,1 *	79,0 ± 3,3 * #
MCP-1/JE/CCL2 (pg por 100 mg de tecido)	195,4 ± 12,6	280,9 ± 25,8	260,9 ± 31,4
RANTES/CCL5 (pg por 100 mg de tecido)	1380,0 ± 114,2	4146,0 ± 273,9 *	4065,0 ± 174,7 *
Área de colágeno (mm <sup>2</sup> )	46450,0 ± 5568,0	141100,0 ± 29040,0 *	107500,0 ± 17250,0 *

\* estatisticamente diferente do grupo PBS

# estatisticamente diferente do grupo Veículo + Bleomicina 0,0625U

### 7) Efeito da Evasina-3 sobre o recrutamento de neutrófilos

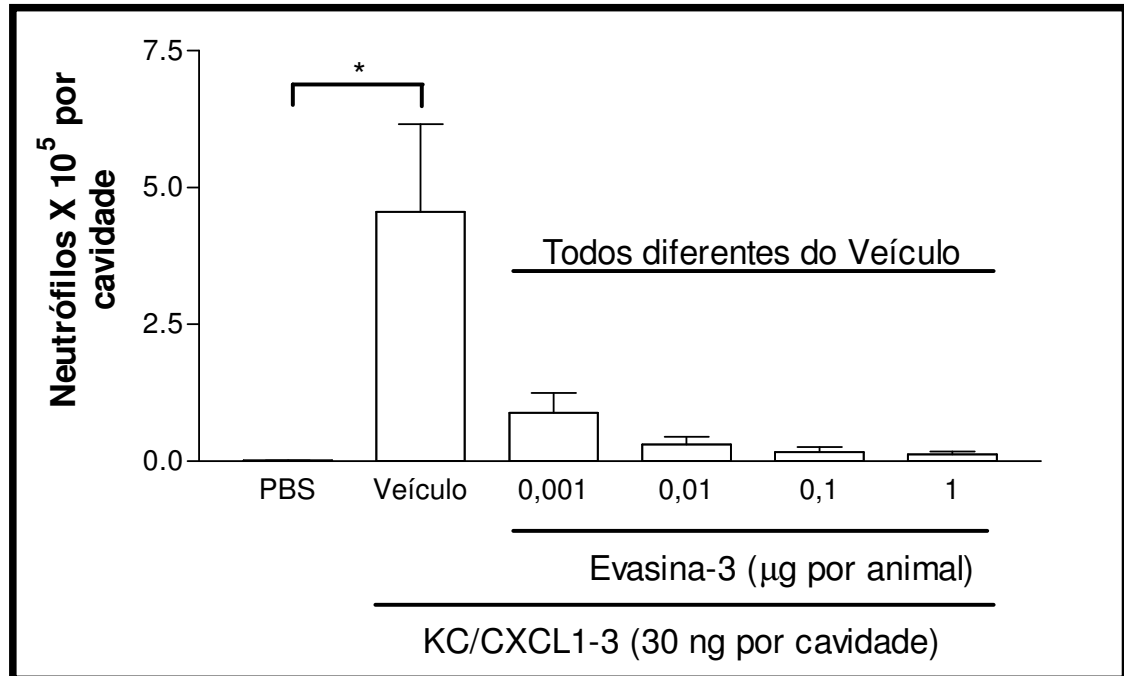
Os experimentos iniciais foram realizados com o objetivo de avaliar *in vivo* a habilidade da Evasina-3 de interferir no recrutamento de neutrófilos induzido por KC/CXCL1-3 e LPS.

Conforme resultados obtidos anteriormente em nosso laboratório (dados não mostrados) a administração intraarticular da quimiocina KC/CXCL1-3 induziu um influxo de neutrófilos para a cavidade sinovial 4 horas após o estímulo. O pré-tratamento com a Evasina-3 45 minutos antes da injeção de KC/CXCL1-3 preveniu este influxo de neutrófilos (Figura 23).

Uma vez observado que a Evasina-3 na dose de 1 µg por animal foi capaz de inibir *in vivo* uma resposta induzida por KC/CXCL1-3, nós avaliamos o efeito da Evasina-3 em um modelo dependente da liberação agonistas do receptor CXCR2. Para isto, os animais receberam uma injeção intrapleural de LPS que induziu o influxo de neutrófilos para a cavidade pleural 8 horas após o estímulo. Corroborando o resultado descrito anteriormente, o pré-tratamento com a Evasina-3 45 minutos antes da injeção de LPS preveniu o influxo de neutrófilos (Figura 24).

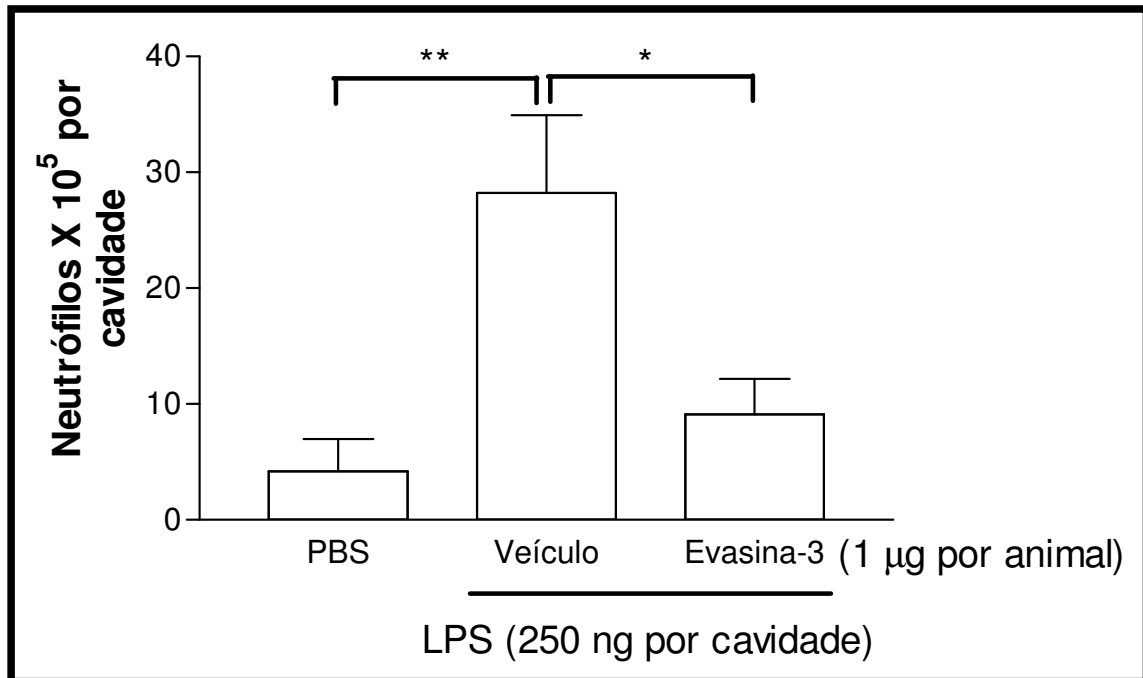
Juntos, estes resultados descritos mostram uma boa evidência que nos possibilita sugerir que a Evasina-3 é eficaz em bloquear a migração de leucócitos induzida por KC/CXCL1-3 *in vivo*. Assim, o próximo ensaio foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito da Evasina-3 no modelo de recrutamento celular induzido por antígeno onde é reconhecidamente sabido que há um influxo de neutrófilos no processo inflamatório (Klein *et al.*, 2000).





**Figura 23**

Efeito do pré-tratamento com a Evasina-3 sobre o recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular induzido por KC/CXCL1-3. Os animais receberam uma injeção intraarticular de KC/CXCL1-3 (30 ng por cavidade articular) ou veículo (10 µL por cavidade articular) e 4 h após o estímulo o número de leucócitos foi avaliado. Para testar a inibição, os animais foram injetados s.c. com Evasina-3 (0,001-1,0 µg por animal) 45 min antes do estímulo com KC/CXCL1-3. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média de 5-6 animais em cada grupo. \* P < 0,05.

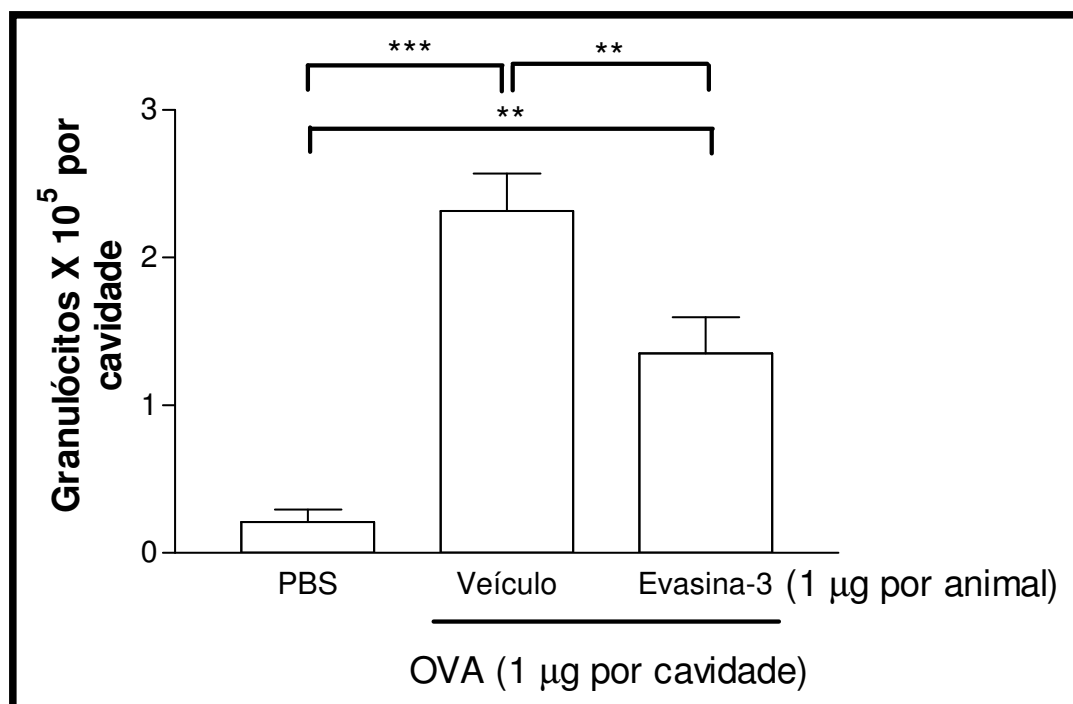


**Figura 24**

Efeito do pré-tratamento com a Evasina-3 sobre o recrutamento de neutrófilos para a cavidade pleural induzido por LPS. Os animais receberam uma injeção intrapleural de LPS (250 ng por cavidade) ou veículo (100 µL por cavidade) e 8 h após o estímulo o número de leucócitos foi avaliado. Para testar a inibição, os animais foram injetados s.c. com Evasina-3 (1 µg por animal) 45 min antes do estímulo com LPS. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média de 5-6 animais em cada grupo. \* P < 0,05 e \*\* P < 0,01.

### 8) Efeito da Evasina-3 sobre o recrutamento de leucócitos induzido por antígeno

De acordo com nossos trabalhos prévios, a injeção intrapleural de antígeno (OVA) em animais sensibilizados induziu a migração de granulócitos para a cavidade pleural após 8 h (Figura 25). O pré-tratamento com Evasina-3 45 minutos antes do desafio reduziu o influxo de granulócitos 8 h após o desafio com OVA em animais imunizados (Figura 25).



**Figura 25**

Efeito do pré-tratamento com a Evasina-3 sobre o recrutamento de granulócitos para a cavidade pleural induzido pelo antígeno em animais sensibilizados. Animais imunizados foram desafiados com antígeno (OVA, 1  $\mu\text{g}$  por cavidade pleural) ou com PBS (100  $\mu\text{L}$  por cavidade pleural) e 8 h após o estímulo o número de leucócitos foi avaliado. Para testar a inibição, os animais foram injetados s.c. com Evasina-3 (1  $\mu\text{g}$  por animal) 45 min antes do desafio. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média de 5-6 animais em cada grupo. \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$ .

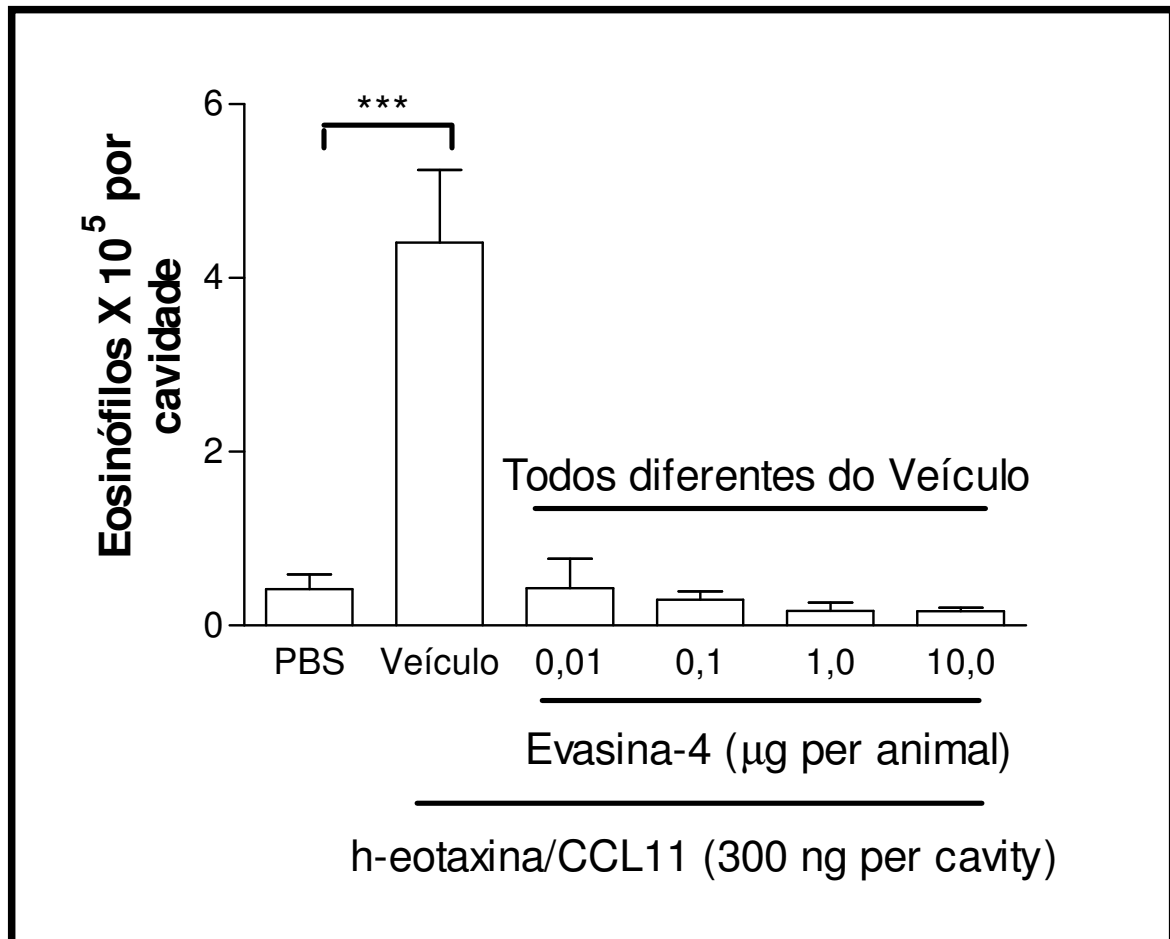
### 9) Efeito da Evasina-4 sobre o recrutamento de eosinófilos

O experimento inicial foi realizado com o objetivo de avaliar *in vivo* a habilidade da Evasina-4 de interferir no recrutamento de eosinófilos induzido por eotaxina/CCL11.

Como ainda não estão disponíveis os resultados dos ensaios farmacocinéticos da Evasina-4, nós empiricamente escolhemos administrar a droga 45 minutos antes e 6 horas após o estímulo escolhido.

Conforme já demonstrado anteriormente (Klein *et al.*, 2001), a administração intrapleural da quimiocina eotaxina/CCL11 induz um influxo de eosinófilos para a cavidade pleural 24 horas após o estímulo. O pré-tratamento com a Evasina-4 45 minutos antes e 6 horas após a injeção de eotaxina/CCL11 humana preveniu este influxo de eosinófilos (Figura 26).

Este resultado mostra uma boa evidência que nos possibilita sugerir que a Evasina-4 é eficaz em bloquear a migração de leucócitos induzida por eotaxina/CCL11 *in vivo*. Desta forma, o próximo ensaio foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito da Evasina-4 no modelo de recrutamento celular induzido por antígeno onde é reconhecidamente sabido que há um influxo de eosinófilos no processo inflamatório (Klein *et al.*, 2000).



**Figura 26**

Efeito do pré-tratamento com a Evasina-4 sobre o recrutamento de eosinófilos para a cavidade pleural induzido por eotaxina/CCL11 humana. Os animais receberam uma injeção intrapleural de h-eotaxina/CCL11 (300 ng por cavidade) ou veículo (100 µL por cavidade) e 24 h após o estímulo o número de leucócitos foi avaliado. Para testar a inibição, os animais foram injetados s.c. com Evasina-4 (0,001-10,0 µg por animal) 45 min antes do estímulo com eotaxina/CCL11. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média de 5-6 animais em cada grupo. \*\*\* P < 0,001.

### 10) Efeito da Evasina-4 sobre o recrutamento de eosinófilos induzido por antígeno

De acordo com nossos trabalhos prévios, a injeção intrapleural de antígeno (OVA) em animais sensibilizados induziu a migração de eosinófilos para a cavidade pleural após 48 h (Figura 27). O pré-tratamento com Evasina-4 45 minutos antes e 6 horas após o desafio reduziu o influxo de eosinófilos 48 h após o desafio com OVA em animais imunizados (Figura 27).

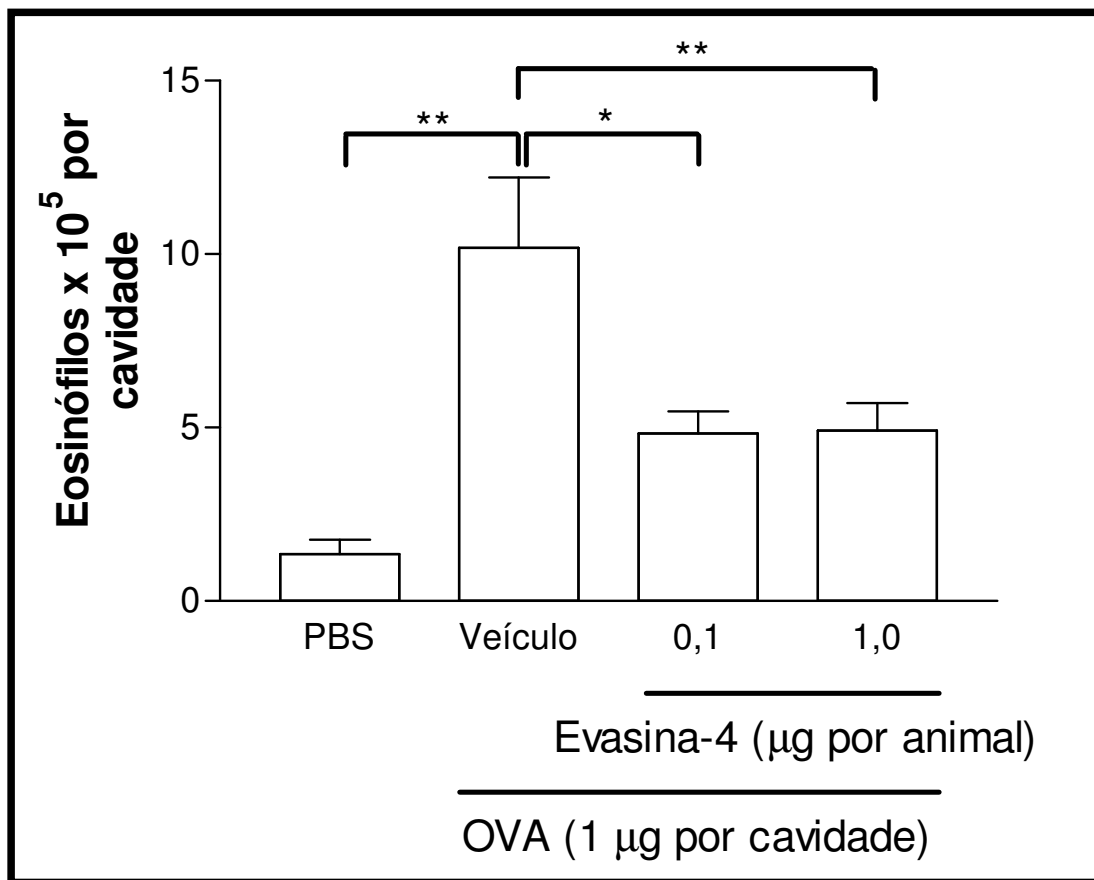


Figura 27

Efeito do tratamento com a Evasina-4 sobre o recrutamento de eosinófilos para a cavidade pleural induzido pelo antígeno em animais sensibilizados. Animais imunizados foram desafiados com antígeno (OVA, 1 µg por cavidade pleural) ou com PBS (100 µL por cavidade pleural) e 48 h após o estímulo o número de leucócitos foi avaliado. Para testar a inibição, os animais foram injetados s.c. com Evasina-4 (0,1-1,0 µg por animal) 45 min e 6 horas após o desafio. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média de 5-6 animais em cada grupo. \* P < 0,05 e \*\* P < 0,01.

## V. Discussão

As quimiocinas formam uma superfamília de pequenas citocinas (8-14 KDa) que estão envolvidas no recrutamento de vários tipos celulares. Além disso, as quimiocinas participam de uma ampla série de eventos fisiológicos e patológicos, incluindo diferenciação e ativação celular, angiogênese, condições auto-imunes, processos inflamatórios, metástases e rejeição à transplantes (Gerard & Rollins, 2001; Luther & Cyster, 2001; Mackay, 2001; Lukacs *et al.*, 2001; Azenshtein *et al.*, 2002; Robinson *et al.*, 2003; Allen *et al.*, 2007).

Considerando-se a relevante participação das quimiocinas no processo fisiopatológico de diversas doenças, muito esforço tem sido feito para o desenvolvimento de estratégias farmacológicas que interfiram no sistema de quimiocinas. A utilização de anticorpos neutralizantes de quimiocinas e seus receptores é a forma mais antiga de intervir no sistema de quimiocinas e foi muito importante para a validação do papel destas proteínas na patogênese de várias doenças (Gonzalo *et al.*, 1998). A abordagem atualmente mais utilizada é a administração de pequenas moléculas antagonistas dos receptores de quimiocinas (Liang *et al.*, 2000; Horuk *et al.*, 2001b). A criação de quimiocinas modificadas exerce efeito semelhante, uma vez que estas mantêm alta afinidade pelo receptor, mas não promovem sinalização intracelular, tornando-se, assim, agentes com ação antagonista (Proudfoot *et al.*, 1996). Algumas quimiocinas modificadas apresentam mutação na região de ligação da quimiocina aos glicosaminoglicanos, logo, estes agentes impedem com que a quimiocina natural forme gradientes biologicamente ativos (Proudfoot *et al.*, 2001).

Nos últimos anos tem sido evidenciado que muitos tipos de vírus (pox e herpes vírus) e parasitas (*Schistosoma mansoni*) apresentam estratégias de evasão do sistema imunológico do hospedeiro baseadas na interferência no sistema de quimiocinas. Carrapatos também apresentam mecanismos evasivos similares. Eles possuem em sua saliva uma grande variedade de agentes vasodilatadores, anticoagulantes, anestésicos e antiinflamatórios, o que permite com que eles se alimentem por longo período de tempo sem serem percebidos pelo sistema imunológico do hospedeiro. Além disso, uma das estratégias de burlar o sistema imune é a produção de proteínas ligantes que seletivamente neutralizam as quimiocinas que normalmente recrutam células que protegem o hospedeiro, como neutrófilos e eosinófilos. Nos trabalhos de Hajnická e colaboradores (1998 e 2001) é mostrado que na saliva de carrapatos do gênero *Ixodidae* encontram-se proteínas inibidoras direcionadas às quimiocinas MCP-1/CCL2, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, RANTES/CCL5, eotaxina/CCL11 e IL-8/CXCL8.



No presente trabalho nós realizamos ensaios pré-clínicos em modelos animais de uma nova família de proteínas ligantes de quimiocinas, chamada evasinas, secretadas na saliva do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*.

As evasinas são moléculas pequenas, menores que os recentemente descobertos anticorpos naturais de camelos que possuem apenas a cadeia pesada (Muyldermans, 2001). Além disso, elas não apresentam homologia estrutural às proteínas já descritas, inclusive proteínas ligantes de quimiocinas de origem viral ou do *Schistosoma mansoni*. Outra característica interessante das evasinas que as distingue das outras proteínas ligantes de quimiocinas é a grande seletividade de seus membros quanto aos ligantes. As proteínas ligantes de quimiocinas de origem viral apresentam afinidade por muitas quimiocinas diferentes. Por exemplo, a proteína M-T7, liberada pelo mixomavírus, se liga com baixa especificidade a todas as subfamílias de quimiocinas (Lalani *et al.*, 1997); a proteína M-T1, codificada por vários vírus da família pox, se liga com alta afinidade às quimiocinas CC (Graham *et al.*, 1997); e a proteína M3 liberada pelo gammaherpesvírus murino, se liga com grande afinidade à todas as subfamílias de quimiocinas (Bridgeman *et al.*, 2001). A proteína ligante de quimiocinas do *Schistosoma mansoni* também apresenta afinidade por quimiocinas de famílias diferentes, uma vez que se liga à IL-8/CXCL8, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, fractalkina/CX<sub>3</sub>CL1, bem com a MCP-1/CCL2 e RANTES/CCL5 (Smith *et al.*, 2005). As evasinas apresentam afinidade por um grupo limitado de quimiocinas conforme será abordado posteriormente.

A primeira molécula estudada foi a Evasina-1 que se liga seletivamente à MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL3 e PARC/CCL18 com alta afinidade e, cujos valores de KD são 0,16, 0,81 e 3,21 nM, respectivamente (Frauenschuhr *et al.*, 2007). Ensaios *in vitro* mostram que a Evasina-1 inibe a quimiotaxia de neutrófilos induzida por MIP-1 $\alpha$ /CCL3 com IC<sub>50</sub> da ordem de picomolares. Desta forma, para validar o potencial efeito inibitório da Evasina-1 *in vivo* nós utilizamos o modelo de migração celular para o peritônio. Embora a habilidade de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 em recrutar células para essa cavidade seja bem documentada (Johnson *et al.*, 2004b), nós realizamos experimentos de dose-resposta e tempo-resposta com a quimiocina para avaliar estas respostas nas condições do nosso laboratório. MIP-1 $\alpha$ /CCL3 promoveu infiltrado celular máximo na dose de 10.000 ng por animal 18 horas após o estímulo. Uma inibição celular significativa foi observada quando os animais receberam a Evasina-1 antes da injeção de MIP-1 $\alpha$ /CCL3.

Os estágios iniciais do recrutamento celular envolvem o “tethering”, rolamento e adesão dos leucócitos à parede do vaso antes do extravasamento através da membrana basal e saída para o tecido adjacente. Na tentativa de visualizar o ponto sobre o qual a Evasina-1 interfere na ação quimioatraente de MIP-1 $\alpha$ /CCL3, nós realizamos um ensaio de microscopia intravital no músculo cremaster de camundongos. Os processos de rolamento, adesão e subsequente recrutamento para o tecido induzido pela quimiocina foram inibidos quando esta era administrada concomitantemente à Evasina-1, sendo esta solução preparada 15 minutos antes da injeção. Existem relatos de que MIP-1 $\alpha$ /CCL3 promove o recrutamento de neutrófilos (maioria celular observada) por uma via indireta de aumento de expressão de P-selectinas. Na verdade, é sugerido que MIP-1 $\alpha$ /CCL3 ative os mastócitos e estas células ao liberar fatores como leucotrienos e TNF- $\alpha$  promova aumento da expressão de selectinas nas células endoteliais culminando no influxo de neutrófilos (Wan *et al.*, 2003).

Juntos, esses resultados evidenciaram que a Evasina-1 apresenta habilidade de inibir MIP-1 $\alpha$ /CCL3 *in vivo*. Assim, nós começamos a avaliar o efeito desta proteína em modelos animais descritos como dependentes de MIP-1 $\alpha$ /CCL3, incluindo reações de hipersensibilidade do tipo tardia e fibrose pulmonar induzida pela bleomicina.

Reações de hipersensibilidade do tipo tardia (“delay type hypersensitivity”, DTH) representam respostas imunes mediadas por células que desempenham importantes efeitos imunoprotetores (resistência contra vírus, bactérias e fungos) ou imunopatológicos (hipersensibilidade alérgica e doença autoimune). A resposta de hipersensibilidade do tipo tardia pode ser mediada predominantemente por linfócitos T helper 1 (DTH clássica) ou por linfócitos T helper 2 (DTH alternativa) que envolve ativação destas células por um antígeno específico com subsequente produção de citocinas (Teixeira *et al.*, 2001). Observa-se 24 às 48 horas após o desafio com antígeno em animais previamente sensibilizados um intumescimento local, além de um infiltrado inflamatório formado principalmente por linfócitos T e macrófagos, bem como eosinófilos em reações de DTH alternativa (Gaga *et al.*, 1991; Yoshimoto *et al.*, 2000; Teixeira *et al.*, 2001; Sutherland *et al.*, 2005). Além disso, trabalhos mostram que quimiocinas e citocinas como MCP-1/CCL2, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, IL-8/CXCL8 e fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) participam do recrutamento de leucócitos para os locais de reação de DTH (Larsen *et al.*, 1995; Bernhagen *et al.*, 1996; Rand *et al.*, 1996; Doyle *et al.*, 1997). A expressão de IP-10/CXCL10 e RANTES/CCL5 é detectada em reações de contato e granulomas (Devergne *et al.*, 1994; Gautam *et al.*, 1994). Assim, considerando-se que o modelo é mediado por linfócitos T helper e estes são atraídos

por MIP-1 $\alpha$ /CCL3 (Schall *et al.*, 1993; Taub *et al.*, 1993; Tedla *et al.*, 1998) uma estratégia terapêutica que diminua a ação de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 pode ser útil para minimizar a resposta de DTH.

A albumina de soro bovina metilada (mBSA) é uma proteína antigênica muito versátil que estimula uma resposta de hipersensibilidade do tipo tardia com predomínio de linfócitos Th1 semelhante àquela induzida por tuberculina e que permite a indução de uma resposta inflamatória na pele (Teixeira *et al.*, 2001), articulações (Lewis *et al.*, 1982) e cavidade pleural (Dunn & Miller, 1986). Neste último caso, a reação está associada a um influxo de leucócitos para o espaço pleural e a formação de um exsudato (Dunn & Miller, 1986).

Fine e colaboradores (2003) mostraram que granulócitos, macrófagos, células dendríticas e células T migram para a cavidade pleural de maneira tempo dependente após o desafio em animais sensibilizados, sendo que os neutrófilos representam a maior parte do infiltrado nas primeiras 24 horas e o número de mononucleares aumenta posteriormente. Além disso, o número de células T é consistentemente menor comparado ao número de macrófagos. Corroborando estes dados já descritos na literatura, nós observamos que 48 horas após a injeção de mBSA na pleura dos animais sensibilizados houve aumento do número de granulócitos e mononucleares. Este aumento de mononucleares foi devido tanto ao aumento de células T, quanto de macrófagos. A administração de Evasina-1 preveniu o aumento do recrutamento de granulócitos, bem como a migração de células T, tanto linfócitos CD4<sup>+</sup> quanto CD8<sup>+</sup>. Não houve interferência sobre o influxo de macrófagos, o que não promoveu diminuição global do número de mononucleares. Já foi descrito que nesse modelo ocorre aumento local da concentração de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 já nas primeiras 6 horas que diminui com o tempo, sugerindo que esta quimiocina contribui para a migração celular induzida por antígeno (Fine *et al.*, 2003). Assim, a Evasina poderia ter se ligado ao MIP-1 $\alpha$ /CCL3 impedindo com que esse exercesse seus efeitos biológicos.

No intuito de validarmos o potencial da Evasina-1 nas reações de DTH, nós utilizamos outro modelo de resposta mediada por Th1. Alguns trabalhos descrevem que a injeção intraplantar de mBSA em animais imunizados acarreta em um aumento do volume da pata tempo dependente que já pode ser visualizado após 12 horas e, que se mantém elevado após 24-48 horas e posteriormente decai com o tempo (Sutherland *et al.*, 2005; Yoshimoto *et al.*, 2000). Também é visto que este aumento do volume é coincidente com a elevação da concentração de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 na pata (Yoshimoto *et al.*, 2000), sendo possivelmente induzido por IL-16 que é uma citocina quimioatraente para linfócitos CD4<sup>+</sup> (Cruikshank *et*

*al.*, 1994). Na verdade, a administração intraplantar de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 induz aumento do volume da pata e desgranulação de mastócitos, bem como influxo de neutrófilos e de células mononucleares (Alam *et al.*, 1994).

Nossos resultados mostram aumento do volume da pata já nas primeiras 14 horas com queda gradual ao longo do tempo. O pré-tratamento com a Evasina-1 antes do desafio com mBSA nos animais sensibilizados preveniu o aumento do volume da pata após 14 e 24 horas, coincidentemente com o pico de produção de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 observado por Fine e colaboradores (2003). Assim, podemos sugerir que a Evasina-1 ao se ligar ao MIP-1 $\alpha$ /CCL3 inibiu com que esta quimiocina promovesse recrutamento celular e desgranulação de mastócitos que contribuem para a resposta local visualizada através do aumento de volume da pata.

O modelo de resposta alérgica nas vias aéreas induzido pelo antígeno do ovo do *Schistosoma mansoni* (SEA) é bem caracterizado como uma reação de hipersensibilidade do tipo tardia mediada predominantemente por linfócitos T helper 2, onde se observa um infiltrado eosinofílico nos pulmões que começa com 8 horas e se mantém elevado até cerca de 96 horas após o desafio com o antígeno. Lukacs e colaboradores (1995) mostraram que neste modelo MIP-1 $\alpha$ /CCL3 exerce um papel relevante sobre o influxo de eosinófilos. Na verdade, a atividade quimioatraente para eosinófilos era praticamente abolida quando amostras de pulmão de animais sensibilizados eram incubados com anticorpos anti-MIP-1 $\alpha$ /CCL3 (Lukacs *et al.*, 1996). Corroborando estes resultados, nós observamos que a administração de Evasina-1 preveniu de forma significativa o recrutamento tanto de eosinófilos, quanto de mononucleares para o pulmão, através da possível inibição da resposta biológica de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 resultante da interação com os receptores CCR1 ou CCR5 presentes nas células supracitadas, o que acarreta no rearranjo do citoesqueleto com subsequente migração celular. Juntos estes resultados nos permite afirmar que a Evasina-1 apresenta significativo efeito antiinflamatório em modelos de hipersensibilidade tardia, seja ele com predomínio de linfócitos Th1 ou de linfócitos Th2.

Outro modelo dependente de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 que nós estudamos foi de fibrose pulmonar induzida por bleomicina. A fibrose pulmonar é uma doença pulmonar crônica caracterizada histologicamente por uma inflamação intersticial difusa e fibrose (American Thoracic Society, 2000; Gross & Hunninghake, 2001). A fibrose pulmonar frequentemente se desenvolve devido a fatores bem estabelecidos como danos traumáticos, infecções, indução por fármacos, autoimunidade ou exposição a produtos tóxicos. Contudo, cerca de metade dos

casos são idiopáticos. A fibrose pulmonar idiopática é uma doença pulmonar crônica progressiva e irreversível, sendo que a maioria dos pacientes em estados avançados da doença apresentam grave hipoxemia e cianose. No presente momento, não existem esquemas terapêuticos satisfatórios para esta condição patológica e, o manejo se dá apenas pelo suporte primário e algumas vezes o transplante de pulmões (American Thoracic Society, 2000; Gross & Hunninghake, 2001).

Bleomicina é uma família de peptídeos quelantes que rompem o ácido desoxirribonucléico (DNA). São amplamente utilizadas como drogas anti-tumorais para o tratamento de vários tipos de tumores, incluindo carcinoma e linfomas, pois, ao contrário de vários agentes, raramente causam mielossupressão (Hecht, 2000; Chen & Stubbe 2005). Entretanto, o tratamento com bleomicina freqüentemente provoca lesão pulmonar e uma fibrose pulmonar irreversível (Sleijfer, 2001). Devido ao fato das mudanças patológicas provocadas pela bleomicina serem similares às aquelas observadas na fibrose pulmonar idiopática, o modelo de fibrose pulmonar induzido pela bleomicina é muito utilizado para estudar a patogênese celular e molecular da doença fibrose pulmonar idiopática.

Em resposta à administração de bleomicina, os animais desenvolvem uma alveolite aguda e uma inflamação intersticial, caracterizada pelo recrutamento seqüencial de neutrófilos, linfócitos e macrófagos na primeira semana. Subseqüentemente, respostas fibróticas caracterizadas pela proliferação de fibroblastos e síntese de matriz extracelular ocorrem na segunda semana (Smith *et al.*, 1995), o que acarreta em deposição desordenada de colágeno (Bowden, 1984).

Várias citocinas e quimiocinas e seus respectivos receptores têm sido avaliados com o objetivo de elucidar os mecanismos de patogênese da fibrose pulmonar. Diversos trabalhos mostram que quimiocinas, incluindo MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MCP-1/JE, RANTES/CCL5, MIP-2/CXCL1-2, e IP-10/CXCL10 contribuem para o processo inflamatório, fibrótico e de angiogênese no modelo de fibrose pulmonar induzido pela bleomicina (Smith *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1994; Keane *et al.*, 1999a, b).

A análise do lavado broncoalveolar e biópsias de pacientes com fibrose pulmonar idiopática demonstrou uma quantidade aumentada de MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MCP-1/JE, RANTES/CCL5 comparado às amostras de voluntários sadios (Standiford *et al.*, 1993; Boomars *et al.*, 1998; Kodama *et al.*, 1998). Além disso, o tratamento do lavado broncoalveolar com anticorpos anti-MIP-1 $\alpha$ /CCL3 inibiu em 18% a atividade quimiotática para células mononucleares (Standiford *et al.*, 1993). O tratamento com o anticorpo anti-MIP-

1 $\alpha$ /CCL3 em animais instilados com bleomicina reduz o acúmulo de mononucleares e a fibrose pulmonar (Smith *et al.*, 1994). Uma vez que MIP-1 $\alpha$ /CCL3 parece participar de modo relevante da patogênese da fibrose pulmonar, nós avaliamos o efeito da Evasina-1 sobre a resposta inflamatória e a fibrose pulmonar induzida pela bleomicina.

Em nosso modelo, a resposta inflamatória aguda é caracterizada pela presença precoce de neutrófilos no pulmão e espaço alveolar que vai sendo substituído por um infiltrado de mononucleares (Izbicki *et al.*, 2002). A destruição tecidual que precede à fibrose parece estar correlacionada à liberação de produtos tóxicos das células inflamatórias ativadas presentes no tecido após a lesão ser causada (Shimabukro *et al.*, 2003). Esta ativação celular pode ser visualizada pelo aumento da liberação de mieloperoxidase pelos neutrófilos e n-acetilglicosaminidase pelos macrófagos mensurados no pulmão. O tratamento com a Evasina-1 conseguiu prevenir o aumento da liberação enzimática, bem como o influxo celular para o parênquima pulmonar e espaço alveolar.

Com o objetivo de avaliar o efeito da Evasina-1 sobre as sub-populações que compõem os mononucleares no oitavo dia que é o pico da resposta inflamatória, nós realizamos um ensaio de citometria de fluxo. Corroborando dados da literatura observamos que a instilação de bleomicina promove um aumento do número tanto de células T quanto de macrófagos (Izbicki *et al.*, 2002). Desta forma, a diminuição global de mononucleares nos animais tratados com a Evasina-1 se deu pela redução do número de células CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e CD11b. Uma vez observado que a Evasina-1 é capaz de modificar o influxo celular, nós começamos a estudar por quais mecanismos essa promovia diminuição. Assim, avaliamos o efeito da proteína ligante de quimiocina sobre a concentração de citocinas e quimiocinas relevantes no processo recrutamento celular e indução de fibrose.

Primeiramente nós avaliamos o perfil de TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ . Já é bem caracterizado que TNF- $\alpha$  desempenha papel chave no modelo de fibrose pulmonar induzida pela bleomicina (Piguet *et al.*, 1997). A neutralização de TNF- $\alpha$  através da administração de anticorpos anti-TNF- $\alpha$  ou com a utilização de receptores solúveis diminui o influxo celular e subsequentemente o desenvolvimento de fibrose em camundongos (Piguet & Vesin, 1994; Zhang *et al.*, 1997). Em nosso modelo, observamos que os níveis de TNF- $\alpha$  se mantiveram maiores ao basal em todos os tempos avaliados e, o tratamento com a Evasina-1 reduziu de forma significativa esta elevação induzida pela bleomicina. Na verdade, Smith e colaboradores (1998) propõem que após a instilação com a bleomicina as células epiteliais e macrófagos alveolares residentes começam a liberar TNF- $\alpha$  e IL-6. Estas citocinas agiram

sinergicamente estimulando a expressão de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 pelas células alveolares. Além disso, mais tardiamente os macrófagos recrutados poderiam liberar TNF- $\alpha$  que estimularia nova expressão de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 e outras quimiocinas como MCP-1/CCL2. Estas por sua vez atrairiam macrófagos adicionais e linfócitos para o sítio de lesão. Uma vez que MIP-1 $\alpha$ /CCL3 é capaz de ativar CCR5 e recrutar macrófagos (Ishida *et al.*, 2007), a administração da Evasina-1 poderia inibir a ação autócrina de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 sobre os macrófagos, bem como a ação de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 sobre outros tipos celulares que liberam TNF- $\alpha$ . Os macrófagos alveolares além de liberarem TNF- $\alpha$ , também possuem a habilidade de secretar LTB<sub>4</sub> (Martin *et al.*, 1984), sendo estes dois mediadores importantes fatores quimioatraentes para neutrófilos. Embora MIP-1 $\alpha$ /CCL3 seja capaz de recrutar neutrófilos diretamente através da ativação do receptor CCR1, parece que no nosso modelo MIP-1 $\alpha$ /CCL3 promova a migração indireta desses leucócitos, mediante ativação dos receptores CCR5 presentes em macrófagos. É descrito que a deleção do gene que codifica CCR5 altera de forma relevante o influxo de granulócitos após a instilação de bleomicina, sendo este efeito não observado em animais “knockout” para CCR1 (Ishida *et al.*, 2007). Os neutrófilos recrutados são fontes de mediadores quimioatraentes para mononucleares, bem como mais MIP-1 $\alpha$ /CCL3 para o meio (Scapini *et al.*, 2000).

O fator de crescimento transformante (TGF- $\beta$ ) é uma importante citocina multifuncional, com alto poder pró-fibrogênico. O TGF- $\beta$  é secretado em uma forma latente e se torna ativado em seguida para desempenhar suas funções biológicas, incluindo angiogênese, primagem de neutrófilos humanos, quimiotaxia de monócitos e macrófagos. Além disso, esta citocina é uma poderosa estimuladora de fibroblastos para a produção de componentes da matriz extracelular, incluindo colágeno, fibronectina, fibrinas e proteoglicanos (Khalil *et al.*, 1989; Bartram & Speer, 2004). Desta forma, TGF- $\beta$  participa principalmente da resposta fibrótica subsequente à inflamação (Giri *et al.*, 1993; Munger *et al.*, 1999). Em modelo murino, a utilização de anticorpos anti-TGF- $\beta$  reduz a fibrose pulmonar (Giri *et al.*, 1993). Em nosso modelo, a estimulação com a bleomicina promoveu um aumento das concentrações de TGF- $\beta$  após o oitavo dia e o tratamento com a Evasina-1 foi capaz de prevenir o aumento desta citocina de forma significativa. Ishida e colaboradores (2007) recentemente mostraram que o acúmulo de colágeno induzido por bleomicina é menor em animais “knockout” para o gene que codifica MIP-1 $\alpha$ /CCL3 ou CCR5. Além disso, esses animais apresentam menor infiltrado de macrófagos e fibrócitos, bem como uma reduzida

expressão de TGF $\beta$ 1. Desta forma, este trabalho sugere que MIP-1 $\alpha$ /CCL3 ao interagir principalmente com CCR5, participa da migração de fibrócitos e macrófagos, (principais produtores de TGF $\beta$ 1). Assim, o aumento da quantidade de TGF $\beta$  culminaria no desenvolvimento subsequente de fibrose pulmonar.

Nós avaliamos as quimiocinas MCP-1/CCL2, MIP-1 $\alpha$ /CCL3 e RANTES/CCL5 que são mediadores reconhecidamente importantes para o recrutamento e ativação de monócitos, linfócitos e células natural killer (NK). Desta maneira, eles contribuem de forma relevante para a instalação da inflamação e a sua cronificação, que pode acarretar em uma resposta fibrótica pulmonar (Jiang *et al.*, 1992; Taub *et al.*, 1993; Maghazachi *et al.*, 1994; Appay & Rowland-Jones, 2001).

No modelo de fibrose pulmonar induzido pela bleomicina é reportado um aumento inicial da expressão de MCP-1/CCL2 (Smith *et al.*, 1995) no lavado broncoalveolar que, embora diminua ao longo do tempo, continua elevado em relação ao basal. Ishida e colaboradores (2007) também mostram aumento precoce da expressão de mRNA de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 no tecido que se mantêm elevado até 21 dias e, ao contrário, a expressão do mRNA de RANTES/CCL5 é aumentada somente 14 dias após a estimulação. De acordo com estes dados, nós observamos um padrão similar de cinética das quimiocinas MCP-1/CCL2, MIP-1 $\alpha$ /CCL3 e RANTES/CCL5. O tratamento com a Evasina-1 conseguiu prevenir a elevação dos níveis encontrados. Estes resultados sugerem que MIP-1 $\alpha$ /CCL3 medeia direta ou indiretamente a sua própria liberação, bem como de MCP-1/CCL2 e RANTES/CCL5. Todavia, também é possível que ao se ligar ao MIP-1 $\alpha$ /CCL3 a Evasina-1 impossibilite com que a proteína seja detectada pelo ensaio de ELISA. Na verdade, é plausível que MIP-1 $\alpha$ /CCL3 aja precocemente sobre células epiteliais e macrófagos alveolares residentes (Abonyo *et al.*, 2006; Ishida *et al.*, 2007) promovendo a liberação de MCP-1/CCL2 que antecede o recrutamento de mononucleares. Tardiamente, tanto os mononucleares quanto os fibrócitos podem continuar liberando MCP-1/CCL2. Os fibroblastos e os linfócitos também são capazes de liberar RANTES/CCL5 (Appay & Rowland-Jones, 2001) contribuindo para o aumento tardio desta quimiocina na lavado broncoalveolar, o que mantém a perpetuação de estímulos para a migração de linfócitos para o pulmão (Petrek *et al.*, 1997). É interessante ressaltar que as células recrutadas, como por exemplo, os macrófagos, podem liberar mais MIP-1 $\alpha$ /CCL3, o que culmina em uma alça de amplificação da resposta inflamatória que contribui para a expansão do processo fibrótico.



A modulação da resposta inflamatória nos animais submetidos à fibrose pulmonar induzida pela bleomicina e tratados com a Evasina-1 promoveu uma melhora do quadro fibrótico. Contribuindo, assim, para uma menor deposição de colágeno e uma maior preservação da arquitetura pulmonar. Esta habilidade antiinflamatória da Evasina-1 culminou na maior sobrevivência dos animais tratados comparados ao grupo que recebeu apenas veículo. Quando o tratamento com a Evasina-1 foi iniciado somente após o dia 8 (pico inflamatório), observamos que, embora houvesse diminuição de algumas citocinas e do influxo de mononucleares no dia 25, não ocorreu melhora da lesão tecidual. Este resultado é semelhante ao observado por Chaudhary e colaboradores (2006), onde o tratamento com a prednisolona no modelo de fibrose pulmonar só promove efeito antiinflamatório e antifibrótico eficaz quando iniciado antes da instalação do processo inflamatório. Juntos, estes resultados descritos mostram uma boa evidência que nos possibilita dizer que a Evasina-1 apresenta-se como uma boa estratégia antiinflamatória em modelos de inflamação aguda e crônica dependentes de MIP-1 $\alpha$ /CCL3. No entanto, é importante ressaltar que a imunogenicidade pode ser um problema para a utilização da proteína ligante de quimiocinas no tratamento de doenças crônicas. Em estudos posteriores nós avaliaremos esse potencial imunogênico da Evasina-1, o que contribuirá para a sua validação como agente terapêutico.

A outra evasina estudada foi a Evasina-3 que se liga seletivamente à GRO- $\alpha$ /CXCL1, IL-8/CXCL8 e homólogos murinos (KC/CXCL1-3 e MIP-2/CXCL1-2) com alta afinidade e, cujos valores de KD são 1,32; 1,43; 3,97 e 1,4 nM, respectivamente (Déruaz et al., 2007, manuscrito anexo). Ensaio *in vitro* mostram que a Evasina-3 inibe a quimiotaxia de neutrófilos induzida por IL-8/CXCL8 com IC<sub>50</sub> da ordem de nanomolares. Uma vez que IL-8/CXCL8 é um importante quimioatraente para neutrófilos, vários trabalhos sugerem a participação de IL-8/CXCL8 em condições patológicas que são caracterizadas por uma presença marcante desses leucócitos, incluindo artrite reumatóide, fibrose pulmonar idiopática e infecções bacterianas (Ziegenhagen *et al.*, 1998; Mukaida, 2000; Kraan *et al.*, 2001). Nos pacientes com artrite reumatóide é observado um aumento dos níveis de IL-8/CXCL8 nas articulações dos joelhos, sendo associada à presença desta citocina ao desenvolvimento dos sintomas clínicos, incluindo edema e dor (Kraan *et al.*, 2001). Para avaliarmos a habilidade da Evasina-3 em inibir *in vivo* os efeitos biológicos promovidos por KC/CXCL1-3 e MIP-2/CXCL1-2, uma vez que camundongos não produzem IL-8/CXCL8 bem como CXCR1, nós realizamos modelos de recrutamento de neutrófilos estimulado por agentes quimiotáticos ou por antígeno.

Já é bem descrito na literatura que tanto KC/CXCL1-3 quanto MIP-2/CXCL1-2 promovem quimiotaxia (Call *et al.*, 2001), bem como o recrutamento de neutrófilos para o peritônio e bolha de ar subcutânea (McColl & Clark-Lewis, 1999). Zhang e colaboradores (2001a, b) mostraram através de microscopia intravital no músculo cremaster de camundongos que as duas quimiocinas supracitadas possuem a habilidade de promover de forma dose dependente o rolamento, adesão e migração de neutrófilos para o tecido adjacente, sendo este processo dependente de selectina-P. Além disso, a utilização de antagonistas do receptor CXCR2 foi capaz de prevenir o acúmulo dos neutrófilos na cavidade peritoneal induzido por KC/CXCL1-3 ou MIP-2/CXCL1-2 (McColl & Clark-Lewis, 1999).

Corroborando os resultados já obtidos em nosso laboratório (dados não mostrados), a injeção intraarticular de KC/CXCL1-3 promoveu o aumento do influxo de neutrófilos para a cavidade, sendo que a Evasina-3 diminuiu este acúmulo. Assim, Evasina-3 ao se ligar ao KC/CXCL1-3 inibiu com que este ativasse os receptores CXCR2 e promovesse o subsequente recrutamento celular.

Trabalhos utilizando diferentes modelos de recrutamento como a bolha de ar subcutânea, peritonite e pleurisia mostram que a administração de LPS acarreta em uma consistente migração de neutrófilos, dependente da ação de agonistas do receptor CXCR2 como IL-8/CXCL8, KC/CXCL1-3 e MIP-2/CXCL1-2 (Broaddus *et al.*, 1994; McColl & Clark-Lewis, 1999). Ensaio *in vitro* mostram que o LPS é capaz de estimular macrófagos (Call *et al.*, 2001), bem como neutrófilos (Armstrong *et al.*, 20004) para que esses possam secretar tanto KC/CXCL1-3 quanto MIP-2/CXCL1-2.

Em experimentos realizados em nosso laboratório, visualizamos que a injeção intrapleural de LPS promove em recrutamento de neutrófilos de forma dose e tempo dependente, sendo o pico de resposta 8 horas após o estímulo (dados não mostrados). O pré-tratamento com a Evasina-3 preveniu de maneira significativa o aumento do número de neutrófilos na cavidade pleural 8 horas após a injeção de LPS, sugerindo que esta proteína ligante de quimiocina ao se ligar aos agonistas de CXCR2 impediu a ativação deste receptor e a subsequente migração de neutrófilos para o sítio de inflamação.

O próximo modelo que nós utilizamos para avaliar o papel da Evasina-3 foi o de pleurisia alérgica em camundongos. O modelo de pleurisia em roedores é amplamente utilizado pelo nosso grupo para o estudo do processo de migração, ativação e sobrevivência de leucócitos. Caracteriza-se pela indução de uma reação inflamatória na cavidade pleural de

camundongos por agentes quimiotáticos ou por uma resposta alérgica em animais previamente sensibilizados (Klein *et al.*, 2000; Alessandri *et al.*, 2003; Pinho *et al.*, 20003).

A injeção intrapleural do antígeno (ovalbumina, OVA) em animais sensibilizados promove após 4 horas uma migração significativa de eosinófilos, sendo que este infiltrado atinge um pico 24-48 horas após o desafio e decai a níveis basais em 72 horas. O desafio com OVA também induz um precoce recrutamento de neutrófilos que atinge o pico em 4 horas e diminui rapidamente ao valor basal em 24 horas. Uma migração tardia de mononucleares alcança o valor máximo após 14 horas (Klein *et al.*, 2000). De acordo com esse perfil celular já caracterizado, observamos que 8 horas após o desafio com ovalbumina houve consistente influxo de neutrófilos para a cavidade pleural, sendo este processo prevenido pela administração da Evasina-3 45 minutos antes da injeção intrapleural de OVA.

No modelo de peritonite alérgica foi mostrado que o desafio com o antígeno em animais imunizados induz a expressão de CXCR2 e a produção de KC/CXCL1-3 e MIP-2/CXCL1-2, sendo a migração de neutrófilos para o peritônio inibida por um antagonista de CXCR2 ou por um anticorpo anti-MIP-2/CXCL1-2, mas não por um anticorpo anti-KC/CXCL1-3. Na verdade, a administração de MIP-2/CXCL1-2 foi capaz de promover a liberação de MIP-1 $\alpha$ /CCL3, TNF- $\alpha$  e LTB<sub>4</sub>, sendo a liberação dos dois últimos mediadores inibida pelo tratamento com um anticorpo anti-MIP-1 $\alpha$ /CCL3. Através destes trabalhos foi possível vislumbrar uma cascata de eventos que culmina no recrutamento de neutrófilos uma vez liberado agonistas de CXCR2 após o desafio com antígeno em animais sensibilizados. Desta forma, é possível sugerir que MIP-2/CXCL1-2 promova a liberação de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 que por sua vez ao agir sobre CCR1, induza a liberação seqüencial de TNF- $\alpha$  e LTB<sub>4</sub> (Ramos *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2006). Assim, a administração da proteína ligante de quimiocinas impediu com que MIP-2/CXCL1-2 promovesse a seqüencial liberação dos mediadores inflamatórios que participam da migração de neutrófilos induzida por antígeno. Juntos, estes resultados descritos mostram uma boa evidência que nos possibilita dizer que a Evasina-3 apresenta-se com uma boa estratégia antiinflamatória em modelos dependentes da liberação de agonistas do receptor CXCR2.

A última evasina estudada foi a Evasina-4, que se liga seletivamente à eotaxina/CCL11 e RANTES/CCL5. Já é bem descrito na literatura que a eotaxina/CCL11 é um importante agente quimiotático para eosinófilos (Jose *et al.*, 1994; Humbles *et al.*, 1997; Klein *et al.*, 2001). Assim, é documentada uma quantidade aumentada desta quimiocina em condições patológicas que são caracterizadas por uma presença marcante desses leucócitos,

como nas reações alérgicas em modelos experimentais ou em pacientes asmáticos (Gonzalo *et al.*, 1996; Humbles *et al.*, 1997; Lamkhieoued *et al.*, 1997; Ying *et al.*, 1997). Para avaliarmos a habilidade da Evasina-4 em inibir *in vivo* os efeitos biológicos promovidos por eotaxina/CCL11 nós realizamos o modelo de recrutamento de eosinófilos para a cavidade pleural.

Klein e colaboradores (2001) mostraram que a injeção intrapleural de eotaxina promove um aumento precoce do influxo de eosinófilos para a cavidade pleural, já detectado nas primeiras 4 horas. Esse infiltrado atinge um pico 24-48 horas após o desafio e se mantém elevado mesmo após 72 horas. Em acordo com este resultado prévio, nós observamos um aumento do número de eosinófilos na cavidade pleural 24 horas após a estimulação com eotaxina/CCL11, sendo que o tratamento dos animais com Evasina-4 preveniu de maneira significativa o recrutamento de eosinófilos para a cavidade pleural 24 horas após o desafio. Desta forma, é possível sugerir que a proteína ligante de quimiocinas ao se ligar à eotaxina/CCL11, impediu com que esta se ligasse ao seu receptor CCR3 culminado na sinalização intracelular para o processo de recrutamento do granulócito.

Uma vez observado que a Evasina-4 apresenta a habilidade *in vivo* de se ligar à eotaxina/CCL11, nos estudamos o efeito da Evasina-4 em um modelo experimental dependente de eotaxina/CCL11. Klein e colaboradores (2000, 2001, 2002) mostraram que o pré-tratamento com anticorpo anti-eotaxina/CCL11, mas não anti-RANTES/CCL5 ou anti-MIP1a/CCL3, inibi o recrutamento de eosinófilos após o desafio com OVA em animais previamente imunizados. Além disso, foi evidenciado que a eotaxina/CCL11 (induzida por PAF) e LTB<sub>4</sub> (induzido por "stem cell factor" - SCF) cooperam para a migração de eosinófilos para locais de inflamação alérgica. Conforme ressaltado anteriormente, o pico de influxo eosinófilico ocorre 24-48 horas após o desafio com OVA. Assim, observamos que o aumento do recrutamento de eosinófilos para a cavidade 48 horas após foi diminuído nos animais tratados com a proteína ligante de quimiocinas. Os resultados descritos nos possibilita dizer que a Evasina-4 apresenta-se com uma boa estratégia antiinflamatória em modelos dependentes da eotaxina/CCL11.

Observamos através do ensaios realizados que as Evasinas administradas sistemicamente apresentam ampla distribuição, uma vez que alcançaram diferentes compartimentos corporais (cavidades, pulmões, pata, etc) onde foram induzidas reação inflamatórias. Além disso, as proteínas ligantes de quimiocinas atingiram esses sítios em

concentrações suficientemente eficazes para promover a diminuição de parâmetros inflamatórios, incluindo migração celular, níveis de citocinas, edema e deposição de colágeno.

## **VI. Conclusão**

Em conclusão, nossos resultados mostram que as evasinas apresentam atividade farmacológica *in vivo* e são eficazes em reduzir a inflamação em modelos animais. Os membros desta nova família de proteínas ligantes de quimiocinas, além de muito seletivos com relação aos seus ligantes, são menores que os recentemente descobertos anticorpos naturais de camelos que possuem apenas a cadeia pesada. Podem ser relevantes como futuras estratégias para o estudo do papel de quimiocinas específicas ou mesmo terapeuticamente para o tratamento de doenças inflamatórias associadas a uma produção aumentada de seus ligantes. Além disso, as evasinas podem ser úteis para o planejamento de novos arcabouços estruturais através do planejamento molecular racional.

## VII. Referências



- ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H. & POBER, J.S. Cellular and molecular Immunology, 4<sup>th</sup>. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000.
- ABONYO, B.O., LEBBY, K.D., TONRY, J.H., AHMAD, M. & HEIMAN, A.S. Modulation of eotaxin-3 (CCL26) in alveolar type II epithelial cells. **Cytokine**, v.36, n.5-6, p.237-44, 2006.
- AHUJA, S.K. & MURPHY, P.M. The CXC chemokines growth-regulated oncogene (GRO) alpha, GRObeta, GROgamma, neutrophil-activating peptide-2, and epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78 are potent agonists for the type B, but not the type A, human interleukin-8 receptor. **J Biol Chem**. v.271, n.34, p.20545-50, 1996.
- AIHARA, M., TSUCHIMOTO, D., TAKIZAWA, H., AZUMA, A., WAKEBE, H., OHMOTO, Y., IMAGAWA, K., KIKUCHI, M., MUKAIDA, N. & MATSUSHIMA, K. Mechanisms involved in Helicobacter pylori-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45. **Infect Immun.**, v.65, n.8, p.3218-24, 1997.
- ALAM, R., KUMAR, D., ANDERSON-WALTERS, D., FORSYTHE, P.A. Macrophage inflammatory protein-1 alpha and monocyte chemoattractant peptide-1 elicit immediate and late cutaneous reactions and activate murine mast cells in vivo. **J Immunol**, v.152, n.3, p.1298-303, 1994.
- ALCAMI, A., SYMONS, J.A., COLLINS, P.D., WILLIAMS, T.J. & SMITH, G.L. Blockade of chemokine activity by a soluble chemokine binding protein from vaccinia virus. **J Immunol.**, v.160, n.2, p.624-33, 1998.
- ALCAMI A. Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors. **Nat Rev Immunol.**, v.3, n.1, p.36-50, 2003.
- ALCORN, M.J., BOOTH, J.L., COGGESHALL, K.M. & METCALF, J.P. Adenovirus type 7 induces interleukin-8 production via activation of extracellular regulated kinase 1/2. **J Virol.**, 2001 v.75, n.14, p.6450-9, 2001.

- ALESSANDRI, A.L., PINHO, V., SOUZA, D.G., CASTRO, M.S., KLEIN, A. & TEIXEIRA, M.M. Mechanisms underlying the inhibitory effects of tachykinin receptor antagonists on eosinophil recruitment in an allergic pleurisy model in mice. **Br J Pharmacol.**, v.140, n.5, p.847-54, 2003.
- ALI, S., PALMER, A.C., BANERJEE, B., FRITCHLEY, S.J. & KIRBY, J.A. Examination of the function of RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta following interaction with heparin-like glycosaminoglycans. **J Biol Chem.**, v.275, n.16, p.11721-7, 2000.
- ALIBERTI, J., REIS E SOUSA, C., SCHITO, M., HIENY, S., WELLS, T., HUFFNAGLE, G.B. & SHER, A. CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells. **Nat Immunol.**, v.1, n.1, p.83-7, 2000.
- ALKHATIB, G., COMBADIÈRE, C., BRODER, C.C., FENG, Y., KENNEDY, P.E., MURPHY, P.M., BERGER, E.A. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. **Science**, v.272, n.5270, p.1955-8, 1996.
- ALLEN, S.J., CROWN, S.E. & HANDEL, T.M. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. **Annu Rev Immunol.**, v.25, p.787-820, 2007.
- AMERICAN THORACIC SOCIETY. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). **Am J Respir Crit Care Med.**, v.161, n.2, p.646-64, 2000.
- AMIN, K., JANSON, C., HARVIMA, I., VENGE, P. & NILSSON, G. CC chemokine receptors CCR1 and CCR4 are expressed on airway mast cells in allergic asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.116, p.1383-86, 2005.
- ANDERS, H.J., VIELHAUER, V., FRINK, M., LINDE, Y., COHEN, C.D., BLATTNER, S.M., KRETZLER, M., STRUTZ, F., MACK, M., GRONE, H.J., ONUFFER, J., HORUK, R., NELSON, P.J. & SCHLONDORFF, D. A chemokine receptor CCR-1

- antagonist reduces renal fibrosis after unilateral ureter ligation. **J Clin Invest.**, v.109, n.2, p.251-9, 2002.
- ANORMED INC. 2002. Novel heterocyclic compounds are modulators of chemokine receptors CXCR4 or CCR-5 useful for the treatment of HIV infection. Patent No. WO-00222599 (March 21).
- APPAY, V. & ROWLAND-JONES, S.L. RANTES: a versatile and controversial chemokine. **Trends Immunol.**, v.22, n.2, p.83-7, 2001.
- ARMSTRONG, D.A., MAJOR, J.A., CHUDYK, A., HAMILTON, T.A. Neutrophil chemoattractant genes KC and MIP-2 are expressed in different cell populations at sites of surgical injury. **J Leukoc Biol.**, v.75, n.4, p.641-8, 2004.
- AUTEN, R.L., RICHARDSON, R.M., WHITE, J.R., MASON, S.N., VOZZELLI, M.A. & WHORTON, M.H. Nonpeptide CXCR2 antagonist prevents neutrophil accumulation in hyperoxia-exposed newborn rats. **J Pharmacol Exp Ther.**, v.299, n.1, p.90-5, 2001.
- AZENSHTAIN, E., LUBOSHITS, G., SHINA, S., NEUMARK, E., SHAHBAZIAN, D., et al. The CCchemokine RANTES in breast carcinoma progression: regulation of expression and potential mechanisms of promalignant activity. **Cancer Res.**, v.62, p.1093-102, 2002.
- BACON, K.B., FLORES-ROMO, L., AUBRY, J.P., WELLS, T.N. & POWER, C.A. Interleukin-8 and RANTES induce the adhesion of the human basophilic cell line KU-812 to human endothelial cell monolayers. **Immunology**, v.82, n.3, p.473-81, 1994.
- BAGGIOLINI, M., DEWALD, B. & MOSER, B. Human chemokines: an update. **Annu Rev Immunol.** v.15, p.675-705, 1997.
- BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. **Nature.**, v.392, n.6676, p.565-8, 1998.
- BALASHOV, K.E., ROTTMAN, J.B., WEINER, H.L. & HANCOCK, W.W. CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and

- IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.96, n.12, p.6873-8, 1999.
- BANDEIRA-MELO, C., HERBST, A. & WELLER, P.F. Eotaxins. Contributing to the diversity of eosinophil recruitment and activation. **Am J Respir Cell Mol Biol.**, v.24, p.653-7, 2001.
- BANDEIRA-MELO, C., PHOOFOLO, M. & WELLER, P.F. (2001). Extranuclear lipid bodies, elicited by CCR3-mediated signaling pathways, are the sites of chemokine-enhanced leukotriene C4 production in eosinophils and basophils. **J Biol Chem.**, v.276, p.22779-87, 2001.
- BANDEIRA-MELO, C., SUGIYAMA, K., WOODS, L.J. & WELLER, P.F. Cutting edge: eotaxin elicits rapid vesicular transport-mediated release of preformed IL-4 from human eosinophils. **J Immunol.**, v.166, p.4813-7, 2001.
- BARCELOS, L.S., TALVANI, A., TEIXEIRA, A.S., VIEIRA, L.Q., CASSALI, G.D., ANDRADE, S.P. & TEIXEIRA, M.M. Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. **J Leukoc Biol.**, v.78, p.352-8, 2005.
- BARTRAM, U. & SPEER, C.P. The role of transforming growth factor beta in lung development and disease. **Chest**, v.125, n.2, p.754-65, 2004.
- BECKER, S., SOUKUP, J.M. Airway epithelial cell-induced activation of monocytes and eosinophils in respiratory syncytial viral infection. **Immunobiology**, v.201, n.1, p.88-106, 1999.
- BELPERIO, J.A., KEANE, M.P., ARENBERG, D.A., ADDISON, C.L., EHLERT, J.E., BURDICK, M.D. & STRIETER, R.M. CXC chemokines in angiogenesis. **J Leukoc Biol.**, v.68, n.1, p.1-8, 2000.

- BERGER, E.A., MURPHY, P.M. & FARBER, J.M. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. **Annu Rev Immunol**, v.17, p.657-700, 1999.
- BERNHAGEN, J., BACHER, M, CALANDRA, T., METZ, C.N., DOTY, S.B., DONNELLY, T., BUCALA, R. An essential role for macrophage migration inhibitory factor in the tuberculin delayed-type hypersensitivity reaction. **J Exp Med**. v.183, n.1, p.277-82, 1996.
- BISCHOFF, S.C., BAGGIOLINI, M., DE WECK, A.L. & DAHINDEN, C.A. Interleukin 8-inhibitor and inducer of histamine and leukotriene release in human basophils. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.179, n.1, p.628-33, 1991.
- BISCHOFF, S.C., KRIEGER, M., BRUNNER, T., ROT, A., VON TSCHARNER, V., BAGGIOLINI, M., DAHINDEN, C.A. RANTES and related chemokines activate human basophil granulocytes through different G protein-coupled receptors. **Eur J Immunol**, v.23, n.3, p.761-7, 1993.
- BLEUL, C.C., WU, L., HOXIE, J.A., SPRINGER, T.A., MACKAY, C.R. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.94, n.5, p.1925-30, 1997.
- BOEHME, S.A., SULLIVAN, S.K., CROWE, P.D., SANTOS, M., CONLON, P.J., SRIRAMARAO, P. & BACON, K.B. Activation of mitogen-activated protein kinase regulates eotaxin-induced eosinophil migration. **J Immunol.**, v.163, p.1611-8, 1999.
- BONECCHI, R., POLENTARUTTI, N., LUINI, W., BORSATTI, A., BERNASCONI, S., LOCATI, M., POWER, C., PROUDFOOT, A., WELLS, T.N., MACKAY, C., MANTOVANI, A., SOZZANI, S. Up-regulation of CCR1 and CCR3 and induction of chemotaxis to CC chemokines by IFN-gamma in human neutrophils. **J Immunol**, v.162, n.1, p.474-9, 1999.

- BOOMARS, K.A., SCHWEIZER, R.C., ZANEN, P., VAN DEN BOSCH, J.M., LAMMERS, J.W. & KOENDERMAN, L. Eosinophil chemotactic activity in bronchoalveolar lavage from idiopathic pulmonary fibrosis is dependent on cytokine priming of eosinophils. **Eur Respir J.**, v.11, n.5, p.1009-14, 1998.
- BORING, L., GOSLING, J., CLEARY, M. & CHARO, I.F. Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. **Nature**, v.394, n.6696, p.894-7, 1998.
- BOWDEN, D.H. Unraveling pulmonary fibrosis: the bleomycin model. **Lab Invest.**, v.50, n.5, p.487-8, 1984.
- BRIDGEMAN, A., STEVENSON, P.G., SIMAS, J.P. & EFSTATHIOU, S. A secreted chemokine binding protein encoded by murine gammaherpesvirus-68 is necessary for the establishment of a normal latent load. **J Exp Med.**, v.194, n.3, p.301-12, 2001.
- BROADDUS, V.C., BOYLAN, A.M., HOEFFEL, J.M., KIM, K.J., SADICK, M., CHUNTHARAPAI, A. & HEBERT, C.A. Neutralization of IL-8 inhibits neutrophil influx in a rabbit model of endotoxin-induced pleurisy. **J Immunol.**, v.152, n.6, p.2960-7, 1994.
- BUSSOLINO, F., SIRONI, M., BOCCHIETTO, E. & MANTOVANI, A. Synthesis of platelet-activating factor by polymorphonuclear neutrophils stimulated with interleukin-8. **J Biol Chem.**, v.267, n.21, p.14598-603, 1992.
- BURNS, A.R., SIMON, S.I., KUKIELKA, G.L., ROWEN, J.L., LU, H., MENDOZA, L.H., BROWN, E.S., ENTMAN, M.L. & SMITH, C.W. Chemotactic factors stimulate CD18-dependent canine neutrophil adherence and motility on lung fibroblasts. **J Immunol.**, v.156, n.9, p.3389-401, 1996.
- CACALANO, G., LEE, J., KIKLY, K., RYAN, A.M., PITTS-MEEK, S., HULTGREN, B., WOOD, W.I. & MOORE, M.W. Neutrophil and B cell expansion in mice that lack the murine IL-8 receptor homolog. **Science**, v.265, n.5172, p.682-4, 1994.

- CALL, D.R., NEMZEK, J.A., EBONG, S.J., BOLGOS, G.R., NEWCOMB, D.E., WOLLENBERG, G.K. & REMICK, D.G. Differential local and systemic regulation of the murine chemokines KC and MIP2. **Shock**, v.15, n.4, p.278-84, 2001.
- CAMPBELL, J.J. & BUTCHER, E.C. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. **Curr Opin Immunol.**, v.12, n.3, p.336-41, 2000.
- CAR, B.D., MELONI, F., LUISETTI, M., SEMENZATO, G., GIALDRONI-GRASSI, G. & WALZ, A. Elevated IL-8 and MCP-1 in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. **Am J Respir Crit Care Med.**, v.149, n.3, p.655-9, 1994.
- CARA, D.C., NEGRAO-CORREA, D. & TEIXEIRA, M.M. Mechanisms underlying eosinophil trafficking and their relevance in vivo. **Histol. Histopathol.**, v.15, p.899-920, 2000.
- CARA, D.C. & KUBES, P. Intravital microscopy as a tool for studying recruitment and chemotaxis. **Methods Mol Biol.**, v.239, p.123-32, 2004.
- CARRÉ, P.C., MORTENSON, R.L., KING, T.E., NOBLE, P.W., SABLE, C.L. & RICHES, D.W. Increased expression of the interleukin-8 gene by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. A potential mechanism for the recruitment and activation of neutrophils in lung fibrosis. **J Clin Invest.**, v.88, n.6, p.1802-10, 1991.
- CARVETH, H.J., BOHNSACK, J.F., MCINTYRE, T.M., BAGGIOLINI, M., PRESCOTT, S.M. & ZIMMERMAN, G.A. Neutrophil activating factor (NAF) induces polymorphonuclear leukocyte adherence to endothelial cells and to subendothelial matrix proteins. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.162, n.1, p.387-93, 1989.
- CASOLA, A., GAROFALO, R.P., JAMALUDDIN, M., VLAHOPOULOS, S. & BRASIER, A.R. Requirement of a novel upstream response element in respiratory syncytial virus-induced IL-8 gene expression. **J Immunol.** v.164, n.11, p.5944-51, 2000.

- CHAUDHARY, N.I., SCHNAPP, A. & PARK, J.E. Pharmacologic differentiation of inflammation and fibrosis in the rat bleomycin model. **Am J Respir Crit Care Med.**, v.173, n.7, p.769-76, 2006.
- CHEN, J. & STUBBE, J. Bleomycins: towards better therapeutics. **Nat Rev Cancer.**, v.5, n.2, p.102-12, 2005.
- CHUNTHARAPAI, A., LEE, J., HEBERT, C.A. & KIM, K.J. Monoclonal antibodies detect different distribution patterns of IL-8 receptor A and IL-8 receptor B on human peripheral blood leukocytes. **J Immunol.** v.153, n.12, p.5682-8, 1994.
- CHUNTHARAPAI, A. & KIM, K.J. Regulation of the expression of IL-8 receptor A/B by IL-8: possible functions of each receptor. **J Immunol.**, v.155, n.5, p.2587-94, 1995.
- COOK, D.N., BECK, M.A., COFFMAN, T.M., KIRBY, S.L., SHERIDAN, J.F., PRAGNELL, I.B. & SMITHIES, O. Requirement of MIP-1 alpha for an inflammatory response to viral infection. **Science**, v.269, n.5230, p.1583-5, 1995.
- COX, M.A., JENH, C.H., GONSIORREK, W., FINE, J., NARULA, S.K., ZAVODNY, P.J. & HIPKIN, R.W. Human interferon-inducible 10-kDa protein and human interferon-inducible T cell alpha chemoattractant are allotypic ligands for human CXCR3: differential binding to receptor states. **Mol Pharmacol.**, v.59, n.4, p.707-15, 2001.
- CRUIKSHANK, W.W., CENTER, D.M., NISAR, N., WU, M., NATKE, B., THEODORE, A.C. & KORNFELD, H. Molecular and functional analysis of a lymphocyte chemoattractant factor: association of biologic function with CD4 expression. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.91, n.11, p.5109-13, 1994.
- CRUIKSHANK, W.W., LONG, A., TARPY, R.E., KORNFELD, H., CARROLL, M.P., TERAN, L., HOLGATE, S.T., CENTER, D.M. Early identification of interleukin-16 (lymphocyte chemoattractant factor) and macrophage inflammatory protein 1 alpha (MIP1 alpha) in bronchoalveolar lavage fluid of antigen-challenged asthmatics. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v.13, n.6, p.738-47, 1995.



- DAHINDEN, C.A., KURIMOTO, Y., DE WECK, A.L., LINDLEY, I., DEWALD, B. & BAGGIOLINI, M. The neutrophil-activating peptide NAF/NAP-1 induces histamine and leukotriene release by interleukin 3-primed basophils. **J Exp Med.**, v.170, n.5, p.1787-92, 1989.
- DAS, A.M., FLOWER, R.J., HELLEWELL, P.G., TEIXEIRA, M.M. & PERRETTI, M. (1997). A novel murine model of allergic inflammation to study effect of dexamethasone on eosinophil recruitment. **Br. J. Pharmacol.**, v.121, p.97-104, 1997.
- DAS, A.M., AJUEBOR, M.N., FLOWER, R.J., PERRETTI, M., MCCOLL, S.R. Contrasting roles for RANTES and macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 alpha) in a murine model of allergic peritonitis. **Clin Exp Immuno.**, v.117, n.2, p.223-9, 1999.
- DE CLERCQ, E. New approaches toward anti-HIV chemotherapy. **J. Med. Chem.**, v.48, p.1297-313, 2005.
- DEVERGNE, O., MARFAING-KOKA, A., SCHALL, T.J., LEGER-RAVET, M.B., SADICK, M., PEUCHMAUR, M., CREVON, M.C., KIM, K.J., SCHALL, T.T., KIM, T., ET AL. Production of the RANTES chemokine in delayed-type hypersensitivity reactions: involvement of macrophages and endothelial cells. **J Exp Med.**, v.179, n.5, p.1689-94, 1994.
- DOYLE, H.A. & MURPHY, J.W. MIP-1 alpha contributes to the anticryptococcal delayed-type hypersensitivity reaction and protection against *Cryptococcus neoformans*. **Leukoc Biol.** v.61, n.2, p.147-55, 1997.
- DUNLEVY, J.R. & COUCHMAN, J.R. Interleukin-8 induces motile behavior and loss of focal adhesions in primary fibroblasts. **J Cell Sci.**, v.108, n. 1, p.311-21, 1995.
- DUNN, C.J. & MILLER, S.K. The effects of cyclosporin A on leucocyte infiltration and procoagulant activity in the mouse delayed hypersensitivity response in vivo. **Int J Immunopharmacol.**, v.8, n.6, p.635-43, 1986.

- EL-SHAZLY, A., MASUYAMA, K., NAKANO, K., EURA, M., SAMEJIMA, Y., ISHIKAWA, T. (1998). Human eotaxin induces eosinophil-derived neurotoxin release from normal human eosinophils. **Int Arch Allergy Immunol.**, v.117, p.55-8, 1998.
- EL-SHAZLY, A., YAMAGUCHI, N., MASUYAMA, K., SUDA, T. & ISHIKAWA, T. Novel association of the src family kinases, hck and c-fgr, with CCR3 receptor stimulation: A possible mechanism for eotaxin-induced human eosinophil chemotaxis. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.264, p.163-70, 1999.
- ELSNER, J., HOCHSTETTER, R., KIMMIG, D. & KAPP, A. Human eotaxin represents a potent activator of the respiratory burst of human eosinophils. *Eur J Immunol.*, v.26, p.1919-25, 1996.
- ELSNER, J., MACK, M., BRUHL, H., DULKYS, Y., KIMMIG, D., SIMMONS, G., CLAPHAM, P.R., SCHLONDORFF, D., KAPP, A., WELLS, T.N. & PROUDFOOT, A.E. Differential activation of CC chemokine receptors by AOP-RANTES. **J Biol Chem**, v.275, n.11, p.7787-94, 2000.
- FILHO, G.B. *Bogliolo Patologia Geral*. 2<sup>ed</sup>. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 1998.
- FINE, J.S., ROJAS-TRIANA, A., JACKSON, J.V., ENGSTROM, L.W., DENO, G.S., LUNDELL, D.J. & BOBER, L.A. Impairment of leukocyte trafficking in a murine pleuritis model by IL-4 and IL-10. **Inflammation**, v.27,n.4, p.161-74, 2003.
- FERREIRA, B.R. & SILVA, J.S. Successive tick infestations selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice. **Immunology**, v.96, n.3, p. 434-9, 1999.
- FRAUENSCHUH, A., POWER, C.A., DERUAZ, M., FERREIRA, B.R., DA SILVA, J.M., TEIXEIRA, M.M., DIAS, J., MARTIN, T., WELLS, T.N. & PROUDFOOT, A.E. Molecular cloning and characterization of a highly selective chemokine binding protein from the tick *Rhipicephalus sanguineus*. **J Biol Chem.**, Jul 19. 2007.

- FREDERICK, M.J. & CLAYMAN, G.L. Chemokines in cancer. **Expert Rev Mol Med.**, v.18, p.1-18, 2001.
- FUCHSBERGER, N., KITA, M., HAJNICKA, V., IMANISHI, J., LABUDA, M. & NUTTALL, P.A. Ixodid tick salivary gland extracts inhibit production of lipopolysaccharide-induced mRNA of several different human cytokines. **Exp Appl Acarol.**, v.19, n.11, p.671-6, 1995.
- FUJISAWA, T., KATO, Y., NAGASE, H., ATSUTA, J., TERADA, A., IGUCHI, K., KAMIYA, H., MORITA, Y., KITAURA, M., KAWASAKI, H., YOSHIE, O. & HIRAI, K. Chemokines induce eosinophil degranulation through CCR-3. **J Allergy Clin Immunol.**, v.106, p.507-513, 2000.
- GAGA, M., FREW, A.J., VARNEY, V.A. & KAY, A.B. Eosinophil activation and T lymphocyte infiltration in allergen-induced late phase skin reactions and classical delayed-type hypersensitivity. **J Immunol.**, v.147, n.3, p.816-22, 1991.
- GAUTAM, S., BATTISTO, J., MAJOR, J.A., ARMSTRONG, D., STOLER, M. & HAMILTON, T.A. Chemokine expression in trinitrochlorobenzene-mediated contact hypersensitivity. **J Leukoc Biol.**, v.55, n.4, p.452-60, 1994.
- GEISER, T., DEWALD, B., EHRENGRUBER, M.U., CLARK-LEWIS, I. & BAGGIOLINI, M. The interleukin-8-related chemotactic cytokines GRO alpha, GRO beta, and GRO gamma activate human neutrophil and basophil leukocytes. **J Biol Chem.**, v.268, n.21, p.15419-24, 1993.
- GERARD, C., ROLLINS, B.J. Chemokines and disease. **Nat Immunol.**, v.2, n.2, p.108-15, 2001.
- GERSZTEN, R.E., GARCIA-ZEPEDA, E.A., LIM, Y.C., YOSHIDA, M., DING, H.A., GIMBRONE, M.A., LUSTER, A.D., LUSCINSKAS, F.W. & ROSENZWEIG, A. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. **Nature**, v.398, n.6729, p.718-23, 1999.

- GILLESPIE, R.D., MBOW, M.L. & TITUS, R.G. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. **Parasite Immunol.**, v.22, n.7, p.319-31, 2000.
- GILLESPIE, R.D., DOLAN, M.C., PIESMAN, J. & TITUS, R.G. Identification of an IL-2 binding protein in the saliva of the Lyme disease vector tick, *Ixodes scapularis*. **J Immunol.**, v.166, n.7, p.4319-26, 2001.
- GIRI, S.N., HYDE, D.M. & HOLLINGER, M.A. Effect of antibody to transforming growth factor beta on bleomycin induced accumulation of lung collagen in mice. **Thorax**, v.48, n.10, p.959-66, 1993.
- GODESSART, N. & KUNKEL, S.L. Chemokines in autoimmune disease. **Curr. Opin. Immunol.**, v.13, p.670-75, 2001.
- GOEBEL, F.D. & JUELG, B. Chemokine receptor antagonists: A new era of HIV therapy? **Infection**, v.5, p.408-10, 2005.
- GONG, J.H. & CLARK-LEWIS, I. Antagonists of monocyte chemoattractant protein 1 identified by modification of functionally critical NH<sub>2</sub>-terminal residues. **J Exp Med.**, v.181, n.2, p.631-40, 1995.
- GONZALO, J.A., JIA, G.Q., AGUIRRE, V., FRIEND, D., COYLE, A.J., JENKINS, N.A., LIN, G.S., KATZ, H., LICHTMAN, A., COPELAND, N., KOPF, M. & GUTIERREZ-RAMOS, J.C. Mouse Eotaxin expression parallels eosinophil accumulation during lung allergic inflammation but it is not restricted to a Th<sub>2</sub>-type response. **Immunity**, v.4, p.1-14, 1996.
- GONZALO, J.A., LLOYD, C.M., WEN, D., ALBAR, J.P., WELLS, T.N., PROUDFOOT, A., MARTINEZ-A, C., DORF, M., BJERKE, T., COYLE, A.J. & GUTIERREZ-RAMOS, J.C. The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. **J Exp Med.**, v.188, n.1, p.157-67, 1998.

- GOSSET, P., TILLIE-LEBLOND, I., OUDIN, S., PARMENTIER, O., WALLAERT, B., JOSEPH, M., TONNEL, A.B. Production of chemokines and proinflammatory and antiinflammatory cytokines by human alveolar macrophages activated by IgE receptors. **J Allergy Clin Immunol**, v.103, n.2, p.289-97, 1999.
- GRAHAM, K.A., LALANI, A.S., MACEN, J.L., NESS, T.L., BARRY, M., LIU, L.Y., LUCAS, A., CLARK-LEWIS, I., MOYER, R.W. & MCFADDEN, G. The T1/35kDa family of poxvirus-secreted proteins bind chemokines and modulate leukocyte influx into virus-infected tissues. **Virology**, v.229, n.1, p.12-24, 1997.
- GRANELLI-PIPERNO, A., MOSER, B., POPE, M., CHEN, D., WEI, Y., ISDELL, F., O'DOHERTY, U., PAXTON, W., KOUP, R., MOJSOV, S., BHARDWAJ, N., CLARK-LEWIS, I., BAGGIOLINI, M., STEINMAN, R.M. Efficient interaction of HIV-1 with purified dendritic cells via multiple chemokine coreceptors. **J Exp Med**, v.184, n.6, p.2433-8, 1996.
- GROSS, T.J. & HUNNINGHAKE, G.W. Idiopathic pulmonary fibrosis. **N Engl J Med.**, v.345, n.7, p.517-25, 2001.
- HACHICHA, M., NACCACHE, P.H., MCCOLL, S.R. Inflammatory microcrystals differentially regulate the secretion of macrophage inflammatory protein 1 and interleukin 8 by human neutrophils: a possible mechanism of neutrophil recruitment to sites of inflammation in synovitis. **J Exp Med**, v.182, n.6, p.2019-25, 1995.
- HAJNICKA, V., KOCAKOVA, P., SLAVIKOVA, M., SLOVAK, M., GASPERIK, J., FUCHSBERGER, N. & NUTTALL, P.A. Anti-interleukin-8 activity of tick salivary gland extracts. **Parasite Immunol.**, v.23, n.9, p.483-9, 2001.
- HAJNICKA, V., VANCOVA, I., KOCAKOVA, P., SLOVAK, M., GASPERIK, J., SLAVIKOVA, M., HAILS, R.S., LABUDA, M. & NUTTALL, P.A. Manipulation of host cytokine network by ticks: a potential gateway for pathogen transmission. **Parasitolog.**, v.130, n.3, p.333-42, 2005.

- HANDEL, T.M., JOHNSON, Z., CROWN, S.E., LAU, E.K. & PROUDFOOT, A.E. Regulation of protein function by glycosaminoglycans--as exemplified by chemokines. **Annu Rev Biochem.**, v.74, p.385-410, 2005.
- HARRISON, S. & GEPPETTI, P. Substance P. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.33, p.555-76, 2001.
- HATANO, Y., KATAGIRI, K. & TAKAYASU, S. Increased levels in vivo of mRNAs for IL-8 and macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 alpha), but not of RANTES mRNA in peripheral blood mononuclear cells of patients with atopic dermatitis (AD). **Clin Exp Immunol**, v.117, n.2, p.237-43, 1999.
- HEATH, H., QIN, S., RAO, P., WU, L., LAROSA, G., KASSAM, N., PONATH, P.D. & MACKAY, C.R. Chemokine receptor usage by human eosinophils. The importance of CCR3 demonstrated using an antagonistic monoclonal antibody. **J Clin Invest.**, v.99, p.178-84, 1997.
- HECHT, S.M. Bleomycin: new perspectives on the mechanism of action. **J Nat Prod.**, v.63, n.1, p.158-68, 2000.
- HELSELGESSER, J., NG, H.P., LIANG, M., ZHENG, W., MAY, K., BAUMAN, J.G., MONAHAN, S., ISLAM, I., WEI, G.P., GHANNAM, A., TAUB, D.D., ROSSER, M., SNIDER, R.M., MORRISSEY, M.M., PEREZ, H.D. & HORUK, R. Identification and characterization of small molecule functional antagonists of the CCR1 chemokine receptor. **J Biol Chem.**, v.273, n.25, p.15687-92, 1998.
- HOLMES, W.E., LEE, J., KUANG, W.J., RICE, G.C. & WOOD, W.I. Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. **Science**, v.253, n.5025, p.1278-80, 1991.
- HOOGEWERF, A.J., KUSCHERT, G.S., PROUDFOOT, A.E., BORLAT, F., CLARK-LEWIS, I., POWER & C.A., WELLS, T.N. Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines. **Biochemistry**, v.36, n.44, p.13570-8, 1997.

- HORUK, R. Chemokine receptors. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v.12, n.4, p.313-35, 2001.
- HORUK, R., SHUREY, S., NG, H.P., MAY, K., BAUMAN, J.G., ISLAM, I., GHANNAM, A., BUCKMAN, B., WEI, G.P., XU, W., LIANG, M., ROSSER, M., DUNNING, L., HESSELGESSER, J., SNIDER, R.M., MORRISSEY, M.M., PEREZ, H.D. & GREEN, C. CCR1-specific non-peptide antagonist: efficacy in a rabbit allograft rejection model. **Immunol Lett.**, v.76, n.3, p.193-201, 2001.
- HORUK, R., CLAYBERGER, C., KRENSKY, A.M., WANG, Z., GRONE, H.J., WEBER, C., WEBER, K.S., NELSON, P.J., MAY, K., ROSSER, M., DUNNING, L., LIANG, M., BUCKMAN, B., GHANNAM, A., NG, H.P., ISLAM, I., BAUMAN, J.G., WEI, G.P., MONAHAN, S., XU, W., SNIDER, R.M., MORRISSEY, M.M., HESSELGESSER, J. & PEREZ, H.D. A non-peptide functional antagonist of the CCR1 chemokine receptor is effective in rat heart transplant rejection. **J Biol Chem.**, v.276, n.6, p.4199-204, 2001.
- HUBER, A.R., KUNKEL, S.L., TODD, R.F. 3<sup>RD</sup> & WEISS, S.J. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. **Science**, v.254, n.5028, p.99-102, 1991.
- HUMBLES, A.A., CONROY, D.M., MARLEAU, S., RANKIN, S.M., PALFRAMAN, R.T., PROUDFOOT, A.E., WELLS, T.N., LI, D., JEFFERY, P.K., GRIFFITHS-JOHNSON, D.A., WILLIAMS, T.J. & JOSE PJ. (1997). Kinetics of eotaxin generation and its relationship to eosinophil accumulation in allergic airways disease: analysis in a guinea pig model in vivo. **J. Exp. Med.**, v.186, p.601-12, 1997.
- ISHIDA, Y., KIMURA, A., KONDO, T., HAYASHI, T., UENO, M., TAKAKURA, N., MATSUSHIMA, K. & MUKAIDA, N. Essential roles of the CC chemokine ligand 3-CC chemokine receptor 5 axis in bleomycin-induced pulmonary fibrosis through regulation of macrophage and fibrocyte infiltration. **Am J Pathol.**, v.170, n.3, p.843-54, 2007.

- IZBICKI, G., SEGEL, M.J., CHRISTENSEN, T.G., CONNER, M.W. & BREUER, R. Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. **Int J Exp Pathol.**, v.83, n.3, p.111-9, 2002.
- IZIKSON, L., KLEIN, R.S., CHARO, I.F., WEINER, H.L. & LUSTER, A.D. Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking the CC chemokine receptor (CCR)2. **J Exp Med.**, v.192, n.7, p.1075-80, 2000.
- JIANG, Y., BELLER, D.I., FRENDEL, G. & GRAVES, D.T. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. **J Immunol.**, v.148, n.8, p. 2423-8, 1992.
- JOHNSON, Z., KOSCO-VILBOIS, M.H., HERREN, S., CIRILLO, R., MUZIO, V., ZARATIN, P., CARBONATTO, M., MACK, M., SMAILBEGOVIC, A., ROSE, M., LEVER, .R., PAGE, C., WELLS, T.N. & PROUDFOOT, A.E. Interference with heparin binding and oligomerization creates a novel anti-inflammatory strategy targeting the chemokine system. **J Immunol.**, v.173, n.9, p.5776-85, 2004.
- JOHNSON, Z., SCHWARZ, M., POWER, C.A., WELLS, T.N. & PROUDFOOT, A.E. Multi-faceted strategies to combat disease by interference with the chemokine system. **Trends Immunol.**, v.26, n.5, p.268-74, 2005.
- JOHNSTON, S.L., PAPI, A., MONICK, M.M. & HUNNINGHAKE, G.W. Rhinoviruses induce interleukin-8 mRNA and protein production in human monocytes. **J Infect Dis.** v.175, n.2, p.323-9, 1997.
- JOSE, P.J., GRIFFITHS-JOHNSON, D.A., COLLINS, P.D., WALSH, D.T., MOQBEL, R., TOTTY, N.F., TRUONG, O., HSUAN, J.J. & WILLIAMS, T.J. Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. **J Exp Med.**, v.179, p.881-7, 1994.
- KAMPEN, G.T., STAFFORD, S., ADACHI, T., JINQUAN, T., QUAN, S., GRANT, J.A., SKOV, P.S., POULSEN, L.K. & ALAM, R. Eotaxin induces degranulation and



- chemotaxis of eosinophils through the activation of ERK2 and p38 mitogen-activated protein kinases. **Blood**, v.95, p.1911-7, 2000.
- KEANE, M.P., BELPERIO, J.A., MOORE, T.A., MOORE, B.B., ARENBERG, D.A., SMITH, R.E., BURDICK, M.D., KUNKEL, S.L., STRIETER, R.M. Neutralization of the CXC chemokine, macrophage inflammatory protein-2, attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **J Immunol**, v.162, n.9, p.5511-8, 1999.
- KEANE, M.P., BELPERIO, J.A., ARENBERG, D.A., BURDICK, M.D., XU, Z.J., XUE, Y.Y. & STRIETER, R.M. IFN-gamma-inducible protein-10 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via inhibition of angiogenesis. **J Immunol.**, v.163, n.10, p.5686-92, 1999.
- KENNEDY, K.J., STRIETER, R.M., KUNKEL, S.L., LUKACS, N.W. & KARPUS, W.J. Acute and relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis are regulated by differential expression of the CC chemokines macrophage inflammatory protein-1alpha and monocyte chemoattractant protein-1. **J Neuroimmunol.**, v.92, n.1-2., p.98-108, 1998.
- KHALIL, N., BEREZNAVY, O., SPORN, M. & GREENBERG, A.H. Macrophage production of transforming growth factor beta and fibroblast collagen synthesis in chronic pulmonary inflammation. **J Exp Med.**, v.170, n.3, p.727-37, 1989.
- KITA, H., WEILER, D.A., ABU-GHAZALEH, R., SANDERSON, C.J. & GLEICH, G.J. Release of granule proteins from eosinophils cultured with IL-5. **J Immunol.**, v.149, p.629-635, 1992.
- KLEIN, A., TALVANI, A., CARA, D.C., GOMES, K.L., LUKACS, N.W. & TEIXEIRA, M.M. Stem cell factor plays a major role in the recruitment of eosinophils in allergic pleurisy in mice via the production of leukotriene B4. **J. Immunol.**, v.164, p.4271-6, 2000.
- KLEIN, A., TALVANI, A., SILVA, P.M., MARTINS, M.A., WELLS, T.N., PROUDFOOT, A., LUKACS, N.W. & TEIXEIRA, M.M. Stem cell factor-induced leukotriene B4

- production cooperates with eotaxin to mediate the recruitment of eosinophils during allergic pleurisy in mice. **J. Immunol.**, v.167, p.524-31, 2001.
- KLEIN, A., PINHO, V., ALESSANDRI, A.L., SHIMIZU, T., ISHII, S. & TEIXEIRA, M.M. Platelet-activating factor drives eotaxin production in an allergic pleurisy in mice. **Br. J. Pharmacol.**, v,135, p.1213-8, 2002.
- KOCH, A.E., POLVERINI, P.J., KUNKEL, S.L., HARLOW, L.A., DIPIETRO, L.A., ELNER, V.M., ELNER, S.G. & STRIETER, R.M. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. **Science**, v.258, n.5089, p.1798-801, 1992.
- KOCH, A.E., KUNKEL, S.L., HARLOW, L.A., MAZARAKIS, D.D., HAINES, G.K., BURDICK, M.D., POPE, R.M., STRIETER, R.M. Macrophage inflammatory protein-1 alpha. A novel chemotactic cytokine for macrophages in rheumatoid arthritis. **J Clin Invest**, v.93, n.3, p.921-8, 1994.
- KODAMA, N., YAMAGUCHI, E., HIZAWA, N., FURUYA, K., KOJIMA, J., OGURI, M., TAKAHASHI, T. & KAWAKAMI, Y. Expression of RANTES by bronchoalveolar lavage cells in nonsmoking patients with interstitial lung diseases. **Am J Respir Cell Mol Biol.**, v.18, n.4, p.526-31, 1998.
- KRAAN, M.C., PATEL, D.D., HARINGMAN, J.J., SMITH, M.D., WEEDON, H., AHERN, M.J., BREEDVELD, F.C. & TAK, P.P. The development of clinical signs of rheumatoid synovial inflammation is associated with increased synthesis of the chemokine CXCL8 (interleukin-8). **Arthritis Res.**, v.3, n.1, p.65-71, 2001.
- KUBES, P. The complexities of leukocyte recruitment. **Semin Immunol.** v.14, n.2, p.65-72, 2002.
- KUNA, P., REDDIGARI, S.R., KORNFELD, D. & KAPLAN, A.P. IL-8 inhibits histamine release from human basophils induced by histamine-releasing factors, connective tissue activating peptide III, and IL-3. **J Immunol.**, v.147, n.6, p.1920-4, 1991.

- KUNZ, M., HARTMANN, A., FLORY, E., TOKSOY, A., KOCZAN, D., THIESEN, H.J., MUKAIDA, N., NEUMANN, M., RAPP, U.R., BROCKER, E.B. & GILLITZER, R. Anoxia-induced up-regulation of interleukin-8 in human malignant melanoma. A potential mechanism for high tumor aggressiveness. **Am J Pathol.**, v.155, n.3, p.753-63, 1999.
- KUSCHERT, G.S., HOOGEWERF, A.J., PROUDFOOT, A.E., CHUNG, C.W., COOKE, R.M., HUBBARD, R.E., WELLS, T.N. & SANDERSON, P.N. Identification of a glycosaminoglycan binding surface on human interleukin-8. **Biochemistry**, v.37, n.32, p.11193-201, 1998.
- KUSCHERT, G.S., COULIN, F., POWER, C.A., PROUDFOOT, A.E., HUBBARD, R.E., HOOGEWERF, A.J. & WELLS, T.N. Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. **Biochemistry**, v.38, n.39, p.12959-68, 1999.
- LALANI, A.S., GRAHAM, K., MOSSMAN, K., RAJARATHNAM, K., CLARK-LEWIS, I., KELVIN, D. & MCFADDEN, G. The purified myxoma virus gamma interferon receptor homolog M-T7 interacts with the heparin-binding domains of chemokines. **J Virol.**, v.71, n.6, p.4356-63, 1997.
- LAMKHIOUED, B., RENZI, P.M., ABI-YOUNES, S., GARCIA-ZEPADA, E.A., ALLAKHVERDI, Z., GHAFFAR, O., ROTHENBERG, M.D., LUSTER, A.D. & HAMID, Q. Increased expression of eotaxin in bronchoalveolar lavage and airways of asthmatics contributes to the chemotaxis of eosinophils to the site of inflammation. **J Immunol.**, v.159, p.4593-601, 1997.
- LARSEN, C.G., ANDERSON, A.O., APPELLA, E., OPPENHEIM, J.J. & MATSUSHIMA, K. The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. **Science**, v.243, n.4897, p.1464-6, 1989.
- LARSEN, C.G., THOMSEN, M.K., GESSER, B., THOMSEN, P.D., DELEURAN, B.W., NOWAK, J., SKODT, V., THOMSEN, H.K., DELEURAN, M., THESTRUP-PEDERSEN, K., et al. The delayed-type hypersensitivity reaction is dependent on IL-8.

- Inhibition of a tuberculin skin reaction by an anti-IL-8 monoclonal antibody. **J Immunol.** v.155, n.4, p.2151-7, 1995.
- LAU, E.K., ALLEN, S., HSU, A.R. & HANDEL, T.M. Chemokine-receptor interactions: GPCRs, glycosaminoglycans and viral chemokine binding proteins. **Adv Protein Chem.**, v.68, p.351-91, 2004.
- LAU, E.K., PAAVOLA, C.D., JOHNSON, Z., GAUDRY, J.P., GERETTI, E., BORLAT, F., KUNGL, A.J., PROUDFOOT, A.E. & HANDEL, T.M. Identification of the glycosaminoglycan binding site of the CC chemokine, MCP-1: implications for structure and function in vivo. **J Biol Chem.**, v.279, n.21, p.22294-305, 2004.
- LEWIS, A.J., PARKER, J., DILUIGI, J., DATKO, L.J. & CARLSON, R.P. Immunomodulation of delayed hypersensitivity to methylated bovine serum albumin (MBSA) in mice using subliminal and normal sensitization procedures. **J Immunopharmacol.**, v.3, n.3-4, p.289-307, 1982.
- LIANG, M., MALLARI, C., ROSSER, M., NG, H.P., MAY, K., MONAHAN, S., BAUMAN, J.G., ISLAM, I., GHANNAM, A., BUCKMAN, B., SHAW, K., WEI, G.P., XU, W., ZHAO, Z., HO, E., SHEN, J., OANH, H., SUBRAMANYAM, B., VERGONA, R., TAUB, D., DUNNING, L., HARVEY, S., SNIDER, R.M., HESSELGESSER, J., MORRISSEY, M.M. & PEREZ, H.D. Identification and characterization of a potent, selective, and orally active antagonist of the CC chemokine receptor-1. **J Biol Chem.** v.275, n.25, p.19000-8, 2000.
- LIU, R., PAXTON, W.A., CHOE, S., CERADINI, D., MARTIN, S.R., HORUK, R., MACDONALD, M.E., STUHLMANN, H., KOUP, R.A. & LANDAU, N.R. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. **Cell.** v.86, n.3, p.367-77, 1996.
- LIU, L., DAI, E., MILLER, L., SEET, B., LALANI, A., MACAULEY, C., LI, X., VIRGIN, H.W., BUNCE, C., TURNER, P., MOYER, R., MCFADDEN, G. & LUCAS, A. Viral

- chemokine-binding proteins inhibit inflammatory responses and aortic allograft transplant vasculopathy in rat models. **Transplantation**. v.77, n.11, p.1652-60, 2004.
- LOETSCHER, P., MOSER, B. & BAGGIOLINI, M. Chemokines and their receptors in lymphocyte traffic and HIV infection. **Adv Immunol**. v.74, p.127-80, 2000.
- LUKACS, N.W., STRIETER, R.M., SHAKLEE, C.L., CHENSUE, S.W., KUNKEL, S.L. Macrophage inflammatory protein-1 alpha influences eosinophil recruitment in antigen-specific airway inflammation. **Eur J Immunol**, v.25, n.1, p.245-51, 1995.
- LUKACS, N.W., STANDIFORD, T.J., CHENSUE, S.W., KUNKEL, R.G., STRIETER, R.M. & KUNKEL, S.L. C-C chemokine-induced eosinophil chemotaxis during allergic airway inflammation. **J Leukoc Biol.**, v. 60, n.5, p.573-8, 1996.
- LUKACS, N.W., PROSSER, D.M., WIEKOWSKI, M., LIRA, S.A. & COOK, D.N. Requirement for the chemokine receptor CCR6 in allergic pulmonary inflammation. **J. Exp. Med.**, v.194, p.551-55, 2001.
- LUSSO, P. HIV and the chemokine system: 10 years later. **EMBO J**. v.25, p.447-56, 2006.
- LUTHER, S.A., CYSTER, J.G. Chemokines as regulators of T cell differentiation. **Nat Immunol**, v.2, n.2, p.102-7, 2001.
- MA, W., BRYCE, P.J., HUMBLE, A.A., LAOUINI, D., YALCINDAG, A., ALENIUS, H., FRIEND, D.S., OETTGEN, H.C., GERARD, C. & GEHA, R.S. (2002). CCR3 is essential for skin eosinophilia and airway hyperresponsiveness in a murine model of allergic skin inflammation. **J Clin Invest.**, v.109, p.621-8, 2002.
- MACALUSO, K.R. & WIKEL, S.K. *Dermacentor andersoni*: effects of repeated infestations on lymphocyte proliferation, cytokine production, and adhesion-molecule expression by BALB/c mice. **Ann Trop Med Parasitol.**, v.95, n.4, p.413-27, 2001.
- MACKAY, C.R. Chemokines: immunology's high impact factors. **Nat Immunol**, v.2, n.2, p.95-101, 2001.

- MAGHAZACHI, A.A., AL-AOUKATY, A., SCHALL, T.J. C-C chemokines induce the chemotaxis of NK and IL-2-activated NK cells. Role for G proteins. **J Immunol**, v.153, n.1, p.4969-77, 1994.
- MAHE, Y., MUKAIDA, N., KUNO, K., AKIYAMA, M., IKEDA, N., MATSUSHIMA, K. & MURAKAMI, S. Hepatitis B virus X protein transactivates human interleukin-8 gene through acting on nuclear factor kB and CCAAT/enhancer-binding protein-like cis-elements. **J Biol Chem.**, v.266, n.21, p.13759-63, 1991.
- MAHLER, D.A., HUANG, S., TABRIZI, M. & BELL, G.M. Efficacy and safety of a monoclonal antibody recognizing interleukin-8 in COPD: a pilot study. **Chest**, v.126, n.3, p.926-34, 2004.
- MARTIN, T.R., ALTMAN, L.C., ALBERT, R.K. & HENDERSON, W.R. Leukotriene B4 production by the human alveolar macrophage: a potential mechanism for amplifying inflammation in the lung. **Am Rev Respir Dis.**, v.129, n.1, p.106-11, 1984.
- MATSUSHIMA, K., MORISHITA, K., YOSHIMURA, T., LAVU, S., KOBAYASHI, Y., LEW, W., APPELLA, E., KUNG, H.F., LEONARD, E.J. & OPPENHEIM, J.J. Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. **J Exp Med.**, v.167, n.6, p.1883-93, 1988.
- MATTHEWS, A.N., FRIEND, D.S., ZIMMERMANN, N., SARAFI, M.N., LUSTER, A.D., PEARLMAN, E., WERT, S.E. & ROTHENBERG, M.E. Eotaxin is required for the baseline level of tissue eosinophils. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.95, p.6273-8, 1998.
- MAURER, M., VON STEBUT, E. Macrophage inflammatory protein-1. **Int J Biochem Cell Biol**, v.36, n.10, p.1882-6, 2004.
- MENTEN, P., WUYTS, A., VAN DAMME, J. Macrophage inflammatory protein-1. **Cytokine Growth Factor Rev**, v.13, n.6, p.455-81, 2002.

- MIDDLETON, J., NEIL, S., WINTLE, J., CLARK-LEWIS, I., MOORE, H., LAM, C., AUER, M., HUB, E. & ROT, A. Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. **Cell**, v.91, n.3, p.385-95, 1997.
- MIDDLETON, J., PATTERSON, A.M., GARDNER, L., SCHMUTZ, C. & ASHTON, B.A. Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. **Blood**, v.100, n.12, p.3853-60, 2002.
- MOROHASHI, H., MIYAWAKI, T., NOMURA, H., KUNO, K., MURAKAMI, S., MATSUSHIMA, K. & MUKAIDA, N. Expression of both types of human interleukin-8 receptors on mature neutrophils, monocytes, and natural killer cells. **J Leukoc Biol.** v.57, n.1, p.180-7, 1995.
- MOSER, B. & LOETSCHER, P. Lymphocyte traffic control by chemokines. **Nat Immunol.**, v.2, n.2, p.123-8, 2001.
- MOSSMAN, K., NATION, P., MACEN, J., GARBUTT, M., LUCAS, A. & MCFADDEN, G. Myxoma virus M-T7, a secreted homolog of the interferon-gamma receptor, is a critical virulence factor for the development of myxomatosis in European rabbits. **Virology**, v.215, n.1, p.17-30, 1996.
- MUKAIDA, N., HARADA, A., YASUMOTO, K. & MATSUSHIMA, K. Properties of pro-inflammatory cell type-specific leukocyte chemotactic cytokines, interleukin 8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF). **Microbiol Immunol.**, v.36, n.8, p.773-89 1992.
- MUKAIDA, N. Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation. **Int J Hematol.**, v.72, n.4, p.391-8, 2000.
- MUL, F.P., ZUURBIER, A.E., JANSSEN, H., CALAFAT, J., VAN WETERING, S., HIEMSTRA, P.S., ROOS, D. & HORDIJK, P.L. Sequential migration of neutrophils across monolayers of endothelial and epithelial cells. **J Leukoc Biol.**, v.68, n.4, p.529-37, 2000.

- MUNGER, J.S., HUANG, X., KAWAKATSU, H., GRIFFITHS, M.J., DALTON, S.L., WU, J., PITTET, J.F., KAMINSKI, N., GARAT, C., MATTHAY, M.A., RIFKIN, D.B. & SHEPPARD, D. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. **Cell**, v.96, n.3, p.319-28, 1999.
- MURAYAMA, T., OHARA, Y., OBUCHI, M., KHABAR, K.S., HIGASHI, H., MUKAIDA, N. & MATSUSHIMA, K. Human cytomegalovirus induces interleukin-8 production by a human monocytic cell line, THP-1, through acting concurrently on AP-1- and NF-kappaB-binding sites of the interleukin-8 gene. **J Virol.**, v.71, n.7, p.5692-5, 1997.
- MURDOCH, C. & FINN, A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. **Blood**, v.95, n.10, p.3032-43, 2000.
- MURPHY, P.M. & TIFFANY, H.L. Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. **Science**, v.253, n.5025, p.1280-3, 1991.
- MURPHY, P.M. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol.* v.12, p.593-633, 1994.
- MURPHY, P.M., BAGGIOLINI, M., CHARO, I.F., HEBERT, C.A., HORUK, R., MATSUSHIMA, K., MILLER, L.H., OPPENHEIM, J.J., POWER, C.A. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. **Pharmacol Rev**, v.52, n.1, p.145-76, 2000.
- MUYLDERMANS, S. Single domain camel antibodies: current status. **J Biotechnol.** v.74, n.4, p.277-302, 2001.
- NEOTE, K., DIGREGORIO, D., MAK, J.Y., HORUK, R. & SCHALL, T.J. Molecular cloning, functional expression, and signaling characteristics of a C-C chemokine receptor. **Cell**, v.72, n.3, p.415-25, 1993.



- OCHI, H., HIRANI, W.M., YUAN, Q., FRIEND, D.S., AUSTEN, K.F. & BOYCE, J.A. T helper cell type 2 cytokine-mediated comitogenic responses and CCR3 expression during differentiation of human mast cells in vitro. **J Exp Med.**, v.190, p.267-80, 1999.
- OPPENHEIM, J.J., ZACHARIAE, C.O., MUKAIDA, N. & MATSUSHIMA, K. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol.* v.9, p.617-48, 1991.
- PARRY, C.M., SIMAS, J.P., SMITH, V.P., STEWART, C.A., MINSON, A.C., EFSTATHIOU, S. & ALCAMI, A. A broad spectrum secreted chemokine binding protein encoded by a herpesvirus. **J Exp Med.**, v.191, n.3, p.573-8, 2000.
- PETERS, W. & CHARO, I.F. Involvement of chemokine receptor 2 and its ligand, monocyte chemoattractant protein-1, in the development of atherosclerosis: lessons from knockout mice. **Curr Opin Lipidol.** v.12, n.2, p.175-80, 2001.
- PETREK, M., PANTELIDIS, P., SOUTHCOTT, A.M., LYMPANY, P., SAFRANEK, P., BLACK, C.M., KOLEK, V., WEIGL, E. & DU BOIS, R.M. The source and role of RANTES in interstitial lung disease. **Eur Respir J.**, v.10, n.6, p.1207-16, 1997.
- PIGUET, P.F. & VESIN, C. Treatment by human recombinant soluble TNF receptor of pulmonary fibrosis induced by bleomycin or silica in mice. **Eur Respir J.**, v.7, n.3, p.515-8, 1994.
- PIGUET, P.F., KAUFMAN, S., BARAZZONE, C., MULLER, M., RYFFEL, B. & EUGSTER, H.P. Resistance of TNF/LT alpha double deficient mice to bleomycin-induced fibrosis. **Int J Exp Pathol.**, v.78, n.1, p.43-8, 1997.
- PINHO, V., OLIVEIRA, S.H., SOUZA, D.G., VASCONCELOS, D., ALESSANDRI, A.L., LUKACS, N.W., & TEIXEIRA, M.M. The role of CCL22 (MDC) for the recruitment of eosinophils during allergic pleurisy in mice. **J Leukoc Biol.**, v.73, n.3, p.356-62, 2003.

- PLATER-ZYBERK, C., HOOGEWERF, A.J., PROUDFOOT, A.E., POWER, C.A. & WELLS, T.N. Effect of a CC chemokine receptor antagonist on collagen induced arthritis in DBA/1 mice. **Immunol Lett.**, v.57, n.1-3, p.117-20, 1997.
- POLYAK, S.J., KHABAR, K.S., REZEIQ, M. & GRETCH, D.R. Elevated levels of interleukin-8 in serum are associated with hepatitis C virus infection and resistance to interferon therapy. **J Virol.**, v.75, n.13, p.6209-11, 2001.
- PROUDFOOT, A.E., POWER, C.A., HOOGEWERF, A.J., MONTJOVENT, M.O., BORLAT, F., OFFORD, R.E. & WELLS, T.N. Extension of recombinant human RANTES by the retention of the initiating methionine produces a potent antagonist. **J Biol Chem.**, v.271, n.5, p.2599-603, 1996.
- PROUDFOOT, A.E., BUSER, R., BORLAT, F., ALOUANI, S., SOLER, D., OFFORD, R.E., SCHRODER, J.M., POWER, C.A. & WELLS, T.N. Amino-terminally modified RANTES analogues demonstrate differential effects on RANTES receptors. **J Biol Chem.**, v.274, n.45, p.32478-85, 1999.
- PROUDFOOT, A.E., FRITCHLEY, S., BORLAT, F., SHAW, J.P., VILBOIS, F., ZWAHLEN, C., TRKOLA, A., MARCHANT, D., CLAPHAM, P.R. & WELLS, T.N. The BBXB motif of RANTES is the principal site for heparin binding and controls receptor selectivity. **J Biol Chem.**, v.276, n.14, p.10620-6, 2001.
- PROUDFOOT, A.E., HANDEL, T.M., JOHNSON, Z., LAU, E.K., LIWANG, P., CLARK-LEWIS, I., BORLAT, F., WELLS, T.N. & KOSCO-VILBOIS, M.H. Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.100, n.4, p.1885-90, 2003.
- PYO, R., JENSEN, K.K., WIEKOWSKI, M.T., MANFRA, D., ALCAMI, A., TAUBMAN, M.B. & LIRA, S.A. Inhibition of intimal hyperplasia in transgenic mice conditionally expressing the chemokine-binding protein M3. **Am J Pathol.**, v.164, n.6, p.2289-97, 2004.

- RAMOS, C.D., CANETTI, C., SOUTO, J.T., SILVA, J.S., HOGABOAM, C.M., FERREIRA, S.H. & CUNHA, F.Q. MIP-1alpha[CCL3] acting on the CCR1 receptor mediates neutrophil migration in immune inflammation via sequential release of TNF-alpha and LTB4. **J Leukoc Biol.**, v.78, n.1, p.167-77, 2005.
- RAMOS, C.D., FERNANDES, K.S., CANETTI, C., TEIXEIRA, M.M., SILVA, J.S. & CUNHA, F.Q. Neutrophil recruitment in immunized mice depends on MIP-2 inducing the sequential release of MIP-1alpha, TNF-alpha and LTB(4). **Eur J Immunol.**, v.36, n.8, p.2025-34, 2006.
- RAND, M.L., WARREN, J.S., MANSOUR, M.K., NEWMAN, W., RINGLER, D.J. Inhibition of T cell recruitment and cutaneous delayed-type hypersensitivity-induced inflammation with antibodies to monocyte chemoattractant protein-1. **Am J Pathol.**, v.148, n.3, p.855-64, 1996.
- RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M. *Farmacologia*. 4<sup>ed</sup>. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 2001.
- ROBINSON, S.C., SCOTT, K.A., WILSON, J.L., THOMPSON, R.G., PROUDFOOT, A.E. & BALKWILL, F.R. A chemokine receptor antagonist inhibits experimental breast tumor growth. **Cancer Res.**, v.63, p.8360-65, 2003.
- RODENBURG, R.J., BRINKHUIS, R.F., PEEK, R., WESTPHAL, J.R., VAN DEN HOOGEN, F.H., VAN VENROOIJ, W.J., VAN DE PUTTE, L.B. Expression of macrophage-derived chemokine (MDC) mRNA in macrophages is enhanced by interleukin-1beta, tumor necrosis factor alpha, and lipopolysaccharide. **J Leukoc Biol.**, v.63, n.5, p.606-11, 1998.
- ROSSI, D. & ZLOTNIK, A. The biology of chemokines and their receptors. **Annu Rev Immunol.**, v.18, p.217-42, 2000.
- ROT, A., KRIEGER, M., BRUNNER, T., BISCHOFF, S.C., SCHALL, T.J., DAHINDEN, C.A. RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha induce the migration and

- activation of normal human eosinophil granulocytes. **J Exp Med**, v.176, n.6, p.1489-95, 1992.
- ROT, A. Neutrophil attractant/activation protein-1 (interleukin-8) induces in vitro neutrophil migration by haptotactic mechanism. **Eur J Immunol.**, v.23, n.1, p.303-6, 1993.
- ROTHENBERG, M.E., MACLEAN, J.A., PEARLMAN, E., LUSTER, A.D. & LEDER, P. Targeted disruption of the chemokine eotaxin partially reduces antigen-induced tissue eosinophilia. **J Exp Med.**, v.185, p.785-90, 1997.
- ROTHENBERG, M.E. Eotaxin. An essential mediator of eosinophil trafficking into mucosal tissues. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v.21, p.291-5, 1999.
- ROTTMAN, J.B., SLAVIN, A.J., SILVA, R., WEINER, H.L., GERARD, C.G. & HANCOCK, W.W. Leukocyte recruitment during onset of experimental allergic encephalomyelitis is CCR1 dependent. **Eur J Immunol.**, v.30, n.8, p.2372-7, 2000.
- SADIR, R., IMBERTY, A., BALEUX, F. & LORTAT-JACOB, H. Heparan sulfate/heparin oligosaccharides protect stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12 against proteolysis induced by CD26/dipeptidyl peptidase IV. **J Biol Chem.**, v.279, n.42, p.43854-60, 2004.
- SAKO, D., CHANG, X.J., BARONE, K.M., VACHINO, G., WHITE, H.M., SHAW, G., VELDMAN, G.M., BEAN, K.M., AHERN, T.J., FURIE, B., *et al.* Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P selectin. **Cell**, v.75, n.6, p.1179-86, 1993.
- SALLUSTO, F., PALERMO, B., LENIG, D., MIETTINEN, M., MATIKAINEN, S., JULKUNEN, I., FORSTER, R., BURGSTHALER, R., LIPP, M., LANZAVECCHIA, A. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. **Eur J Immunol**, v.29, n.5, p.1617-25, 1999.
- SAMSON, M., LIBERT, F., DORANZ, B.J., RUCKER, J., LIESNARD, C., FARBER, C.M., SARAGOSTI, S., LAPOUMEROLIE, C., COGNAUX, J., FORCEILLE, C.,

- MUYLDERMANS, G., VERHOFSTEDE, C., BURTONBOY, G., GEORGES, M., IMAI, T., RANA, S., Y.I.Y, SMYTH, R.J., COLLMAN, R.G., DOMS, R.W., VASSART, G. & PARMENTIER, M. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. **Nature**, v.382, n.6593, p.722-5, 1996.
- SCANDELLA, E., MEN, Y., GILLESSEN, S., FORSTER, R. & GROETTRUP, M. Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. **Blood**, v.100, n.4, p.1354-61, 2002.
- SCAPINI, P., LAPINET-VERA, J.A., GASPERINI, S., CALZETTI, F., BAZZONI, F. & CASSATELLA, M.A. The neutrophil as a cellular source of chemokines. **Immunol Rev.**, v.177, p.195-203, 2000.
- SCHALL, T.J., BACON, K., CAMP, R.D., KASPARI, J.W., GOEDDEL, D.V. Human macrophage inflammatory protein alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta chemokines attract distinct populations of lymphocytes. **J Exp Med**, v.177, n.6, p.1821-6, 1993.
- SHRIVER, Z., LIU, D. & SASISEKHARAN, R. Emerging views of heparan sulfate glycosaminoglycan structure/activity relationships modulating dynamic biological functions. **Trends Cardiovasc Med.**, v.12, n.2, p.71-7, 2002.
- SCHRODER, J.M. The monocyte-derived neutrophil activating peptide (NAP/interleukin 8) stimulates human neutrophil arachidonate-5-lipoxygenase, but not the release of cellular arachidonate. **J Exp Med.**, v.170, n.3, p.847-63, 1989.
- SCHRUM, S., PROBST, P., FLEISCHER, B., ZIPFEL, P.F. Synthesis of the CC-chemokines MIP-1alpha, MIP-1beta, and RANTES is associated with a type 1 immune response. **J Immunol**, v.157, n.8, p.3598-604, 1996.
- SCHWARZ, M.K. & WELLS, T.N. Interfering with chemokine networks--the hope for new therapeutics. **Curr Opin Chem Biol.**, v.3, n.4, p.407-17, 1999.

- SERHAN, C.N. & SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nat Immunol.**, v.6, n.12, p.1191-7, 2005.
- SHIMABUKURO, D.W., SAWA, T. & GROPPER, M.A. Injury and repair in lung and airways. **Crit Care Med.**, v.31, n.8, p.S524-31, 2003
- SICA, A., SACCANI, A., BORSATTI, A., POWER, C.A., WELLS, T.N., LUINI, W., POLENTARUTTI, N., SOZZANI, S., MANTOVANI, A. Bacterial lipopolysaccharide rapidly inhibits expression of C-C chemokine receptors in human monocytes. **J Exp Med**, v.185, n.5, p.969-74, 1997.
- SLEIJFER, S. Bleomycin-induced pneumonitis. **Chest**, v.120, n.2, p.617-24, 2001.
- SMITH, R.E., STRIETER, R.M., PHAN, S.H., LUKACS, N.W., HUFFNAGLE, G.B., WILKE, C.A., BURDICK, M.D., LINCOLN, P., EVANOFF, H., KUNKEL, S.L. Production and function of murine macrophage inflammatory protein-1 alpha in bleomycin-induced lung injury. **J Immunol**, v.153, n.10, p.4704-12, 1994.
- SMITH, R.E., STRIETER, R.M., ZHANG, K., PHAN, S.H., STANDIFORD, T.J., LUKACS, N.W., KUNKEL, S.L. A role for C-C chemokines in fibrotic lung disease. **J Leukoc Biol**, v.57, n.5, p.782-7, 1995.
- SMITH, R.E., STRIETER, R.M., PHAN, S.H., LUKACS, N. & KUNKEL, S.L. TNF and IL-6 mediate MIP-1alpha expression in bleomycin-induced lung injury. **J Leukoc Biol.**, v.64, n.4, p.528-36, 1998.
- SMITH, C.A., SMITH, T.D., SMOLAK, P.J., FRIEND, D., HAGEN, H., GERHART, M., PARK, L., PICKUP, D.J., TORRANCE, D., MOHLER, K., SCHOOLEY, K. & GOODWIN, R.G. Poxvirus genomes encode a secreted, soluble protein that preferentially inhibits beta chemokine activity yet lacks sequence homology to known chemokine receptors. **Virology**, v.236, n.2, p.316-27, 1997.

- SMITH, P., FALLON, R.E., MANGAN, N.E., WALSH, C.M., SARAIVA, M., SAYERS, J.R., MCKENZIE, A.N., ALCAMI, A. & FALLON, P.G. Schistosoma mansoni secretes a chemokine binding protein with antiinflammatory activity. **J Exp Med.**, v.202, n.10, p.1319-25, 2005.
- SPRINGER, T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. **Cell**, v.76, n.2, p.301-14, 1994.
- SOUZA, D.G., SOARES, A.C., PINHO, V., TORLONI, H., REIS, L.F., TEIXEIRA, M.M., DIAS, A.A. & MARTINS, M.T. Increased mortality and inflammation in tumor necrosis factor-stimulated gene-14 transgenic mice after ischemia and reperfusion injury. **Am J Pathol.**, v.160, p.1755-65, 2002.
- SOZZANI, S., LUINI, W., BORSATTI, A., POLENTARUTTI, N., ZHOU, D., PIEMONTI, L., D'AMICO, G., POWER, C.A., WELLS, T.N., GOBBI, M., ALLAVENA, P., MANTOVANI, A. Receptor expression and responsiveness of human dendritic cells to a defined set of CC and CXC chemokines. **J Immunol**, v.159, n.4, p.1993-2000, 1997.
- STANDIFORD, T.J., ROLFE, M.W., KUNKEL, S.L., LYNCH, J.P. 3RD, BURDICK, M.D., GILBERT, A.R., ORRINGER, M.B., WHYTE, R.I., STRIETER, R.M. Macrophage inflammatory protein-1 alpha expression in interstitial lung disease. **J Immunol**, v.151, n.5, p.2852-63, 1993.
- STEEGMAIER, M., LEVINOVITZ, A., ISENMANN, S., BORGES, E., LENTER, M., KOCHER, H.P., KLEUSER, B. & VESTWEBER, D. The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. **Nature**, v.373, n.6515, p.615-20, 1995.
- STRIETER, R.M., POLVERINI, P.J., KUNKEL, S.L., ARENBERG, D.A., BURDICK, M.D., KASPER, J., DZUIBA, J., VAN DAMME, J., WALZ, A., MARRIOTT, D., et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. **J Biol Chem**. v.270, n.45, p.27348-57, 1995.

- SUGAHARA, K., MIKAMI, T., UYAMA, T., MIZUGUCHI, S., NOMURA, K. & KITAGAWA, H. Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. **Curr Opin Struct Biol.**, v.13, n.5, p.612-20, 2003.
- SUTHERLAND, A.P., NG, L.G., FLETCHER, C.A., SHUM, B., NEWTON, R.A., GREY, S.T., ROLPH, M.S., MACKAY, F., MACKAY, C.R. BAFF augments certain Th1-associated inflammatory responses. **J Immunol**, v.174, n.9, p.5537-44, 2005.
- TAKANO, K., AL-MOKDAD, M., SHIBATA, F., TSUCHIYA, H., NAKAGAWA, H. Rat macrophage inflammatory protein-1alpha, a CC chemokine, acts as a neutrophil chemoattractant in vitro and in vivo. **Inflammation**, v.23, n.5, p.411-24, 1999.
- TAUB, D.D., CONLON, K., LLOYD, A.R., OPPENHEIM, J.J., KELVIN, D.J. Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. **Science**, v.260, n.5106, p.355-8, 1993.
- TEDLA, N., WANG, H.W., MCNEIL, H.P., DI GIROLAMO, N., HAMPARTZOUMIAN, T., WAKEFIELD, D., LLOYD, A. Regulation of T lymphocyte trafficking into lymph nodes during an immune response by the chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-1 alpha and MIP-1 beta. **J Immunol**, v.161, n.10, p.5663-72, 1998.
- TEIXEIRA, M.M., WELLS, T.N., LUKACS, N.W., PROUDFOOT, A.E., KUNKEL, S.L., WILLIAMS, T.J. & HELLEWELL, P.G. Chemokine-induced eosinophil recruitment. Evidence of a role for endogenous eotaxin in an in vivo allergy model in mouse skin. **J Clin. Invest.**, v.100, p.1657-66, 1997.
- TEIXEIRA, M.M., DAS, A.M., MIOTLA, J.M., PERRETTI, M., HELLEWELL, P.G. The role of lipocortin-1 in the inhibitory action of dexamethasone on eosinophil trafficking in cutaneous inflammatory reactions in the mouse. **Br J Pharmacol**, v.123, n.3, p.538-44, 1998.



- TEIXEIRA, M.M., TALVANI, A., TAFURI, W.L., LUKACS, N.W., HELLEWELL, P.G. Eosinophil recruitment into sites of delayed-type hypersensitivity reactions in mice. **J Leukoc Biol**, v.69, n.3, p.353-60, 2001.
- TENSCHER, K., METZNER, B., SCHOPF, E., NORGAUER, J. & CZECH, W. Recombinant human eotaxin induces oxygen radical production, Ca(2+)-mobilization, actin reorganization, and CD11b upregulation in human eosinophils via a pertussis toxin-sensitive heterotrimeric guanine nucleotide-binding protein. **Blood**, v.88, p.3195-9, 1996.
- UGUCCIONI, M., MACKAY, C.R., OCHENSBERGER, B., LOETSCHER, P., RHIS, S., LAROSA, G.J., RAO, P., PONATH, P.D., BAGGIOLINI, M. & DAHINDEN, C.A. High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils. Role in activation by eotaxin, MCP-4, and other chemokines. **J Clin Invest.**, v.100, p.1137-43, 1997.
- VAN BERKEL, V., BARRETT, J., TIFFANY, H.L., FREMONT, D.H., MURPHY, P.M., MCFADDEN, G., SPECK, S.H. & VIRGIN, H.W. Identification of a gammaherpesvirus selective chemokine binding protein that inhibits chemokine action. **J Virol.**, v.74, n.15, p.6741-7, 2000.
- VAN KUPPEVELT, T.H., ROBBESOM, A.A., VERSTEEG, E.M., VEERKAMP, J.E., VAN HERWAARDEN, C.L. & DEKHUIJZEN, P.N. Restoration by vacuum inflation of original alveolar dimensions in small human lung specimens. **Eur Respir J.**, v.15, n.4, p.771-7, 2000.
- WAN, M.X., WANG, Y., LIU, Q., SCHRAMM, R. & THORLACIUS, H. CC chemokines induce P-selectin-dependent neutrophil rolling and recruitment in vivo: intermediary role of mast cells. **Br J Pharmacol.**, v.138, n.4, p.698-706, 2003.
- WANG, H.W., TEDLA, N., LLOYD, A.R., WAKEFIELD, D., MCNEIL, P.H. Mast cell activation and migration to lymph nodes during induction of an immune response in mice. **Clin Invest**, v.102, n.8, p.1617-26, 1998.

- WALSH, G.M. Eosinophil apoptosis: mechanisms and clinical relevance in asthmatic and allergic inflammation. **Br J Haematol.**, v.111, p.61-7, 2000.
- WEBB, L.M., EHRENGRUBER, M.U., CLARK-LEWIS, I., BAGGIOLINI, M. & ROT, A. Binding to heparan sulfate or heparin enhances neutrophil responses to interleukin 8. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.90, n.15, p.7158-62, 1993.
- WELLS, T.N., POWER, C.A., SHAW, J.P. & PROUDFOOT, A.E. Chemokine blockers--therapeutics in the making? **Trends Pharmacol Sci.** v.27, n.1, p.41-7. 2006.
- WHITE, J.R., LEE, J.M., YOUNG, P.R., HERTZBERG, R.P., JUREWICZ, A.J., CHAIKIN, M.A., WIDDOWSON, K., FOLEY, J.J., MARTIN, L.D., GRISWOLD, D.E., SARAU, H.M. Identification of a potent, selective non-peptide CXCR2 antagonist that inhibits interleukin-8-induced neutrophil migration. **J Biol Chem.**, v.273, n.17, p.10095-8, 1998.
- WIKEL, S.K. Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. **Int J Parasitol.**, v.29, n.6, p.851-9, 1999.
- WITT, D.P. & LANDER, A.D. Differential binding of chemokines to glycosaminoglycan subpopulations. **Curr Biol.**, v.4, n.5, p.394-400, 1994.
- WOLPE, S.D., DAVATELIS, G., SHERRY, B., BEUTLER, B., HESSE, D.G., NGUYEN, H.T., MOLDAWER, L.L., NATHAN, C.F, LOWRY, S.F, CERAMI, A. Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. **J Exp Med**, v.167, n.2, p.570-81, 1988.
- WONG, M., FISH, E.N. RANTES and MIP-1 $\alpha$  activate stats in T cells. **J Biol Chem**, v.273, n.1, p.309-14, 1998.
- WONG, M., UDDIN, S., MAJCHRZAK, B., HUYNH, T., PROUDFOOT, A.E., PLATANIAS, L.C., FISH & E.N. Rantes activates Jak2 and Jak3 to regulate engagement of multiple signaling pathways in T cells. **J Biol Chem.**, v.276, n.14, p.11427-31, 2001.

- XANTHOU, G., WILLIAMS, T.J. & PEASE, J.E. Molecular characterization of the chemokine receptor CXCR3: evidence for the involvement of distinct extracellular domains in a multi-step model of ligand binding and receptor activation. **Eur J Immunol.**, v.33, n.10, p.2927-36, 2003.
- XU, L., XIE, K., MUKAIDA, N., MATSUSHIMA, K. & FIDLER, I.J. Hypoxia-induced elevation in interleukin-8 expression by human ovarian carcinoma cells. **Cancer Res.**, v.59, n.22, p.5822-9, 1999.
- YING, S., ROBINSON, D.S., MENG, Q., ROTTMAN, J., KENNEDY, R., RINGLER, D.J., MACKAY, C.R., DAUGHERTY, B.L., SPRINGER, M.S., DURHAM, S.R., WILLIAMS, T.J. & KAY, A.B. Enhanced expression of eotaxin and CCR3 mRNA and protein in atopic asthma. Association with airway hyperresponsiveness and predominant co-localization of eotaxin mRNA to bronchial epithelial and endothelial cells. **Eur J Immunol.**, v.27, p.3507-16, 1997.
- YOSHIMOTO, T., WANG, C.R., YONETO, T., MATSUZAWA, A., CRUIKSHANK, W.W., NARIUCHI, H. Role of IL-16 in delayed-type hypersensitivity reaction. **Blood**, v.95., n.9, p.2869-74, 2000.
- YOSHIMURA, T., MATSUSHIMA, K., TANAKA, S., ROBINSON, E.A., APPELLA, E., OPPENHEIM, J.J. & LEONARD, E.J. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v.84, n.24, p.9233-7, 1987.
- ZAGORSKI, J. & DELARCO, J.E. Rat CINC (cytokine-induced neutrophil chemoattractant) is the homolog of the human GRO proteins but is encoded by a single gene. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.190, n.1, p.104-10, 1993.
- ZAITSEVA, M., PEDEN, K. & GOLDING, H. HIV coreceptors: role of structure, posttranslational modifications, and internalization in viral-cell fusion and as targets for entry inhibitors. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1614, p.51-61, 2003.

- ZHANG, K., GHARAEI-KERMANI, M., JONES, M.L., WARREN, J.S., PHAN, S.H. Lung monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **J Immunol**, v.153, n.10, p.4733-41, 1994.
- ZHANG, K., GHARAEI-KERMANI, M., MCGARRY, B., REMICK, D. & PHAN, S.H. TNF-alpha-mediated lung cytokine networking and eosinophil recruitment in pulmonary fibrosis. **J Immunol**, v.158, n.2, p.954-9, 1997.
- ZHANG, Y. & ROLLINS, B.J. A dominant negative inhibitor indicates that monocyte chemoattractant protein 1 functions as a dimer. **Mol Cell Biol**. v.15, n.9, p.4851-5, 1995.
- ZHANG, X.W., WANG, Y., LIU, Q. & THORLACIUS, H. Redundant function of macrophage inflammatory protein-2 and KC in tumor necrosis factor-alpha-induced extravasation of neutrophils in vivo. **Eur J Pharmacol**, v.427, n.3, p.277-83, 2001.
- ZHANG, X.W., LIU, Q., WANG, Y. & THORLACIUS, H. CXC chemokines, MIP-2 and KC, induce P-selectin-dependent neutrophil rolling and extravascular migration in vivo. **Br J Pharmacol**, v.133, n.3, p.413-21, 2001.
- ZIEGENHAGEN, M.W., SCHRUM, S., ZISSEL, G., ZIPFEL, P.F., SCHLAAK, M. & MÜLLER-QUERNHEIM, J. Increased expression of proinflammatory chemokines in bronchoalveolar lavage cells of patients with progressing idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis. **J Investig Med**, v.46, n.5, p.223-31, 1998.

## **VIII. Anexos**

**Immune evasion by blood sucking parasites is mediated by  
a family of highly selective chemokine binding proteins  
with anti-inflammatory activity**

Maud Déruaz<sup>1</sup>, Achim Frauenschuh<sup>1#</sup>, Ana L. Alessandri<sup>2</sup>, João M. Dias<sup>1</sup>, Fernanda M. Coelho<sup>2</sup>, Remo C. Russo<sup>2</sup>, Beatriz R. Ferreira<sup>3</sup>, Gerard J. Graham<sup>4</sup>, Jeffrey P. Shaw, Timothy N.C. Wells<sup>1</sup>, Mauro M. Teixeira<sup>2</sup>, Christine A. Power<sup>1</sup> and Amanda E.I. Proudfoot<sup>\*1</sup>.

**<sup>1</sup>Merck Serono Geneva Research Centre, 9 Chemin des Mines, 1202 Geneva, Switzerland.**

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

<sup>3</sup>Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, SP, Brazil.

<sup>4</sup>Division of Immunology, Infection and Inflammation, University of Glasgow, 120 University Place, Glasgow, G12 8TA, UK.

# Current address: Novartis Pharma AG, Lichtstrasse 35, 4056 Basel, Switzerland.

Correspondence should be addressed to A.E.I.P ([amanda.proudfoot@merckserono.net](mailto:amanda.proudfoot@merckserono.net)) or C.A.P. ([christine.power@merckserono.net](mailto:christine.power@merckserono.net))

## Abstract

Blood sucking parasites such as hard ticks have evolved a wide variety of immunomodulatory mechanisms to evade the host immune response. We have cloned three members of a new family of chemokine binding proteins (CHBPs) which we have called *Evasins*. Here we report the characterization of Evasin-1 and Evasin-3, which have distinct chemokine binding selectivities and are unrelated to each other at the sequence and structural level. Administration of Evasin-1 and Evasin-3 in animal disease models demonstrates that they have potent anti-inflammatory activity. The Evasins are distinguished from viral CHBPs in terms of sequence, specificity, size and structure. They are even smaller than single domain antibodies and may prove to be therapeutically useful as novel anti-inflammatory agents in the future.

Many pathogenic organisms including viruses have developed strategies to evade the host immune system based on interference with host cytokine and chemokine pro-inflammatory mediators<sup>1-3</sup>. Inhibitory binding proteins for pro-inflammatory cytokines, including TBP, IFNAR and IL-18 BP, have also been described in humans but no secreted chemokine binding proteins have so far been identified in vertebrates. However, internal and external parasites have evolved chemokine evasion strategies which allow them to productively suppress the mammalian immune response in order to maintain their presence in/on their host. Ticks are blood sucking parasites whose role in the transmission of pathogens such as *Borrelia burgdorferi* which causes Lyme disease, has been the subject of intensive research<sup>4</sup>. Ticks feed on their hosts for relatively long periods of time, ranging from several days to weeks, and provided that they do not carry infectious agents, can remain essentially undetected by their hosts. In order to achieve this, they have evolved an arsenal of anti-inflammatory, anti-coagulant, and analgesic agents which are used to render the ticks invisible to the immune system<sup>5-7</sup>. Currently little is known about the molecular nature of such agents but the cloning and characterization of these factors may yield novel proteins of potential therapeutic use in human inflammatory pathologies.

Successful prevention of the activity of family of small chemoattractant proteins called chemokines has been shown by viral CHBPs, and more recently by a CHBP isolated from the parasitic worm, *Schistosoma mansoni*<sup>8</sup>. Deletion of the gene encoding the broad

spectrum chemokine binding protein, T1 from the rabbit poxvirus, myxoma virus, resulted in extensive leukocyte infiltration in the dermis of the infected animal, which was absent upon infection by the wild type virus<sup>9</sup>. This study elegantly demonstrated that the virus had evolved a mechanism which prevented the recruitment of leukocytes to the site of infection.

Recently, the presence of anti-chemokine activities in tick saliva has been reported<sup>10;11</sup>. Tick salivary gland extracts were shown to contain an activity that neutralized CXCL8, and in a later study, neutralization of other chemokines was also demonstrated. Our own analyses of tick saliva harvested during feeding also demonstrated the presence of molecules that bound to CXCL8, CCL3 and CCL5. Using an expression cloning strategy to identify the protein(s) in tick saliva which bind to chemokines, we initially cloned a chemokine binding protein, which we called Evasin-1, that specifically binds to the CC chemokines CCL3, CCL4 and CCL18<sup>12</sup>. Subsequent rescreening of the tick salivary gland cDNA library with a selection of chemokines and cytokines enabled us to identify two further CHBPs. Here we report the cloning of a CXC chemokine binding protein, named Evasin-3, and a second CC chemokine binding protein, distinct from Evasin-1, named Evasin-4. Interestingly, Evasin-3 bears no sequence homology to Evasins -1 and -4, which appear to belong to the same structural family. The three proteins are all surprisingly small compared to the chemokine and cytokine binding proteins described to date. Evasins-1 and -3 were crystallized and their three-dimensional structures have been solved, revealing novel folds with binding modes distinct from that of viral CHBPs. Investigations of their specificity *in vitro* and their efficacy *in vivo* in animal models of chronic inflammatory diseases such as pulmonary fibrosis, arthritis and psoriasis have demonstrated that the Evasins have potent anti-inflammatory activities, providing tantalizing new insights into scaffolds evolved by nature to inhibit inflammation.

## Results

We analyzed the ability of saliva from *Rhipicephalus sanguineus* (common brown dog tick) to inhibit the binding of I<sup>125</sup> - labelled chemokines CCL2, CCL5 and CXCL8, as well as CCL3, to their respective receptors using a scintillation proximity assay (SPA). As shown in Fig 1a, inhibition of binding was achieved for CCL3, CCL5 and CXCL8, with the most potent effect on CCL3. No inhibition was observed for CCL2 although saliva harvested from another tick species, *Amblyomma cajenes*, appeared to have anti-CCL2 activity (data not shown). The possibility that the inhibition was due to degradation of the radiolabelled chemokines by a



proteolytic activity in the saliva was addressed by incubation of the radiolabelled chemokines in the saliva for 4 h. Subsequent analysis by SDS-PAGE revealed that no degradation of the chemokine had occurred (data not shown). We next addressed the question of whether there was more than one binding protein present in the saliva, by testing whether an excess of CXCL8 was able to block the activity of the CCL3 binding protein. As shown in Fig 1a, a 500-fold excess of CXCL8 had no effect on the ability of the saliva to inhibit CCL3 binding to CCR5, therefore suggesting the presence of at least two binding proteins.

Incubation of <sup>125</sup>I-CCL3 with tick saliva followed by chemical cross-linking produces a clear band shift when the reaction products were analysed on SDS PAGE and this method was adopted as a screening assay during our attempts to clone the tick CHBPs. We therefore used the band shift assay to screen supernatants from HEK293 cells transfected with a tick salivary gland cDNA library, to identify a cDNA encoding a CCL3 binding protein which we called Evasin-1<sup>12</sup>. Surface plasmon resonance (SPR) performed with immobilized CCL3 and CCL5 demonstrated the presence of binding proteins for these two chemokines in tick saliva (Fig 1b), and Surface Enhanced Laser Desorption Ionization (SELDI) identified peaks that bound to immobilized CXCL8 and CCL5 (Fig 1c), but surprisingly, no peak was observed for CCL3 (data not shown). The masses identified by SELDI indicated very small proteins, with a mass of 7,133 Da binding to CXCL8 and a mass of 11,052 Da binding to CCL5 – masses very close to those of the predicted protein cores as discussed below.

We therefore re-screened the cDNA library using a cocktail of chemokines and cytokines, containing iodinated CXCL8, IL-1 $\beta$  and IL-2. IL-2 was included as an anti-IL-2 activity has previously been reported in tick salivary gland extracts<sup>10</sup>. In the first round of screening, we identified a band shift in one pool of 270 clones. After deconvolution of the positive pool, and cross-linking to the individual iodinated proteins present in the cocktail, we identified a cDNA encoding a CXCL8 binding protein. As we initially identified a putative CHBP which we named Evasin-2 the function of which remains to be elucidated, we called the CXCL8 binding protein Evasin-3 (Fig 1d, Lane 3). Competition experiments using a selection of chemokines (CCL3, CXCL1, CXCL4, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12 and CXCL13) indicated that only CXCL1 was able to compete with radiolabelled CXCL8 for binding to Evasin-3 (results not shown). We then screened the expression library with a second cocktail consisting of iodinated CCL5, CCL11 and CXCL10. On analysis of supernatants from HEK cells transfected with the pools of clones from the cDNA expression library we

observed a band shift migrating around 50 kDa in several pools. This band was almost masked by a non-specific band migrating at around 60 kDa detected in all experiments. Deconvolution of the positive pools revealed a cDNA clone which was able to mediate cross-linking to both CCL5 and CCL11 (Fig 1d, Lanes 4 and 5), but not CXCL10 when tested in HEK293 cells. The CCL5 and CCL11 binding protein was named Evasin-4.

The cDNA for Evasin-3 encoded an open reading frame (ORF) of 92 amino acids which, after signal peptide cleavage gives rise to a mature protein of 66 amino acids with a predicted molecular mass of 7,005 Da. The cDNA for Evasin-4 encoded an ORF of 117 amino acids. Cleavage of the signal peptide sequence predicted using the Signal P algorithm would generate a mature protein of 110 amino acids with a predicted molecular mass of 12,032 Da (Fig 2a). Analyses of the amino acid sequences of Evasin-3 and Evasin-4 revealed that Evasin-3 was unrelated to Evasin-1, whereas the Cys residues of the mature Evasin-4 sequence demonstrated an almost perfect alignment with those of Evasin-1 (Fig 2a). This indicates an identical disulfide topology suggesting that these two proteins are structurally related, despite their relatively low level of identity at the amino acid level (27% identity over 91 amino acids). Conservation of a homologous fold, despite a low level of identity at the primary sequence level is well known in protein families such as cytokines and chemokines.

Transient expression of C-terminal 6-His tagged Evasin-3 and Evasin-4 in HEK293 cells revealed that unlike Evasin-1, these two proteins were poorly secreted. We were able to obtain a small amount of purified Evasin-3 (150 µg) which was extensively glycosylated in order for *in vitro* characterization. SPR analysis revealed that Evasin-3, similar to Evasin-1, is a highly selective chemokine binding protein in that it was only able to bind to CXCL1 and CXCL8 and their murine counterparts, KC and MIP-2 (Fig 1e). The kinetic parameters as determined by SPR are shown in Table 1. It has proven difficult to produce recombinant 6His tagged Evasin-4 in HEK293 cells thus the identification of the N terminus of the mature protein has not yet been experimentally verified. Using the Signal P program to predict the cleavage site of the putative signal peptide sequence indicates that the mature protein sequence would commence with WLSTKC (Fig 2a). However, secondary structure predictions show that these amino acids are contained in a helix, suggesting that the N-terminus may be EVPQM. Nevertheless, alignment of the amino acid sequences of Evasin-4 and Evasin-1 shows that Evasin-4 has an extended N-terminus compared to Evasin-1, which

may be an important determinant of ligand binding specificity. We are currently testing different expression strategies in order to obtain sufficient Evasin-4 for N-terminal sequence verification and for *in vitro* and *in vivo* studies.

Since the yield of Evasin-3 was poor in the HEK293 expression system, we attempted expression in the prokaryotic host, *E. coli*. Although the probability was extremely high that Evasin-3 would be directed into inclusion bodies based on a formula predicting solubility for recombinant expression in *E. coli*<sup>13</sup>, we were surprised to obtain high level expression of soluble protein which could be purified to homogeneity in two chromatographic steps. Although the *E. coli* produced protein is not glycosylated, it had equivalent activity to Evasin-3 produced in HEK 293 cells (Table 1 and Fig 6a).

Evasin-3, produced in the prokaryotic expression system crystallized readily, and the crystallographic structure revealed a novel fold, totally unrelated to that of Evasin-1 (Fig 2c). The crystallographic structure of Evasin-1, described in detail elsewhere (Dias *et al*, manuscript in preparation), also revealed a novel protein fold (Fig 2b). Neither protein has a structural homologue in the PDB database. So while both Evasin-1 and Evasin-3 are of similar size and function, they are completely unrelated at amino acid sequence level, as well as in the secondary and tertiary structure (Figure 2b and 2c).

Evasin-1 has previously been shown to inhibit binding of CCL3 and CCL4 to CCR1 and CCR5 with affinities of 0.015 nM for CCL3 and 3 nM for CCL4<sup>12</sup>. This was confirmed by its ability to inhibit the activity of these chemokines *in vitro* and *in vivo*. As shown in Fig 3a, Evasin-1 inhibited ligand-induced chemotaxis of L1.2/CCR5 transfectants, with IC<sub>50</sub> values of 1 pM for the inhibition of CCL3 and 4 nM for CCL4. In order to test the ability of Evasin-1 to inhibit inflammation in disease models, we have determined its ability to bind murine MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$ . As shown in Table 1, it has slightly higher affinity for the murine chemokines, with K<sub>D</sub> values of 0.08 nM and 0.15 nM respectively, compared to 0.12 nM for human CCL3 and 0.5 nM for CCL4. We then tested Evasin-1 in *in vivo* recruitment models in mice. CCL3 was administered into the peritoneal cavity and the ability of systemically administered Evasin-1 to block leukocyte recruitment was assessed after 18 h. Significant inhibition of granulocyte recruitment was observed at doses of 3-30  $\mu$ g (Fig 3b) with little effect on other cell types (results not shown). The inhibition of granulocyte recruitment by Evasin-1 was then further investigated in a murine model of a Th1-predominant delayed-type hypersensitivity and a Th2-predominant, late phase reaction. In the Th1 sensitization model

using methylated BSA (mBSA), recruitment of leukocytes into the pleural cavity was significantly impaired (Fig 3c). Whilst the inhibition of neutrophil recruitment was most striking, inhibition of CD3<sup>+</sup> lymphocytes was also observed, but not of CD11b<sup>+</sup> monocytes as determined by FACS (results not shown). In the Th2 sensitization model, Evasin-1 inhibited eosinophil recruitment induced by antigen challenge into the lungs of mice immunized with *S. mansoni* eggs. An analysis of naïve mice by intravital microscopy demonstrated that Evasin-1 was able to block adhesion and emigration of leukocytes induced by injection of mCCL3 (Fig 3d).

The ability of Evasin-1 to prevent CCL3/CCL4 dependent cellular recruitment translated into potent anti-inflammatory effects in animal models of disease. Skin inflammation in D6<sup>-/-</sup> mice sensitized with TPA gives rise to a phenotype closely resembling that of the human inflammatory skin disorder, psoriasis, and has been shown to be dependent on the induction of several CC chemokines including CCL3 and CCL4, which are high affinity ligands for D6<sup>14</sup>. Evasin-1 was able to cause a significant reduction in the skin inflammation observed in these mice (Fig 4a and 4b) but not complete abrogation as observed with an anti-TNF antibody. This is in accordance with our previous observations and indicates that whilst several CC chemokines are implicated in this model, targeting CCL3 and CCL4 is sufficient to ameliorate pathology.

CCL3 has previously been demonstrated to play a role in mediating pulmonary fibrosis<sup>15</sup>. We therefore tested the effect of Evasin-1 in a lung injury model induced by intra-tracheal instillation of bleomycin. Mild or severe disease was induced with 0.0625 or 0.125 units of bleomycin. Evasin-1 reduced lethality in both cases (Fig 5a). Reduction in lethality was associated with a decrease in neutrophil accumulation at 2 and 8 days after bleomycin challenge (Fig 5b), which resulted in a net decrease in the ensuing fibrosis observed at later stages after the bleomycin challenge. Histopathological analysis of lung tissue confirmed decreased leukocyte infiltration in the lung (Fig 5c), which was corroborated by a decrease in the number of CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> lymphocytes and GR1<sup>+</sup> leukocytes in the bronchoalveolar lavage fluid of mice challenged with bleomycin. In bleomycin-instilled mice which did not receive Evasin-1, there was a considerable deterioration of normal pulmonary architecture with loss of alveolar structure and collagen deposition (Fig 5c). Treatment with Evasin-1 resulted in the preservation of lung architecture and a decrease in collagen

deposition. Morphometric analysis of Gomori's trichrome stained areas showed that Evasin-1 treatment reduced collagen deposition by 40%.

Evasin-3 has also been shown to have potent anti-inflammatory properties. In accordance with the nanomolar affinities observed by SPR analysis (Table 1), Evasin-3 produced in HEK293 cells and in *E. coli*, inhibited binding of <sup>125</sup>I-CXCL8 to CXCR1 with IC<sub>50</sub> values of 0.7 nM and 1 nM respectively (Fig 6a), demonstrating that glycosylation does not affect activity similar to Evasin-1<sup>12</sup>. CXCL8 induced chemotaxis of neutrophils *in vitro* was inhibited by Evasin-3 with an IC<sub>50</sub> of 3.35 nM (Fig 6b). *In vivo*, Evasin-3 inhibited KC induced neutrophil recruitment into the knee joint in a dose dependent manner (Fig 6c). Evasin-3 was highly potent *in vivo*, with significant inhibition after systemic administration of as little as 10 ng of protein.

Evasin-3 was also tested in a mouse model of antigen-induced arthritis. In this model rapid upregulation of KC and MIP-2 precedes the recruitment of neutrophils into the knee joint. This is followed by CXCR2 upregulation and TNF- $\alpha$  production, culminating in synovial hyperplasia and inflammatory hypernociception<sup>16</sup>. Administration of Evasin-3 resulted in a 50 % decrease in the total number of leukocytes in the synovial cavity (Fig 6d). The major leukocyte population affected were neutrophils which were reduced by 70% in the knee joint (Fig 6e). Moreover, Evasin-3 treatment significantly reduced the inflammatory hypernociception associated with this model (Fig 6f), and interestingly, the treatment resulted in decreased local production of TNF- $\alpha$  (Fig 6g). Intravital microscopy studies of the synovial microvasculature showed that administration of Evasin-3 prevented the adhesion of leukocytes to the synovial endothelium (Fig 6h), providing a direct demonstration of the efficacy of Evasin-3 in the prevention of neutrophil influx in an inflammatory setting. Consistent with the findings above, histo-pathological analysis of tissue demonstrated overall inhibition of leukocyte influx into the joint and periarticular tissues, decreased edema, and decreased synovial hyperplasia (Fig 6i and 6j).

## Discussion

Since the identification of the first members of chemokine family almost 20 years ago, it has become clear that the interaction of these small proteins with their cognate receptors are important targets for therapeutic intervention in a number of inflammatory, autoimmune and infectious diseases. Indeed, there are currently many intense drug discovery programs

in this area. However, although there are numerous reports of the efficacy of small molecule antagonists<sup>17-19</sup>, neutralizing antibodies<sup>20;21</sup> and other antagonists<sup>22</sup> in animal models of disease, it has proved to be more of a challenge to translate these molecules into medicines in the clinic. Although molecules are currently progressing into late stage clinical trials, it is possible that alternative approaches may be needed to successfully target the chemokine-chemokine receptor interaction. Through evolution, natural anti-chemokine strategies have arisen in the guise of chemokine binding proteins, which enable certain pathogens to avoid the host immune response, thus confirming that the blockade of the chemokine system is an effective anti-inflammatory strategy. Unraveling the molecular nature of these pathogen associated CHBPs, is likely to produce novel insights in the design of therapeutically useful chemokine blocking agents.

Here we describe the cloning and characterization of a family of chemokine binding proteins from tick saliva. *In vitro* characterization of the family members identified to date indicates that these CHBPs are considerably different from the known viral chemokine binding proteins in terms of chemokine selectivity. Viral CHBPs tend towards broad selectivity; the Evasins described here have restricted selectivity. In the studies presented here we have confirmed that Evasins are able to bind and inhibit specific chemokines *in vitro*, and inhibit leukocyte recruitment induced by their respective ligands in simple models of leukocyte recruitment in mice. Furthermore, the anti-inflammatory properties of Evasins were confirmed mechanistically by intra-vital microscopy where their administration both in naïve and inflamed mice abrogated leukocyte adhesion to, and transmigration across the endothelium. Altogether, these experiments clearly demonstrated the potential of Evasins to prevent leukocyte recruitment.

We evaluated the Evasins in more complex animal models of human diseases. Evasin-1 which is highly selective for CCL3 and CCL4, reduced the symptoms, in a murine model of skin inflammation which resembles psoriasis in humans, in which several CC chemokines are upregulated<sup>14</sup>. Since both Evasin-1 and Evasin-3 were shown to prevent neutrophil influx, they were subsequently tested in disease models in which neutrophils have previously been shown to play an important role. Thus in the CCL3 dependent bleomycin-induced lung injury, Evasin-1 reduced leukocyte influx, fibrosis and lethality, an effect qualitatively and quantitatively similar to experiments in CCL3-deficient mice (<sup>15 23</sup>). Blockade of CXCR2 has been reported to prevent leukocyte influx and joint damage in several models of experimental

arthritis in rats and mice (Barsante et al., 2007; Cunha et al., 2007). Evasin-3 which binds to both human and murine CXCR2 ligands prevented neutrophil influx into the joint in a model of antigen-induced arthritis. This treatment prevented the local production of TNF- $\alpha$ , a cytokine which has been shown to play an important role in the pathogenesis of arthritis, and which is associated with hypernociception or inflammatory pain in experimental animals. Indeed, blockade of TNF- $\alpha$  with biologicals has been successful in the treatment of rheumatoid arthritis and other rheumatologic conditions <sup>24;25</sup>.

Our initial expectation was that identification of CHBPs in primitive eukaryotic species such as ticks may allow us to identify orthologues in mammalian genomes, based on either primary sequence or on the three dimensional folds of the CHBPs. However it is clear that there are no human or mammalian orthologues or structural counterparts to the Evasins. Thus it appears that ticks have developed protective CKBPs as they co-evolved with their chemokine producing vertebrate hosts. Although mammals do have molecules that can bind and block chemokine function, they are molecularly and structurally distinct from the Evasins. For example, the atypical chemokine receptors such as D6, CCX-CKR and Duffy <sup>26;27</sup> are non-signalling GPCRs that appear to be able to function as mammalian equivalents of the soluble CKBPs expressed by pathogens and parasitic worms. This suggests that interestingly, with the exception of the CMV US28 which has been hijacked from the mammalian genome, pathogens have evolved CKBPs through a 'convergent' evolution mechanism. This makes particular sense in the context of eukaryotic parasites, such as the ticks, which evolved prior to vertebrates in which chemokine dependent inflammation first appeared.

The leukocytes involved in the first line of defense against pathogens and parasites are neutrophils and eosinophils. The CHBPs described here specifically inhibit the chemokines that recruit these cell types; Evasin-1 (in rodents) and Evasin-3 prevent neutrophil accumulation, and preliminary results indicate that Evasin-4 binds the eosinophil recruiting chemokines, CCL5 and CCL11. Moreover, their selectivity profiles highlight the issue of species specificity in the chemokine system. The common brown dog tick feeds on dogs and other domestic animals as well as rodents, deer and humans. We have carried out our studies using human chemokines, and in some cases their murine counterparts, and have shown that the Evasins are able to bind to chemokines in both species. This may be an advantage in the development of these molecules as potential therapeutic agents as one of

10

the pitfalls in developing small molecule antagonists of human chemokine receptors has been their lack of cross-reactivity with rodent chemokine receptors, which has hampered testing in animal models of disease, PK/PD and toxicological studies. However results obtained from *in vivo* testing of Evasins still needs to be interpreted with caution as there are known differences in specific chemokine receptor expression on immune cells between the human and murine system, particularly on neutrophils. In humans, the principal mediators of neutrophil recruitment are CXC chemokines 1-8, acting through CXCR2, and CXCL8 which acts on both CXCR1 and CXCR2. On the contrary, recruitment of murine neutrophils is mediated by both CCR1 and CXCR2, and perhaps also the recently identified murine CXCR1<sup>28</sup> although little is known about the role of the latter *in vivo*. However, CCR1 is not normally expressed on human neutrophils although it can be induced by IFN $\gamma$ <sup>29</sup> and interestingly CCL3 has been shown to recruit neutrophils when injected into human skin<sup>30</sup>. Thus Evasin-1 shows activity against CCL3 mediated neutrophil recruitment rather than monocyte recruitment in the mouse, whereas the ability of Evasin-3 to recruit neutrophils is predictable from its binding profile. It should also be noted that whilst Evasin-1 has a higher affinity for its ligands than Evasin-3, the latter is more efficacious in the murine models we have tested. Saliva from ticks harvested at different times during their feeding periods has differential chemokine inhibitory activity suggesting that different chemokine binding proteins are produced at different times during feeding, with the aim of selectively inhibiting specific cell populations<sup>31</sup>. It is possible that the most potent inhibitor of neutrophil recruitment produced by the tick is Evasin-3, whereas Evasin-1 may be produced to inhibit (later) monocyte recruitment in non-rodent hosts as well as T lymphocytes, as was observed in the bleomycin lung inflammation model. Unfortunately the expression profile of chemokine receptors on leukocytes in the dog, which although its name implies is the preferred host, may simply be the most easily available food source, is unknown and hence we cannot substantiate this hypothesis. Lastly, the availability of recombinant Evasin-4 will enable us to address the ability of this CHBP to modulate eosinophil trafficking, since both CCL5 and CCL11 have been extensively described to recruit this cell type.

A striking feature of these proteins is their small size. Both viral and mammalian chemokine and cytokine binding proteins, have been shown to be much larger, generally around 30-40 kDa. On the other hand, *R. sanguineus* has developed very small, highly selective CHBPs. Interestingly, these proteins are similar in size, if not smaller, than the



naturally occurring single chain antibodies such as shark V-NAR domains (15 kDa) or camelid VhH domains (15kDa). Large efforts are currently being undertaken to produce small proteins known as nanobodies, minibodies or microproteins, created by rational design *in silico*, that will mimic the binding properties of natural single domain antibodies<sup>32</sup>. The two proteins described here represent highly potent, miniaturized scaffolds that have evolved to selectively bind certain proteins, pivotal to the immune response, and which could be useful in the creation of new scaffolds, paving the way for development of these molecules as novel anti-inflammatory agents.

One of the important issues surrounding the use of any protein as a potential therapeutic agent concerns immunogenicity which could be particularly pertinent for non-human proteins. There are already examples of xeno-proteins in the clinic<sup>4 33</sup> and others are entering clinical trials. However as these proteins are generally administered in a single dose for acute indications, potential immunogenicity is not a major concern. However, treatment of inflammatory and autoimmune diseases with therapeutic proteins such as interferon beta or antibodies eg. Raptiva and Etanercept, requires chronic administration, and even fully human proteins can elicit an antibody response which may reduce the efficacy of the treatment. By their very nature, anti-inflammatory proteins in tick saliva do not appear to be immunogenic. It is still unclear if this is entirely due to the inhibition of immune cell recruitment to the attachment site, or indeed whether the protein structure itself or through glycosylation, minimizes exposure of antigenic epitopes. Furthermore, bioinformatic analysis of T cell epitopes on Evasins using software developed by Biovation (EMD Serono) revealed that the tick Evasins have relatively few potential immunogenic epitopes compared to other therapeutic proteins currently in the clinic such as interferon beta. It is interesting to note that only one mouse out of the 6 treated for 25 days had an IgG response to Evasin-1 (results not shown). So whilst immunogenicity in the murine system will not predict the outcome in humans, further evaluation of Evasins in pre-clinical models is warranted for their development as potential protein therapeutic agents.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank M. de Tiani, S. Jaconi, F. Borlat, V. Dechavanne, L. Glez, L. Friedli, F. Bollin, C. Losberger and L. Chevalet for advice in protein expression and purification, and the European Union FP6 (INNOCHEM, grant number LSHB-CT-2005-518167) for support.

## **Methods**

### **Biochemical analysis of anti-chemokine activity in saliva.**

Collection of saliva from the tick *R. sanguineus* and analysis for chemokine binding proteins by inhibition of receptor binding and SPR was performed as previously described<sup>12</sup> with the following modifications. For the screening of tick saliva by SPR, an RNaseA-coated cell was used as negative control instead of a blank cell. In addition, 3 successive injections of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing 2% heat-inactivated fetal calf serum were performed, followed immediately by regeneration of the surface prior to the measurements, to remove non-covalently bound protein. Tick saliva was diluted 25-fold and/or 10-fold in 25 mM degassed Tris-HCl buffer, pH 7.5, supplemented with 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub> and 1 g/l bovine serum albumin for 2.5 min at 10 µl/min. Measurements were made in duplicate, and between each measurement, the surfaces were regenerated by injecting of 10 mM glycine-HCl, pH 2.5, at 20 µl/min for 30 s and re-equilibrated in HBS-P buffer for 1 min at 20 µl/min. The sensograms were analyzed using Biacore®3000 evaluation software and represent binding of diluted tick saliva to CCL5(E66A) or to CCL3 after subtraction of non-specific binding to the control protein RNase A, and normalization to the buffer-induced diffraction.

Direct visualization of the binding proteins by chemical cross-linking was performed as previously described<sup>12</sup> and by Retentate chromatography surface-enhanced laser desorption/ionisation mass spectrometry (RC-SELDI-TOF-MS). The chemokines CCL5, CCL3, and CXCL8 or the control protein, equine myoglobin, were diluted to 0.1 µg/µl in PBS and immobilized at 4 °C in a humidified chamber overnight, by applying 5 µl onto separate spots of a PS-20 ProteinChip™ array (CIPHERGEN Biosystems Inc., Fremont, CA). Non-specific binding sites were blocked by addition 1 µl of 1 M Tris pH 8 to the samples and incubating in a humidified chamber at room temperature for 30 min. Unbound protein was removed by washing the array three times with 7 ml PBS, pH 7.2, containing 1 % Triton X-

13

100. The spots were equilibrated for 5 min in 25 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, containing 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mg/ml BSA, supplemented with 0.1% Triton X-100. Tick saliva was diluted 5-fold in the same buffer and 5 µl was applied to each spot. The array was incubated for 2 h at room temperature and then each spot was washed individually 3 times with 5 µl of ice-cold buffer supplemented with 0.05% Triton X-100. The array was rinsed in 5 mM HEPES pH 7.5 and air-dried. The matrix, sinapinic acid, was dried onto each spot on the array and mass analysis was performed by SELDI-TOF-MS, using a calibrated ProteinChip™ Biology System IIc reader. Spectra were generated using an automated protocol and a positive ion mode with a laser intensity of 220 and deflector sensitivity of 10. The mass optimization range was set between 10 and 50 kDa with a mass focus set to 18 kDa. In order to obtain quantitative data, the mass spectra from each spot were accumulated from 155 laser shots over 31 different and non-overlapping positions.

### **Molecular cloning**

Expression cloning was performed by transient transfection of HEK293 cells with a cDNA library constructed from the salivary glands of *R.sanguineus* as previously described<sup>12</sup>. Supernatants from transfected cells were screened using two cocktails of radio-labelled [<sup>125</sup>I] chemokines and cytokines containing CXCL8, IL-1 and IL-2, or CCL5, CCL11 and CXCL10 respectively followed by cross-linking and analysis by SDS-PAGE. Following deconvolution of the cDNA pools and sequencing of the positive clones, a C terminal 6His tagged version of the cDNA encoding the relevant CHBP was subcloned into the mammalian cell expression vector pEAK12d (Edge Biosystems) using the Gateway™ cloning system (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for transient expression in HEK293 cells. Purification of the CHBP from supernatants from 500 ml cultures was performed by Ni-chelate chromatography. The cDNA encoding Evasin-3 was subcloned into the pET30a vector (Novagen) for expression in *E. coli* strain BL21(DE3) under the control of a T7 promoter, and produced in a 5 litre fermenter. The protein was purified from the soluble cytosolic fraction by cation exchange chromatography on Fractogel SO<sub>3</sub> in 50 mM sodium acetate, pH 4.5 with a linear gradient of 0 - 0.7 M NaCl, using an Äkta purifier system, followed by size exclusion chromatography on an SX75 16/60 column in PBS, after concentration with a centrifugal 3.5 kDa cut-off filter device. The purified protein was dialyzed against 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, aliquoted, lyophilized, and stored at -20 °C.

### ***In vitro* characterization**

The selectivity of Evasin-3 was determined by surface plasmon resonance (SPR) as described<sup>12</sup>. Kinetic measurements were performed to determine the binding constants. The kinetic values  $k_a$  and  $k_d$  shown in Table 1 are the mean of three independent experiments performed in triplicate on three different chips. The affinity constant  $K_D$  was calculated from these mean values. Equilibrium competition receptor binding assays were performed using CHO/CXCR1 transfectants using  $^{125}\text{I}$ -CXCL8 as described<sup>(34)</sup>. Inhibition of chemotaxis *in vitro* was measured using L1.2/CCR5 transfectants for Evasin-1 or neutrophils purified from buffy coats as previously described<sup>(35)</sup>.

### **Inhibition of cell recruitment *in vivo***

Male Balb/C or C57Bl/6 mice (18-22 g) were used throughout these experiments. Animals were housed in a temperature-controlled room and had free access to food and water. All experiments received prior approval by the local animal ethics committee. To test the effect of Evasin-1 on cellular recruitment *in vivo*, mice were administered 3, 10 or 30  $\mu\text{g}$  Evasin-1 in 200  $\mu\text{l}$  PBS s.c. 45 min prior to the administration of 10  $\mu\text{g}$  CCL3 in 200  $\mu\text{l}$  PBS i.p. After 18 h, the mice were sacrificed. The peritoneal cavity was washed twice with 3 ml of ice-cold PBS, and the cells enumerated in a modified Neubauer counting chamber using Turk's stain. Differential cell counts were performed on cytospin preparations (Shandon III) stained with May Grunwald-Giemsa using standard morphologic criteria to identify cell types.

The effect of Evasin-3 on neutrophil recruitment into the knee joint was assayed as follows: KC (30 ng/cavity) was injected into the left knee joint of the mouse and recruitment evaluated 4 h later. Evasin-3 (0.01 to 100  $\mu\text{g}$ /mouse) was given s.c. 45 min prior to KC administration. The knee cavity was washed with PBS (2 x 5 $\mu\text{l}$ ) and leukocyte numbers assessed as described above.

Intravital microscopy was performed in the cremaster of C57Bl/6 mice, as previously described<sup>36</sup>. For each experiment, 0.3  $\mu\text{g}$  of human CCL3 in 100  $\mu\text{L}$  of PBS was administered locally by s.c. injection beneath the right scrotal skin, 1 h before exteriorization. To test inhibition, a solution of Evasin-1 (10  $\mu\text{g}$  per animal) plus CCL3 (0.3  $\mu\text{g}$ ) in 100  $\mu\text{l}$  PBS was prepared 15 min before intrascrotal injection. Single, unbranched cremasteric venules (25–40  $\mu\text{m}$  in diameter) were selected. To minimize variability, the same section of

cremasteric venule was observed throughout the experiment. The number of rolling, adherent, and emigrated leukocytes was determined off-line during video playback analysis. Rolling leukocytes were defined as those cells moving at a velocity less than that of erythrocytes within a given vessel. The flux of rolling cells was measured as the number of rolling cells passing by a given point in the venule, per minute. A leukocyte was considered to be adherent if it remained stationary for at least 30 s. Total leukocyte adhesion was quantified as the number of adherent cells within a 100  $\mu\text{m}$  length of venule. Leukocyte emigration was defined as the number of cells in the extravascular space within an area of 50  $\mu\text{m}$  from the venule.

### **Methylated BSA-induced DTH reaction in pleural cavity**

C57Bl/6 mice were immunized subcutaneously with a 1:1 emulsion of mBSA (5mg/mL in saline) and complete Freund's adjuvant (Sigma), as previously described<sup>37</sup>. Fourteen days after the immunization, antigen (mBSA 10  $\mu\text{g}$  per pleural cavity), or vehicle, was injected into the pleural cavity. Animals sacrificed 48 h after injection of antigen, and cells present in the pleural cavity were harvested. Cells were enumerated as described above. The results are presented as the number of cells per cavity.

### **Sensitization and induction of Th2 cellular recruitment into the lungs**

Balb/c mice were immunized i.p. with 2500 isolated *S. mansoni* eggs at days 0 and 7 of the protocol, as described previously<sup>38</sup>. On day 14, mice were given an intranasal challenge of 10  $\mu\text{g}$  soluble egg antigens (SEA) in 10  $\mu\text{l}$  of PBS to localize the response to the airway. Mice were then rechallenged 6 days later by intratracheal administration of 10  $\mu\text{g}$  SEA in 25  $\mu\text{l}$  of PBS or with PBS alone. To test inhibition, Evasin-1 (10  $\mu\text{g}$  per animal) was administered s.c. 45 min before, and 24 h after antigen challenge. At 24 or 48 h post injection, mice were sacrificed, and lungs were filled *in situ* with 1 ml of sterile PBS via a tracheal cannula. Fluid was withdrawn from the lungs after gentle massage to remove cells and collected in a plastic tube, on ice. This procedure was repeated three times, and the cell suspensions recovered from each animal were pooled for individual mice. The results are presented as the number of cells per lung.

Induction of skin inflammation in D6 <sup>-/-</sup> mice

Skin inflammation was induced as previously described <sup>14</sup>. Briefly, the phorbol ester, TPA, was applied three times, at 24 h intervals, to the shaved dorsal skin of 6-8 week old D6 <sup>(-/-)</sup> mice and the mice were left for 4 days to allow the exaggerated cutaneous inflammation to develop. In addition, mice were administered either PBS or Evasin-1 daily (30 µg/mouse per day) by i.p. injection or were given daily doses of anti-TNF as previously described. Mice were sacrificed at day 4 after TPA treatment and the skin harvested for histological assessment. Skin samples were collected into neutral-buffered formalin and processed for H&E staining as described.

### **Bleomycin-Induced Lung Injury**

Blenoxane, (Bristol-Meyers Squibb Co., Princeton, New Jersey, USA) 0.0625U or 0.125 U in 25 µl PBS was instilled under anesthesia into the trachea of C57Bl/6j mice. Control animals received PBS alone. The tracheotomy site was sutured, and the animals were allowed to recover. To test inhibition, Evasin-1 (3 or 10 µg per animal) was administered s.c. 45 min before, and every 12 h after bleomycin instillation. At 4, 8 or 25 days after instillation, mice were sacrificed and lungs were filled *in situ* with 1 ml of sterile PBS via a tracheal cannula. Fluid was withdrawn from the lungs after gentle massage to remove cells, and collected into a plastic tube place on ice. This procedure was repeated three times, and the cell suspensions recovered from each animal were pooled for individual mice. Right lung lobes were collected and inflated with 10% formaldehyde for histological analysis of tissue sections stained with H&E. For localization of collagen within the lung tissues, Gomori's trichrome-specific staining was used. Cell counts were performed as described above. The results are presented as the number of cells per lung.

### **Antigen-induced arthritis**

Animals were immunized intradermally (i.d.) at the base of the tail with 500 µg of methylated bovine serum albumin (mBSA; Sigma) in 100 µl of an emulsion of saline and an equal volume of complete Freund's adjuvant (CFA; Sigma) on day 0 as described <sup>39</sup>. Challenge of mice was performed 14 days later. Each mouse received an injection of 10 µg of mBSA in 10µl sterile saline in the left knee joint. The knee cavity was washed 24 h later with PBS (2 x

5  $\mu$ l) and the periarticular tissues removed for the evaluation of TNF- $\alpha$  and MPO activity. Cells were enumerated as described above.

#### Intravital microscopy of knee joint

Intravital microscopy was performed in the synovial microcirculation of the mouse knee as previously described<sup>40</sup>. Briefly, the left hind limb was placed on a stage with the knee slightly flexed and the patellar tendon mobilized and partly resected. The intra-articular synovial tissue of the knee joint was then visualized and used for the determination of leukocyte rolling and adhesion. A 20X objective was used to select 2-4 regions of interest in each animal. To measure the leukocyte-endothelial cell interactions, the fluorescent marker rhodamine 6G (Sigma) was injected intravenously in a single bolus of 0.15 mg/kg immediately before measurements. Rhodamine epi-illumination was achieved with a 150 W variable HBO mercury lamp in conjunction with Zeiss filter set 15 (BP 546./12, FT 580, LP 590). The microscopic images were captured with a with an Optronics DEI470 CCD video camera (Goleta, CA) and recorded on S-VHS videotape using both filter blocks consecutively. Data analysis was performed off-line. Rolling leukocytes were defined as those cells moving slower than those cells at a regular flux in a given vessel. The flux of rolling cells was measured as the number of rolling cells passing by a given point in the venule per minute (expressed as cells/min). A leukocyte was considered to be adherent if it remained stationary for at least 30 seconds. Total leukocyte adhesion was quantified as the number of adherent cells within a 100  $\mu$ m length of venule (expressed as cells/mm<sup>2</sup>).

#### **Evaluation of hypernociception**

Mice were placed in a quiet room, 15–30 min before testing for environmental adaptation, in acrylic cages (12  $\times$  10  $\times$  17 cm high) with a wire grid floor. Stimulations were performed only when animals were calm, without exploratory movements or defecation and not resting on their paws. An electronic pressure-meter was used in these experiments consisting of a hand-held force transducer fitted with a polypropylene tip (Insight Instruments, Ribeirão Preto, SP, Brazil). In these experiments, a large tip (4.15 mm<sup>2</sup>) was attached to the probe. An increasing perpendicular force was applied to the central area of the plantar surface of the hind paw to induce the dorsal flexion of the femur-tibial joint, followed by paw withdrawal. A

tilted mirror below the grid provided a clear view of the animal's hind paw. The electronic pressure-meter apparatus automatically recorded the intensity of the force applied when the paw was withdrawn. The test was repeated until 3 subsequent consistent measurements (i.e. the variation among these measurements was less than 1 g). The flexion-elicited withdrawal threshold is expressed in grams (g).

#### Histological assessment

Sections were graded as previously described <sup>41</sup>. Briefly, the histological score (0-8) was the sum of the synovial hyperplasia, cellular exudate and cartilage depletion/bone erosion ranging from 0 (normal) to 3 (severe), and the degree of synovial infiltrate ranging from 0 (normal) to 5 (severe).

#### Statistical analysis

All results are presented as the means  $\pm$  SEM. Normalized data were analyzed by one-way ANOVA, and differences between groups were assessed using Student-Newman-Keuls post-test. A *p* value < 0.05 was considered to be significant.

#### References

1. Alcami,A. Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 36-50 (2003).
2. McFadden,G., Lalani,A., Everett,H., Nash,P., & Xu,X. Virus-encoded receptors for cytokines and chemokines [Review]. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **9**, 359-368 (1998).
3. Fallon,P.G. & Alcami,A. Pathogen-derived immunomodulatory molecules: future immunotherapeutics? *Trends Immunol.* **27**, 470-476 (2006).
4. Hovius,J.W., van Dam,A.P., & Fikrig,E. Tick-host-pathogen interactions in Lyme borreliosis. *Trends Parasitol.* **23**, 434-438 (2007).
5. Ribeiro,J.M. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect. Agents Dis.* **4**, 143-152 (1995).



6. Ribeiro, J.M., Makoul, G.T., Levine, J., Robinson, D.R., & Spielman, A. Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. *J. Exp. Med.* **161**, 332-344 (1985).
7. Brossard, M. & Wikel, S.K. Tick immunobiology. *Parasitology* **129 Suppl**, S161-S176 (2004).
8. Smith, P., Fallon, R.E., Mangan, N.E., Walsh, C.M., Saraiva, M., Sayers, J.R., McKenzie, A.N., Alcami, A., & Fallon, P.G. *Schistosoma mansoni* secretes a chemokine binding protein with antiinflammatory activity. *J. Exp. Med.* **202**, 1319-1325 (2005).
9. Lalani, A.S., Masters, J., Graham, K., Liu, L.Y., Lucas, A., & McFadden, G. Role of the myxoma virus soluble CC-chemokine inhibitor glycoprotein, M-T1, during myxoma virus pathogenesis. *Virology* **256**, 233-245 (1999).
10. Hajnicka, V., Kocakova, P., Slavikova, M., Slovak, M., Gasperik, J., Fuchsberger, N., & Nuttall, P.A. Anti-interleukin-8 activity of tick salivary gland extracts. *Parasite Immunol.* **23**, 483-489 (2001).
11. Hajnicka, V., Vancova, I., Kocakova, P., Slovak, M., Gasperik, J., Slavikova, M., Hails, R.S., Labuda, M., & Nuttall, P.A. Manipulation of host cytokine network by ticks: a potential gateway for pathogen transmission. *Parasitology* **130**, 333-342 (2005).
12. Frauenschuh, A., Power, C.A., Deruaz, M., Ferreira, B.R., Silva, J.S., Teixeira, M.M., Dias, J.M., Martin, T., Wells, T.N., & Proudfoot, A.E. Molecular cloning and characterization of a highly selective chemokine-binding protein from the tick *Rhipicephalus sanguineus*. *J. Biol. Chem.* **282**, 27250-27258 (2007).
13. Wilkinson, D.L. & Harrison, R.G. Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N. Y.)* **9**, 443-448 (1991).
14. Jamieson, T., Cook, D.N., Nibbs, R.J., Rot, A., Nixon, C., McLean, P., Alcami, A., Lira, S.A., Wiekowski, M., & Graham, G.J. The chemokine receptor D6 limits the inflammatory response in vivo. *Nat. Immunol.* **6**, 403-411 (2005).
15. Smith, R.E., Strieter, R.M., Phan, S.H., Lukacs, N.W., Huffnagle, G.B., Wilke, C.A., Burdick, M.D., Lincoln, P., Evanoff, H., & Kunkel, S.L. Production and function of murine macrophage inflammatory protein-1 alpha in bleomycin-induced lung injury. *J. Immunol.* **153**, 4704-4712 (1994).

16. Grespan,R., Fukada,S.Y., Lemos,H.P., Vieira,S.M., Napimoga,M.H., Teixeira,M.M., Fraser,A.R., Liew,F.L., McInnes,I.B., & Cunha,F.D. *Arthritis & Rheumatism In press*, (2007).
17. Liang,M., Mallari,C., Rosser,M., Ng,H.P., May,K., Monahan,S., Bauman,J.G., Islam,I., Ghannam,A., Buckman,B., Shaw,K., Wei,G.P., Xu,W., Zhao,Z., Ho,E., Shen,J., Oanh,H., Subramanyam,B., Vergona,R., Taub,D., Dunning,L., Harvey,S., Snider,R.M., Hesselgesser,J., Morrissey,M.M., & Perez,H.D. Identification and characterization of a potent, selective, and orally active antagonist of the CC chemokine receptor-1. *J. Biol Chem* **275**, 19000-19008 (2000).
18. Anders,H.J., Vielhauer,V., Frink,M., Linde,Y., Cohen,C.D., Blattner,S.M., Kretzler,M., Strutz,F., Mack,M., Grone,H.J., Onuffer,J., Horuk,R., Nelson, PJ, & Schlondorff,D. A chemokine receptor CCR-1 antagonist reduces renal fibrosis after unilateral ureter ligation. *J. Clin. Invest.* **109**, 251-259 (2002).
19. Brodmerkel,C.M., Huber,R., Covington,M., Diamond,S., Hall,L., Collins,R., Leffet,L., Gallagher,K., Feldman,P., Collier,P., Stow,M., Gu,X., Baribaud,F., Shin,N., Thomas,B., Burn,T., Hollis,G., Yeleswaram,S., Solomon,K., Friedman,S., Wang,A., Xue,C.B., Newton,R.C., Scherle,P., & Vaddi,K. Discovery and pharmacological characterization of a novel rodent-active CCR2 antagonist, INCB3344. *J. Immunol.* **175**, 5370-5378 (2005).
20. Kennedy,K.J., Strieter,R.M., Kunkel,S.L., Lukacs,N.W., & Karpus,W.J. Acute and relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis are regulated by differential expression of the CC chemokines macrophage inflammatory protein-1 alpha and monocyte chemoattractant protein-1. *J. Neuroimmunol.* **92**, 98-108 (1998).
21. Lloyd,C.M., Dorf,M.E., Proudfoot,A., Salant,D.J., & Gutierrez-Ramos,J.C. Role of MCP-1 and RANTES in inflammation and progression to fibrosis during murine crescentic nephritis. *J. Leukoc. Biol* **62**, 676-680 (1997).
22. Proudfoot,A.E. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 106-115 (2002).
23. Ishida,Y., Kimura,A., Kondo,T., Hayashi,T., Ueno,M., Takakura,N., Matsushima,K., & Mukaida,N. Essential roles of the CC chemokine ligand 3-CC chemokine receptor 5 axis in bleomycin-induced pulmonary fibrosis through regulation of macrophage and fibrocyte infiltration. *Am. J. Pathol.* **170**, 843-854 (2007).

24. Vilcek, J. & Feldmann, M. Historical review: Cytokines as therapeutics and targets of therapeutics. *Trends Pharmacol. Sci.* **25**, 201-209 (2004).
25. Tarner, I.H., Muller-Ladner, U., & Gay, S. Emerging targets of biologic therapies for rheumatoid arthritis. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* **3**, 336-345 (2007).
26. Nibbs, R., Graham, G., & Rot, A. Chemokines on the move: control by the chemokine "interceptors" Duffy blood group antigen and D6. *Semin. Immunol.* **15**, 287-294 (2003).
27. Hansell, C.A., Simpson, C.V., & Nibbs, R.J. Chemokine sequestration by atypical chemokine receptors. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 1009-1013 (2006).
28. Fan, X., Patera, A.C., Pong-Kennedy, A., Deno, G., Gonsiorek, W., Manfra, D.J., Vassileva, G., Zeng, M., Jackson, C., Sullivan, L., Sharif-Rodriguez, W., Opdenakker, G., van Damme, J., Hedrick, J.A., Lundell, D., Lira, S.A., & Hipkin, R.W. Murine CXCR1 is a functional receptor for GCP-2/CXCL6 and interleukin-8/CXCL8. *J. Biol. Chem.* **282**, 11658-11666 (2007).
29. Bonecchi, R., Polentarutti, N., Luini, W., Borsatti, A., Bernasconi, S., Locati, M., Power, C.A., Proudfoot, A.E.I., Wells, T.N.C., Mackay, C., Mantovani, A., & Sozzani, S. Up-regulation of CCR1 and CCR3 and induction of chemotaxis to CC chemokines by IFN-gamma in human neutrophils. *J. Immunol.* **162**, 474-479 (1999).
30. Lee, S.C., Brummet, M.E., Shahabuddin, S., Woodworth, T.G., Georas, S.N., Leiferman, K.M., Gilman, S.C., Stellato, C., Gladue, R.P., Schleimer, R.P., & Beck, L.A. Cutaneous injection of human subjects with macrophage inflammatory protein-1 alpha induces significant recruitment of neutrophils and monocytes. *J. Immunol.* **164**, 3392-3401 (2000).
31. Vancova, I., Slovak, M., Hajnicka, V., Labuda, M., Simo, L., Peterkova, K., Hails, R.S., & Nuttall, P.A. Differential anti-chemokine activity of *Amblyomma variegatum* adult ticks during blood-feeding. *Parasite Immunol.* **29**, 169-177 (2007).
32. Holliger, P. & Hudson, P.J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1126-1136 (2005).
33. Barnett, A. Exenatide. *Expert. Opin. Pharmacother.* **8**, 2593-2608 (2007).
34. van Riper, G., Nicholson, D.W., Scheid, M.P., Fischer, P.A., Springer, M.S., & Rosen, H. Induction, characterization, and functional coupling of the high affinity chemokine

receptor for RANTES and macrophage inflammatory protein-1 alpha upon differentiation of an eosinophilic HL-60 cell line. *J. Immunol.* **152**, 4055-4061 (1994).

35. Proudfoot,A.E., Handel,T.M., Johnson,Z., Lau,E.K., LiWang,P., Clark-Lewis,I., Borlat,F., Wells,T.N., & Kosco-Vilbois,M.H. Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 1885-1890 (2003).

36. Cara,D.C. & Kubes,P. Intravital microscopy as a tool for studying recruitment and chemotaxis. *Methods Mol. Biol.* **239**, 123-132 (2004).

37. Teixeira,M.M., Talvani,A., Tafuri,W.L., Lukacs,N.W., & Hellewell,P.G. Eosinophil recruitment into sites of delayed-type hypersensitivity reactions in mice. *J. Leukoc. Biol.* **69**, 353-360 (2001).

38. Lukacs,N.W., Standiford,T.J., Chensue,S.W., Kunkel,R.G., Strieter,R.M., & Kunkel,S.L. C-C chemokine-induced eosinophil chemotaxis during allergic airway inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **60**, 573-578 (1996).

39. Healy,A.M., Izmailova,E., Fitzgerald,M., Walker,R., Hattersley,M., Silva,M., Siebert,E., Terkelsen,J., Picarella,D., Pickard,M.D., LeClair,B., Chandra,S., & Jaffee,B. PKC-theta-deficient mice are protected from Th1-dependent antigen-induced arthritis. *J. Immunol.* **177**, 1886-1893 (2006).

40. Veihelmann,A., Szczesny,G., Nolte,D., Krombach,F., Refior,H.J., & Messmer,K. A novel model for the study of synovial microcirculation in the mouse knee joint in vivo. *Res. Exp. Med. (Berl)* **198**, 43-54 (1998).

41. Williams,A.S., Richards,P.J., Thomas,E., Carty,S., Nowell,M.A., Goodfellow,R.M., Dent,C.M., Williams,B.D., Jones,S.A., & Topley,N. Interferon-gamma protects against the development of structural damage in experimental arthritis by regulating polymorphonuclear neutrophil influx into diseased joints. *Arthritis Rheum.* **56**, 2244-2254 (2007).

Table 1. Binding characteristics of Evasin-1 and Evasin-3 determined by Surface Plasmon Resonance

CKBP	Chemokine	$k_a \times 10^6$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_d \times 10^{-3}$ ( $s^{-1}$ )	$K_D \times 10^{-9}$ (nM)
Evasin-1	CCL3	$13.8 \pm 3.54$	$2.43 \pm 0.61$	0.12
	mMIP-1 $\alpha$	$15.6 \pm 16$	$1.18 \pm 1.07$	0.08
	CCL4	$4.29 \pm 2.58$	$2.2 \pm 0.18$	0.51
	mMIP-1 $\beta$	$3.84 \pm 1.42$	$0.58 \pm 0.12$	0.15
Evasin-3 (HEK)	CXCL1	$3.95 \pm 4.23$	$1.42 \pm 0.36$	0.34
	CXCL8	$0.41 \pm 0.30$	$0.29 \pm 0.14$	0.7
	KC	$0.64 \pm 0.58$	$1.44 \pm 0.35$	2.25
	MIP-2	$0.79 \pm 0.9$	$0.33 \pm 0.11$	0.4
Evasin-3 ( <i>E.coli</i> )	CXCL1	$2.61 \pm 0.69$	$2.22 \pm 0.49$	0.85
	CXCL8	$0.84 \pm 0.33$	$0.36 \pm 0.05$	0.43
	KC	$0.32 \pm 0.17$	$1.85 \pm 0.43$	5.78
	MIP-2	$1.02 \pm 0.56$	$0.65 \pm 0.25$	0.64

## Figure legends:

### Fig.1. Chemokine binding activity of the tick saliva and identification of Evasin-3 and Evasin-4.

(a) Tick saliva inhibits the binding of CCL3, CCL5 and CXCL8 to their cognate receptors. Radio-labeled chemokines were incubated with CHO cell membranes expressing CCR1 for CCL3 and CCL5, and CXCR2 for CXCL8, in the presence of 1  $\mu$ l, 10  $\mu$ l or in the absence of tick saliva. The anti-chemokine activity is due to the presence of more than one binding protein since an excess of CXCL8 did not abolish the inhibition of CCL3 binding. (b) Detection of chemokine binding proteins in tick saliva by surface plasmon resonance. Sensograms demonstrated binding to CCL5(E66A) and CCL3 immobilized on a CM4 chip. (c) Detection of distinct chemokine binding proteins to CCL5 and CXCL8 by Retentate chromatography surface-enhanced laser desorption/ionization of flight mass spectrometry (RC-SELDI-TOF-MS). Tick saliva was incubated on a PS-20 Proteinchip array coated with either CCL5 (lower panel), CXCL8 (middle panel) or the control protein, equine myoglobin (upper panel). Specific peaks indicated by arrows corresponding to a protein with a mass of 11052 Da binding to CCL5 and of 7133 Da for the binding to CXCL8 were observed. (d) Identification of Evasin-3 and Evasin-4 by cross-linking to radio-labeled chemokine in conditioned medium harvested from HEK293 cells transfected with cDNAs identified from deconvoluted pools from the tick salivary gland cDNA library. Supernatant from HEK293 cells expressing viral CHBP p35 incubated with [ $^{125}$ I]-CCL2 in the presence (lane 1) or absence (lane 2) of the cross-linker BS<sub>3</sub>; supernatant from HEK293 cells expressing the clone 69.19.1 incubated with [ $^{125}$ I]-CXCL8 and BS<sub>3</sub> (lane 3); supernatant from HEK293 cells expressing the clone 10.27.1 incubated with [ $^{125}$ I]-CCL5 and BS<sub>3</sub> (lane 4) or [ $^{125}$ I]-CCL11 and BS<sub>3</sub> (lane 5). (e) Determination of the selectivity of recombinant Evasin-3 produced in *E.coli* by surface plasmon resonance. The selectivity of Evasin-3 immobilized on a CM4 chip was analysed as described in the text. Sensograms corresponding to CXCL8 (bold black lines) CXCL1 (dotted black lines), MIP-2 (grey lines) and KC (dotted grey lines) showed strong binding of these chemokines to Evasin-3. The sensograms corresponding to CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CCL18, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CCL27, CXCL13 and CX<sub>3</sub>CL1 (black lines) indicated no binding of these chemokines to Evasin-3.

**Fig.2. Primary amino acid sequences of Evasin-1, -3 and -4 and crystal structures of Evasin-1 and Evasin-3.** (a) Alignment of the predicted protein sequences of Evasin-1 and Evasin-4. Conserved residues are highlighted in grey and cysteines are shown in bold type, The predicted protein sequence of Evasin-3 which is unrelated to Evasin-3 and -4 is shown below the alignment. The signal peptides of Evasin-1 and Evasin-3 are shown in italics. Possible signal peptides of Evasin-4 are shown as follows: based on SignalJ prediction, black underline; based on secondary structure prediction, dotted underline; based on similarity to Evasin-1, dashed line. (b) Ribbon diagram of Evasin-1 with the amino acid sequence depicting residues in loops (green),  $\alpha$ -helix (red) or  $\beta$ -sheet (blue). (c) Ribbon diagram of Evasin-3 with the amino acid sequence colored as in (b).

**Fig.3. Evasin-1 and Evasin-3 inhibit cell recruitment *in vitro* and *in vivo*.** (a) Inhibition of CCL3 (●) and CCL4 (■) mediated chemotaxis of L1.2/CCR5 transfectants. The  $IC_{50}$  values are  $1.04 \times 10^{-12}$  M for CCL3 and  $4.12 \times 10^{-9}$  M for CCL4. Data are shown as the mean  $\pm$  s.d as a percentage of maximal recruitment and are representative of three to five individual experiments. (b) Evasin-1 inhibits granulocyte recruitment induced by CCL3 in mice. Evasin-1 was administered s.c. 45 min prior to the injection of 10  $\mu$ g of CCL3 i.p. Cells in the peritoneal cavity were counted 18 h after the injection of CCL3. One representative experiment of three is shown, with 8 mice per group. (c) Evasin-1 inhibits granulocyte recruitment induced by antigen challenge of immunized mice in models of Th1-predominant delayed type hypersensitivity and Th2-predominant late phase response. In the Th1 model, Evasin-1 was administered s.c. 45 min prior to intrapleural injection of 10  $\mu$ g of methylated bovine serum albumin (mBSA) in mice immunized with mBSA in Freund's complete adjuvant. Cells in the pleural cavity were counted 48 h after the injection of antigen. In the Th2 model, Evasin-1 was administered s.c. 45 min prior to the intra-tracheal injection of 10  $\mu$ g of *Schistosoma mansoni* egg antigen (SEA) in mice immunized with *S. mansoni* eggs. Cells in the bronchoalveolar lavage fluid were counted 48 h after the injection of antigen. There were 6 mice per group in each experiment. \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$  when compared to PBS-treated group. (d) Evasin-1 blocks adhesion and emigration of leukocytes induced by CCL3 as assessed by intravital microscopy performed in the cremaster vein of C57Bl/6 mice. Evasin-1 was injected s.c. in the right scrotal skin 1 h prior to exteriorization. Normalized data

were analyzed by one-way ANOVA, and differences between groups were assessed using Student-Newman-Keuls post-test. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

**Fig. 4. Evasin-1 inhibits cellular recruitment in models of Th1 and Th2 inflammation and in an animal model of psoriasis.**

(a) Dermal and epidermal thickness of the skin of wild-type (WT) and D6-deficient (KO) mice after a single cutaneous application of TPA. Evasin-1 (30  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ) and anti-TNF- $\alpha$  were given daily and tissues collected on day 4 for histological assessment. \*\*\*:  $p < 0.001$  when compared to PBS-treated group. (b) Hematoxylin and eosin staining of sections from untreated skin of sham and TPA-injected D6-deficient mice treated with PBS, Evasin-1 or anti-TNF- $\alpha$ . Skin sections were obtained on day 4 after TPA application and are representative of 10 mice per group per experiment. Original magnification, 200X.

**Fig. 5. Evasin-1 inhibits lethality, cellular recruitment and fibrosis in a model of bleomycin-induced pulmonary injury.**

(a) Evasin-1 inhibits lethality associated with pulmonary instillation of bleomycin in C57Bl/6 mice. Bleomycin was instilled intra-tracheally at doses of 0.0625 U (circles) or 0.125 U (squares) and survival rates were evaluated for 25 days. PBS (open symbols) or Evasin-1 (10  $\mu\text{g}$  per animal, closed symbols) were administered s.c. 45 min before and every 12 h after initial bleomycin instillation. \*  $p < 0.05$  when comparing PBS and Evasin-1-treated animals at 0.125 U. (b) Evasin-1 inhibits neutrophil recruitment induced by bleomycin. Neutrophil recruitment was evaluated at 2 and 8 days after bleomycin (0.125U) and Evasin-1 (10  $\mu\text{g}$  per animal) was administered s.c. 45 min before and every 12 h after initial bleomycin instillation. (c) Evasin-1 inhibits pulmonary inflammation and fibrosis induced by instillation of bleomycin. Hematoxylin and eosin (upper panels) and Gomori's trichrome (lower panels) stained sections from animals instilled with sodium chloride (0.9% NaCl, 25  $\mu\text{l}$ ) or bleomycin (0.125 U). Evasin-1 (10  $\mu\text{g}$  per animal) was administered as previously described and lungs were removed on day 16. Original magnification, 200X.

**Fig. 6. Evasin-3 inhibits neutrophil recruitment and ameliorates inflammation and functionality**

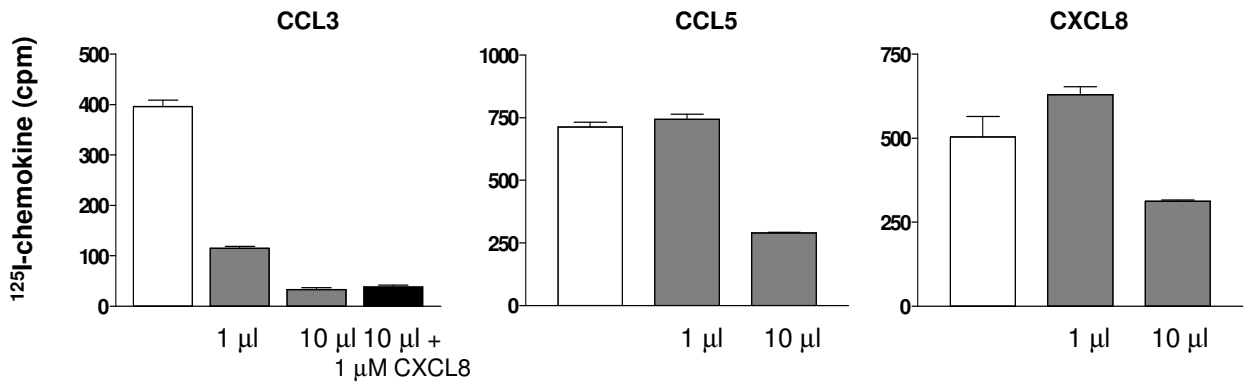
in a mouse model of antigen-induced arthritis. (a) Inhibition of  $^{125}\text{I}$ -CXCL8 binding to CXCR2 by Evasin-3 produced in HEK 293 cells (●) and by Evasin-3 produced in *E. coli* (■). (b)



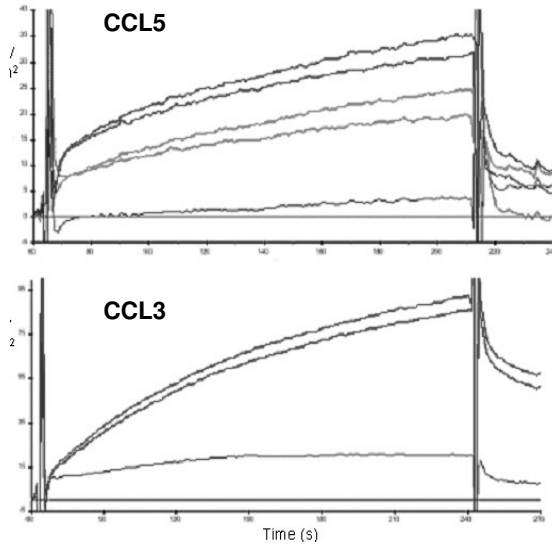
Inhibition of CXCL8 induced neutrophil chemotaxis *in vitro*. (c) Inhibition of KC induced neutrophil recruitment into the knee joint. (d-j) Reduction of inflammation in mBSA induced arthritis by Evasin-3. (d) Inhibition of total cell accumulation in the synovial cavity. (e) Inhibition of neutrophil infiltration into the knee joint. (f) Reduction of hypernociception induced by intra-articular antigen challenge of immunized mice. (g) Reduction of TNF- $\alpha$  production in periarticular tissues. (h) Inhibition of adhesion of leukocytes to synovial microvessels as assessed by intravital microscopy. (i-j) Histological evaluation of the tissue sections from the knee joint. All parameters were evaluated 24 h after antigen challenge and there were 6 mice per group in each experiment. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$

Fig 1

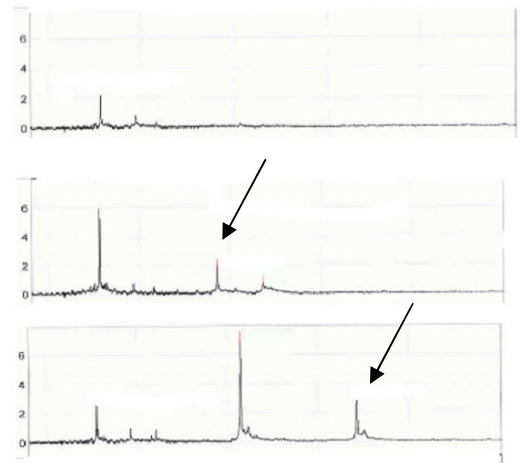
**a**



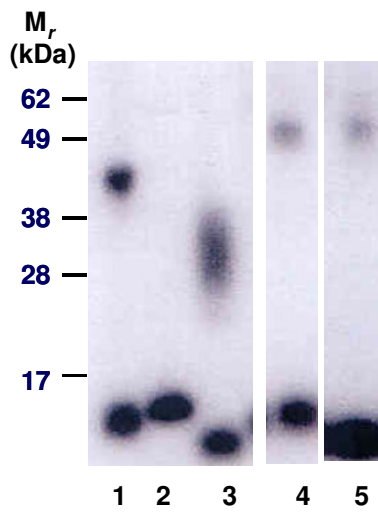
**c**



**d**



**e**



**f**

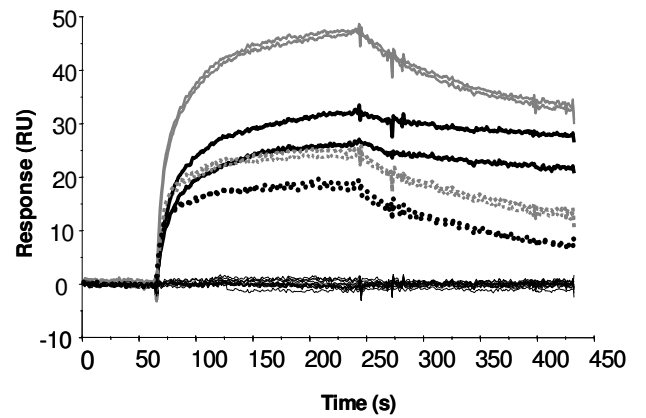


Fig 2

a

**Evasin-1** MTFKACIAIITLCA**MQVIC**-----EDDEDYGD**LG**CPFLVAENKTGYPTIVACKQDC**NG**TT-----  
**Evasin-4** MAFKYWFVFAAVLYARQWLSTK**CE**VPQMTSSSAPDLEEDDYTAYAPL**TC**YFTNSTLGLLAPPNC**SV**LCNSTTTWFN  
-----  
.....  
-----

**Evasin-1** ETAPNGTR**CF**SI**G**DEGLRR--MTANLPYD**CP**LG**Q**CSNGDCIPKETYEVCYRRNWDKKN  
**Evasin-4** ETSPNNAS**CL**LTVDFLTQDA**IL**QENQPYNC**SV**GH**CD**NGT**CA**GPPRHA**QC**W-----

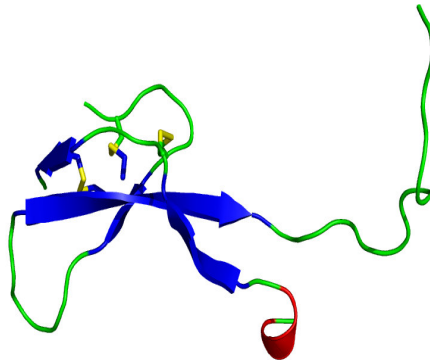
**Evasin-3** RRALLAR**LL**LCV**L**VVSDSKGLVSTIESRTSGDGADNFDVVSCNKNCTSGQNECPEGCF**CG**LLGQ**NK**KGHCYKIIGNLS  
GEPPVRR

b



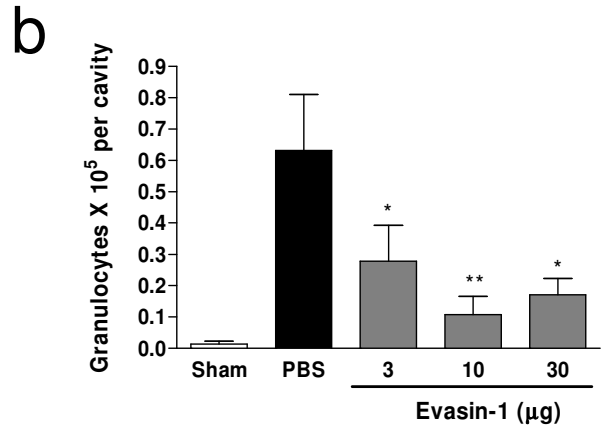
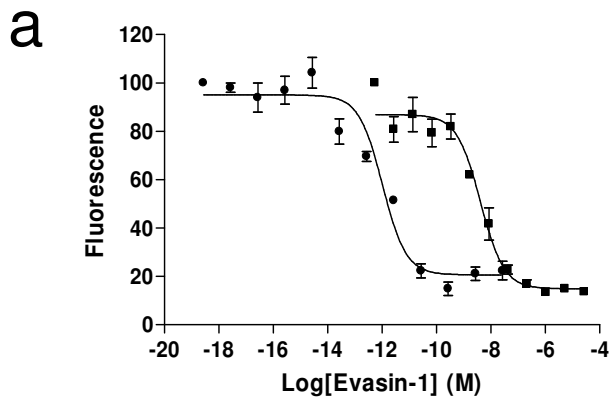
1 EDDEDYGD**LG**CPFLVAENKTGYPTIVACKQDC**NG**TTE**ET**APNGTR**CF**SI**G**DEGLRRMTANLPYDCPLGQCSNGDCIPKET  
YEVCYRRNWRDKKN 94

c

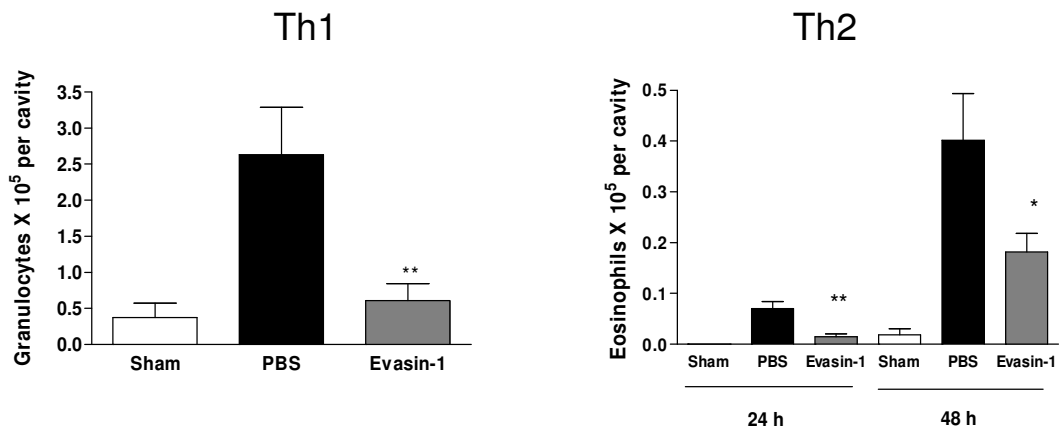


1 **LV**STIESRTSGDGADNFDVVSCNKNCTSGQNECPEGCF**CG**LLGQ**NK**KGHCYKIIGN  
LSGEPPVRR : 66

Fig 3



**c**



**d**

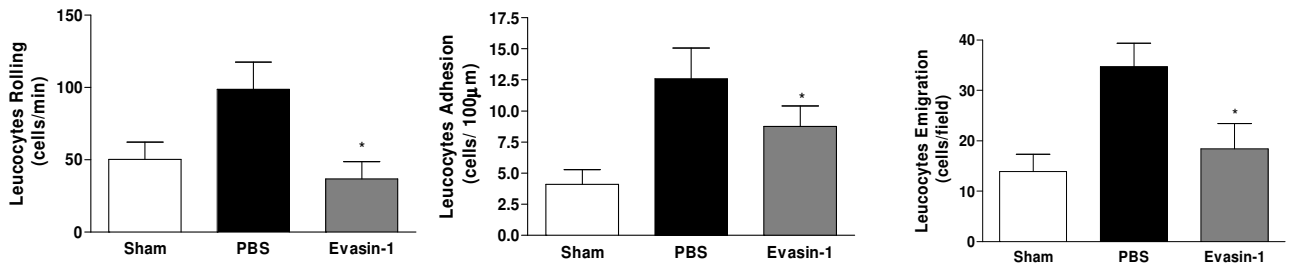
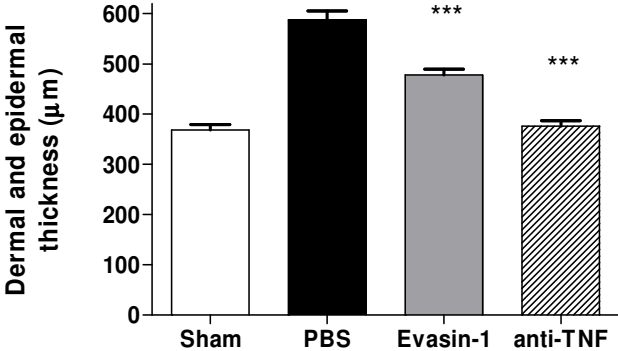


Fig 4

a



b

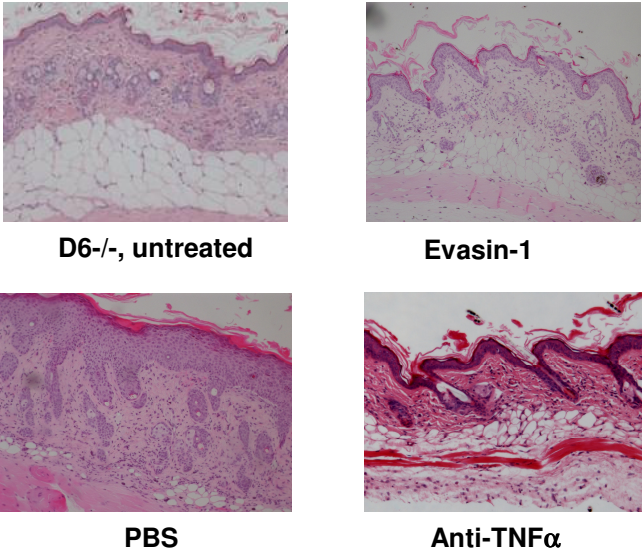
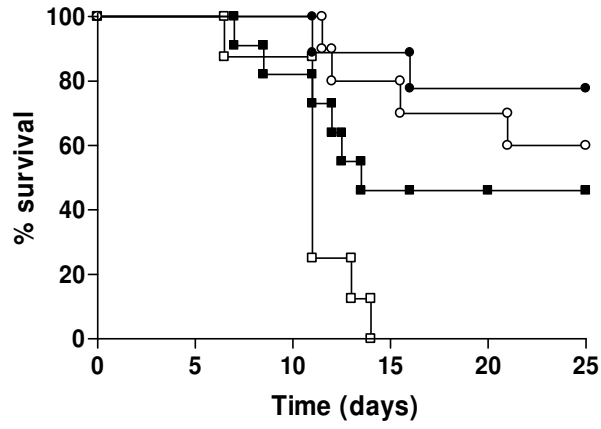
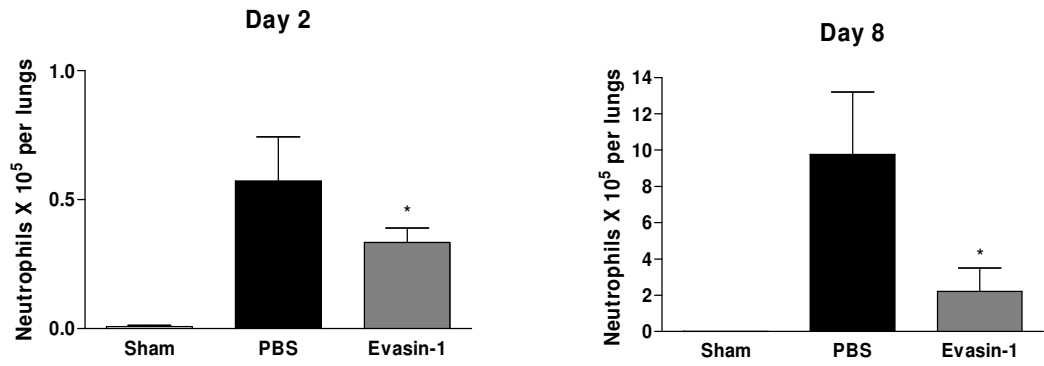


Fig 5

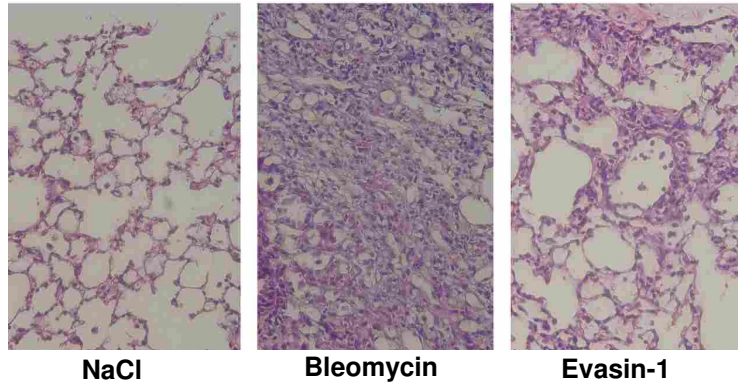
**a**



**b**



**c**



**d**

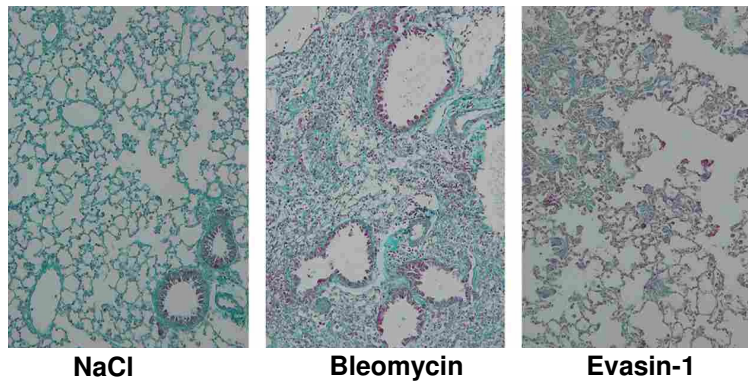
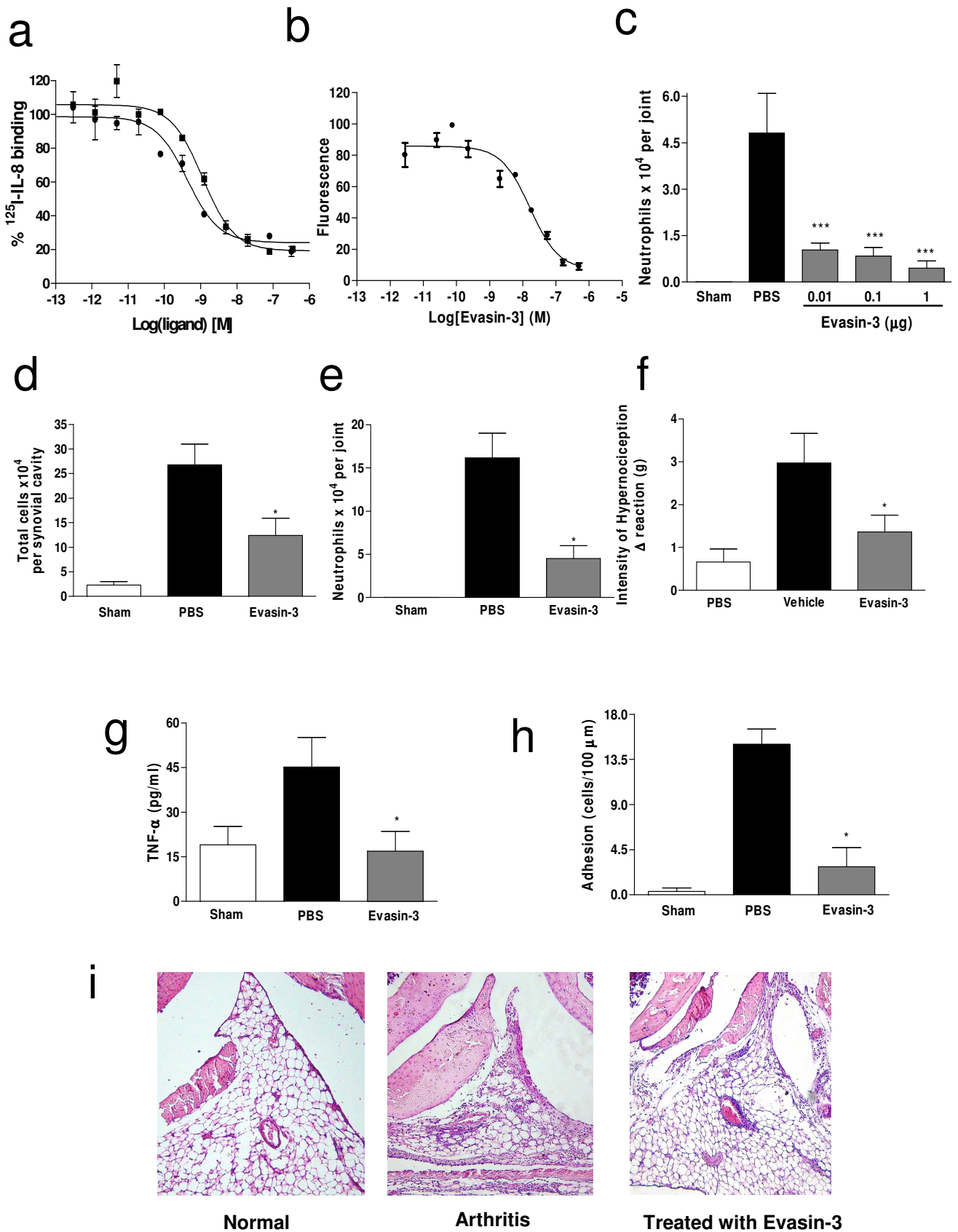


Fig 6



# Concentrations of CXCL8, CXCL9 and sTNFR1 in plasma of patients with pulmonary tuberculosis undergoing treatment

A. L. Alessandri<sup>1</sup>, A. L. Souza<sup>1</sup>, S. C. Oliveira<sup>1</sup>, G. C. Macedo<sup>1</sup>, M. M. Teixeira<sup>1</sup> and A. L. Teixeira<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antonio Carlos, 6627-Pampulha, 31270-901 Belo Horizonte, Brazil, Fax: ++55 31 3441 5963, e-mail: altextr@gmail.com

<sup>2</sup> Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Received 12 September 2005; returned for revision 18 November 2005; returned for final revision 30 January 2006; accepted by M. Parnham 23 May 2006

Published Online First 13 October 2006

**Abstract.** *Background:* Chemokines are a class of cytokines with chemotactic properties shown to be induced by *M. tuberculosis* or its antigens *in vitro* and in experimental infection *in vivo*. A few studies have also demonstrated the expression of chemokines in clinical samples of patients with active tuberculosis (TB). In the present work, we measured the concentration of chemokines in plasma samples of HIV-negative patients with pulmonary tuberculosis at different stages of chemotherapy. For comparison, we also evaluated the levels of sTNFR1 and TNF- $\alpha$ .

*Methods:* Cytokines and chemokines were measured by ELISA in healthy individuals and patients with active pulmonary TB at different stages of treatment.

*Results:* The concentrations of CXCL8, CXCL9 and sTNFR1 were elevated in patients with active pulmonary TB but returned to background levels at 4–6 months of chemotherapy. The concentration of CCL11 was elevated in patients with active pulmonary tuberculosis when compared to control and remained elevated throughout the specific therapy. There was no difference in the plasma concentration of CCL2 and CXCL10 between pulmonary TB patients and control subjects.

*Conclusion:* Measurement of the CXCL8, CXCL9 and sTNFR1 may be useful to assess response to treatment in pulmonary TB patients.

**Key words:** Pulmonary tuberculosis – Chemokines – Inflammation – Chemotherapy of tuberculosis – Cytokine, soluble TNFR

## Introduction

Tuberculosis (TB), a chronic mycobacterial infection caused by *Mycobacterium tuberculosis*, is the leading infectious cause of mortality in the world. Approximately one-third of world's population is infected with the organism, and two

million people die of the disease each year [1]. The protective immune response against *M. tuberculosis* is characterized by a polarized production of type 1 cytokines including tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and interleukin-12 (IL-12) and development of granulomatous lesions [2–8]. Granulomatous inflammation may be followed by tissue fibrosis and marked dysfunction.

Chemokines are a class of cytokines with chemotactic properties and appear to be essential mediators of leukocyte migration and activation [9]. Several studies have now shown that *M. tuberculosis* or its antigens can induce the expression of chemokines in macrophages and monocytes *in vitro* [10–12] and in experimental animals [2, 3, 5, 13]. Moreover, a few studies have demonstrated the expression of chemokines in clinical samples of patients with active tuberculosis [11, 12, 14–16].

Sputum culture following 8 weeks of treatment has been used to assess the response of patients to anti-tuberculous therapy [17]. However, there is much delay in obtaining the results (up to 6 weeks) and the technique is laborious and costly. Thus, the development of clinical and/or laboratory parameters that would allow a rapid and non-invasive evaluation of the effectiveness of medical treatment would be of great interest. For example, sTNFR1, a soluble receptor for TNF- $\alpha$ , may be elevated in plasma samples of patients with pulmonary TB or tuberculous meningitis and levels may decrease after chemotherapy [18, 19]. We have recently demonstrated that the measurement of chemokines in plasma samples may be useful markers of disease severity in patients with *Schistosoma mansoni* [20, 21] and may associate with disease activity in patients with Sydenham chorea [22].

In the present work, we investigated whether levels of chemokines were elevated in plasma samples of HIV-negative patients with pulmonary tuberculosis as compared to uninfected individuals and whether levels of these mediators modified after specific treatment. To this end, chemokines were measured in processed plasma samples of infected patients at different stages of chemotherapy. The chemokines CCL2, CCL11, CXCL8, CXCL9 and CXCL10 that are



induced by *M. tuberculosis* infection and are able to attract cellular types involved in formation of granuloma reaction were selected [3, 13–15]. For comparison, we also evaluated the levels of the following cytokines: TNF- $\alpha$ , sTNFR1, IFN- $\gamma$ , IL-6.

## Materials and methods

### Subjects

Historical plasma samples were obtained from 15 patients (M/F 8/7; mean age  $\pm$ SD years, range [min–max], 36.7  $\pm$  11.0 [20–55]) with pulmonary TB at diagnosis and before treatment was initiated, 18 patients at regular treatment after 0–3 months of treatment (M/F 12/6; mean age  $\pm$ SD years, range [min–max], 37.7  $\pm$  12.1 [22–65]) and 18 patients after 4–6 months of chemotherapy (M/F 8/10; mean age  $\pm$ SD years, range [min–max], 34.1  $\pm$  11.1 [19–52]), from the Center of Health Oswaldo Cruz, Belo Horizonte-Minas Gerais, Brazil. The diagnosis of TB was based on typical clinical history (of slowly progressive constitutional and pulmonary symptoms) and findings in chest radiograph (such as pneumonic infiltrates or cavitory lesions), and confirmed by the presence of acid-fast bacilli in three consecutive morning sputum samples. None of the subjects were infected with the human immunodeficiency virus (HIV) or had been under steroid treatment in the previous year. All selected patients had a positive response to treatment and had a complete clinical remission after treatment. None of the individuals had evidence of acute infections (other than TB) at the time of sample collection. The remission was assessed by clinical examination and conversion of sputum smears to negative. Twelve uninfected subjects were used as controls (M/F 7/5; mean age  $\pm$ SD years, range [min–max], 35.3  $\pm$  6.0 [28–46]). The study protocol was approved by the local ethics review board.

### Serum processing for chemokine analysis

Blood was collected aseptically in lipopolysaccharide-free/siliconised tubes with EDTA 2% by an experienced technician and plasma was isolated within 2 h of bleeding and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until required. For analysis, samples were thawed, and excess of proteins was removed by acid/salt precipitation as routinely performed in our laboratory [20–22]. Briefly, equal volume of plasma and 1.2% trifluoroacetic acid/1.35 M NaCl were mixed and left at room temperature for 10 min. After the samples were centrifuged for 5 min at 10,000 rpm. The supernatants were then adjusted for salt content (0.14 M sodium chloride and 0.01 M sodium phosphate) and pH (7.4), for the determination of chemokine concentration.

### Chemokine and cytokine analysis

The concentration of chemokines and cytokines in plasma of patients and controls was measured using sandwich ELISAs with matched antibody pairs for CXCL8, CXCL9 and CXCL10 (Pharmigen, San Diego, CA), and ELISA kits for CCL2, CCL3, CCL11, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , sTNFR1 (R&D Systems, Minneapolis, MN). The human IL-6 detection kit was a kind gift of Dr Stephen Poole, National Institute of Biological Standards and Control, England. All samples were assayed on duplicate and on the same plate.

The detection limits for these assays were 4 pg/mL for CXCL8; 12 pg/mL for sTNFR1; 16 pg/mL for CCL2, CCL3, CCL11, IL-6 and IFN $\gamma$ ; 20 pg/mL for CXCL10; 30 pg/mL for TNF $\alpha$ ; 40 pg/mL for CXCL9.

### Statistical analysis

Data are presented as medians and were compared by using Kruskal-Wallis test, and differences between groups were assessed using Dunns

pot-test. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ . All calculations were performed using GraphPad Prism computer program (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

## Results

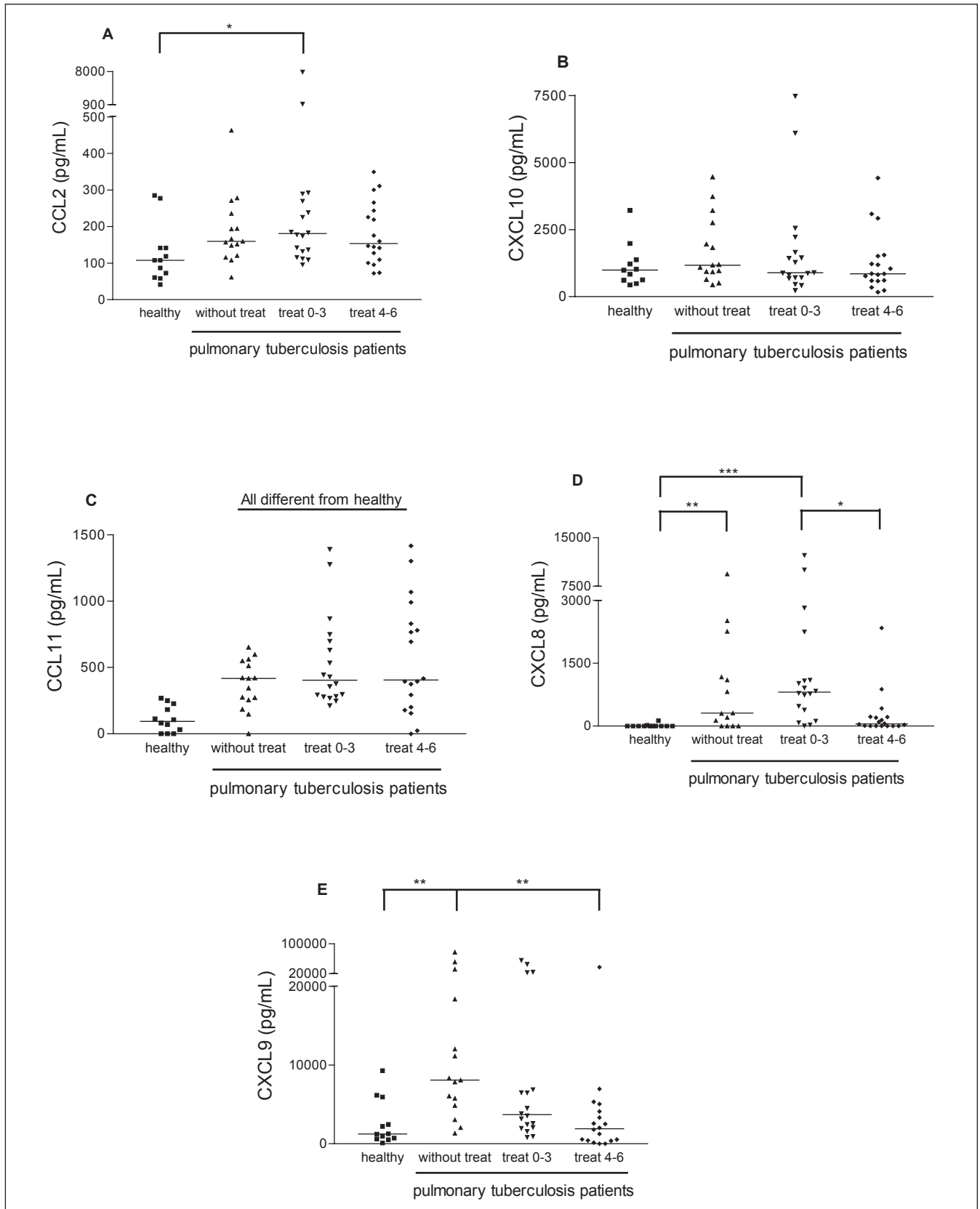
There was no difference in the plasma concentration of CCL2 (Fig. 1A) and CXCL10 (Fig. 1B) between pulmonary TB patients and control subjects. The concentration of CCL11 was elevated in patients with active pulmonary tuberculosis when compared to control and remained elevated throughout the specific therapy (Fig. 1C). Concentrations of CXCL8 (Fig. 1D) and CXCL9 (Fig. 1E) were greater in patients with active pulmonary TB than normal individuals. The concentration of the latter chemokines were still elevated at 0–3 months but returned to background levels at 4–6 months of chemotherapy (Fig. 1D and Fig. 1E). The concentration of CCL3 was below the detection limit of the assay ( $<16$  pg/mL) in all pulmonary TB patients and controls (data not shown).

For comparison, we evaluated the concentration of the following cytokines in plasma of TB patients and control subjects: TNF- $\alpha$ , sTNFR1, IFN- $\gamma$  and IL-6. The concentration of sTNFR1 had a profile similar to that of CXCL8 and CXCL9. Indeed, levels of sTNFR1 were greater in patients with TB at diagnosis and at 0–3 months of treatment than in healthy controls. However, concentrations dropped to background levels at 4–6 months of treatment (Fig. 2). TNF- $\alpha$  levels in plasma did not differ significantly between pulmonary TB patients and control subjects (median [25–75 percentiles] pg/mL): uninfected individuals (4.1 [0–210]); patients before treatment (139.5 [3.2–302] pg/mL); patients at 0–3 months of treatment (220 [13.2–440.5] pg/mL); patients at 4–6 months of treatment (103 [0–478] pg/mL). The concentrations of IL-6 and IFN- $\gamma$  were below the detection limit of the assay ( $<16$  pg/mL) in all TB pulmonary patients and controls (data not shown).

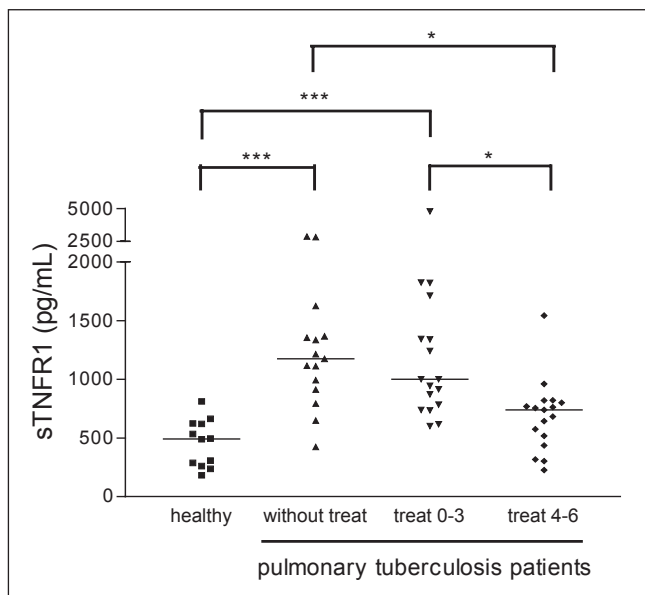
## Discussion

Chemokines, a subgroup of cytokines with selective chemoattractant properties, are thought to play a pivotal role in the pathogenesis of tuberculosis. Chemokines may recruit leucocytes from vessels into tissue resulting in establishment and maintenance of granulomatous lesions [23, 24]. The granulomatous response is essential to control *M. tuberculosis* spread but may lead to significant tissue fibrosis and dysfunction [25].

In our study, we assessed the concentration of chemokines and cytokines in plasma of healthy individuals and patients with newly diagnosed pulmonary tuberculosis and patients at 0–3 or 4–6 months of regular chemotherapy. In Brazil, the treatment recommendation by the Ministry of Health consists of 2 months of rifampicin, pyrazinamide and isoniazid followed by 4 months of the latter 2 drugs. In order to avoid any confounding effect of lack of response to treatment, all patients whose plasma was used in the present study had a positive response to treatment and underwent complete clinical remission.



**Fig. 1.** Concentration of CCL2 (A), CXCL10 (B), CCL11 (C), CXCL8 (D) and CXCL9 (E) in plasma of patients with active tuberculosis at diagnosis and before treatment ( $n = 15$ ), patients after 0–3 months of treatment ( $n = 18$ ), patients after 4–6 months of treatment ( $n = 18$ ) and healthy controls ( $n = 12$ ). Horizontal lines indicate median values. Statistical analysis was conducted using Kruskal-Wallis followed by Dunn's post test. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Fig. 2.** Concentration of sTNFR1 in plasma of patients with active tuberculosis at diagnosis and before treatment ( $n = 15$ ), patients after 0–3 months of treatment ( $n = 18$ ), patients after 4–6 months of treatment ( $n = 18$ ) and healthy controls ( $n = 12$ ). Horizontal line indicates median values. Statistical analysis was conducted using Kruskal-Wallis followed by Dunn's post test. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ .

We found that the concentrations of CCL2 and CXCL10 in plasma of patients with pulmonary TB were similar to those of healthy individuals. Furthermore, the amount of these chemokines did not differ among all stages of treatment. In agreement, Juffermans and colleagues [14] demonstrated that CCL2 and CXCL10 concentration in sera from HIV-negative TB patients did not differ before, during or after treatment. This is in contrast with the finding of Azzurri and colleagues [26] that showed increased CXCL10 plasma levels in active pulmonary TB, while these levels decreased after treatment.

CCL11 concentration was increased in patients with active TB compared with uninfected individuals and continued elevated throughout the anti-microbial treatment. One previous study failed to detect CCL11 in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of TB patients [27], but macrophages infected with *M. tuberculosis* have been shown to express CCL11 message [28]. It is possible that the alveolar macrophages infected with *M. tuberculosis* expressed CCL11 and this mediator gained quick access into the blood where it could contribute to balance the excessive recruitment of activated Th1 cytokine-producing lymphocytes that express CXCR3 receptors. Indeed, CCL11 can antagonize CXCR3 receptor and antagonize the binding of CXCR3 ligands (CXCL9, CXCL10 and CXCL11) [28]. Further investigations in animal models will be necessary to confirm this hypothesis.

We found that the concentrations of CXCL8 and CXCL9 were greater in patients with active pulmonary TB than in normal subjects. Moreover, the concentrations of these chemokines declined to background levels after 4–6 months of successful chemotherapy. Several studies have now reported high CXCL8 quantities in samples of active pulmo-

nary TB [11–16]. In contrast with our results, a previous work showed that the enhanced levels of CXCL8 in serum of active pulmonary TB patients were still increased during and after chemotherapy [14]. It is unclear why the study by Juffermans et al. [14] failed to detect a fall in CXCL8 after chemotherapy. Whereas CXCL8 was measured in serum in the latter study, we measured the protein in processed plasma. Serum preparation is associated with platelet activation and platelets may release certain CXC chemokines [30, 31]. Whether the use of different methodologies could account for the results observed is unclear. Nevertheless, our results demonstrate a consistent elevation of CXCL8 during pulmonary TB infection and a consistent fall after treatment. We are not aware of other studies that measured CXCL9 on plasma samples of patients with TB. Studies in experimental models of TB infection or granuloma have demonstrated the enhanced expression of CXCL9 at the site of infection [3,5,13]. It appears that the increase of this cytokine in the lung is reflected in the general circulation and decline following treatment.

Our studies were not conducted to evaluate possible mechanisms of action of chemokines in infected patients. However, as both CXCL8 and CXCL9 are capable of attracting activated T cells, including CXCR3<sup>+</sup> T cells, it is reasonable to suggest the enhanced concentration of these chemokines may play a role in inducing T cell recruitment to the granuloma and helping in the control of infection. On the other hand, 4–6 months after chemotherapy the decline in levels of CXCL8 and CXCL9 appears to mirror a successful control of parasite growth and consequent diminution of granulomatous inflammation.

TNF- $\alpha$  is thought to be relevant for the pathophysiology of tuberculosis and is induced by *M. tuberculosis* at the site of infection [32–35]. A few studies have demonstrated elevated concentrations of TNF- $\alpha$  in the circulation [16, 18]. In the present study, there was no significant difference in the concentration of TNF- $\alpha$  in plasma samples of healthy subjects and individuals with pulmonary TB. One possibility to explain the differences between the studies is that we used an ELISA assay with low sensitivity and many healthy individuals and infected patients were below the detection limit of the assay. Alternatively, elevated concentrations of TNF- $\alpha$  could not be detected because this cytokine may bind to soluble TNF- $\alpha$  receptors, such as sTNFR1, preventing its determination. Indeed, concentrations of sTNFR1 were greater in plasma samples of subjects with active TB than in plasma of healthy controls. Moreover, treatment with tuberculostatic drugs was accompanied by a decline to baseline levels. These results are similar to those of Kawaguchi and colleagues [18] who showed that sera concentrations of both sTNFR type I and II were enhanced in pulmonary TB and declined with chemotherapy. The levels of sTNFR1 and sTNFR2 were also increased in cerebrospinal fluid samples of patients with tuberculous meningitis and decreased to undetectable values 4 to 8 months after the beginning of specific treatment [19]. Overall, these studies demonstrated that the concentration of sTNFR1 (and sTNFR2) is elevated during TB and that levels fall after specific treatment.

In conclusion, of the many chemokines and cytokines evaluated in the present study, CXCL8, CXCL9 and sTNFR1 were consistently elevated during pulmonary TB infection

and dropped to baseline levels after specific treatment. The present study did not measure chemokines and sTNFR1 in a longitudinal manner and lacked a longer follow-up period. Moreover and due to our selection of HIV-negative patients, it only included patients who responded to conventional tuberculosis chemotherapy. Despite the latter limitations, it is apparent that measurement of these proteins may be useful to assess response to treatment in pulmonary TB patients. Further studies in the general population and in patients who fail treatment are necessary to support this possibility.

**Acknowledgments.** This investigation received financial support from the UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR A20748), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and Fundação do Amparo a pesquisas do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brazil).

## References

- [1] World Health Organization (WHO). The double burden: emerging epidemics and persistent problems. In: The world health report 1999: making a difference. Geneva: WHO; 1999: 13–28.
- [2] Chensue SW, Warmington K, Ruth J, Lincoln P, Kuo MC, Kunkel SL. Cytokine responses during mycobacterial and schistosomal antigen-induced pulmonary granuloma formation. Production of Th1 and Th2 cytokines and relative contribution of tumor necrosis factor. *Am J Pathol* 1994; 145: 1105–13.
- [3] Chiu BC, Freeman CM, Stolberg VR, Komuniecki E, Lincoln PM, Kunkel SL et al. Cytokine-chemokine networks in experimental mycobacterial and schistosomal pulmonary granuloma formation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29: 106–16.
- [4] Ladel CH, Szalay G, Riedel D, Kaufmann SH. Interleukin-12 secretion by Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages. *Infect Immun* 1997; 65: 1936–8.
- [5] Qiu B, Frait KA, Reich F, Komuniecki E, Chensue SW. Chemokine expression dynamics in mycobacterial (type-1) and schistosomal (type-2) antigen-elicited pulmonary granuloma formation. *Am J Pathol* 2001; 158: 1503–15.
- [6] Serbina NV, Flynn JL. Early emergence of CD8(+) T cells primed for production of type 1 cytokines in the lungs of Mycobacterium tuberculosis-infected mice. *Infect Immun* 1999; 67: 3980–8.
- [7] Taha RA, Minshall EM, Olivenstein R, Ihaku D, Wallaert B, Tsicopoulos A, Tonnel AB, Damia R, Menzies D, Hamid QA. Increased expression of IL-12 receptor mRNA in active pulmonary tuberculosis and sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1119–23.
- [8] Van Crevel R, Ottenhoff TH, Van Der Meer JW. Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 294–309.
- [9] Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 145–76.
- [10] Lee JS, Song CH, Lim JH, Lee KS, Kim HJ, Park JK et al. Monocyte chemoattractant protein-1 production in patients with active pulmonary tuberculosis and tuberculous pleurisy. *Inflamm. Res* 2003; 52: 297–304.
- [11] Sadek MI, Sada E, Toossi Z, Schwander SK, Rich EA. Chemokines induced by infection of mononuclear phagocytes with mycobacteria and present in lung alveoli during active pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19: 513–21.
- [12] Zhang Y, Broser M, Cohen H, Bodkin M, Law K, Reibman J et al. Enhanced interleukin-8 release and gene expression in macrophages after exposure to Mycobacterium tuberculosis and its components. *J Clin Invest* 1995; 95: 586–92.
- [13] Seiler P, Aichele P, Bandermann S, Hauser AE, Lu B, Gerard NP et al. Early granuloma formation after aerosol Mycobacterium tuberculosis infection is regulated by neutrophils via CXCR3-signaling chemokines. *Eur J Immunol* 2003; 33: 2676–86.
- [14] Juffermans NP, Verbon A, Van Deventer SJ, Van Deutekom H, Belisle JT, Ellis ME et al. Elevated chemokine concentrations in sera of human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and HIV-seronegative patients with tuberculosis: a possible role for mycobacterial lipoarabinomannan. *Infect Immun* 1999; 67: 4295–7.
- [15] Kurashima K, Mukaida N, Fujimura M, Yasui M, Nakazumi Y, Matsuda T et al. Elevated chemokine levels in bronchoalveolar lavage fluid of tuberculosis patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1474–7.
- [16] Ribeiro-Rodrigues R, Co RT, Johnson JL, Ribeiro F, Palaci M, Sa RT et al. Sputum cytokine levels in patients with pulmonary tuberculosis as early markers of mycobacterial clearance. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9: 818–23.
- [17] Mitchison DA. Assessment of new sterilizing drugs for treating pulmonary tuberculosis by culture at 2 months. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 1062–3.
- [18] Kawaguchi H, Ina Y, Ito S, Sato S, Sugiura Y, Tomita H et al. Serum levels of soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors in patients with pulmonary tuberculosis. *Kekkaku* 1996; 71: 259–65.
- [19] Mastroianni CM, Paoletti F, Lichtner M, D'Agostino C, Vullo V, Delia S. Cerebrospinal fluid cytokines in patients with tuberculous meningitis. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 84: 171–6.
- [20] Falcão PL, Correa-Oliveira R, Fraga LA, Talvani A, Proudfoot AE, Wells TN et al. Plasma concentrations and role of macrophage inflammatory protein-1alpha during chronic Schistosoma mansoni infection in humans. *J Infect Dis* 2002; 186: 1696–1700.
- [21] Souza ALS, Roffê E, Pinho V, Souza DG, Silva AF, Russo RC et al. The potential role of the chemokine macrophage inflammatory protein-1a (MIP-1a/CCL3) in human and experimental schistosomiasis. *Infect Immun* 2006; 73: 2515–23.
- [22] Teixeira AL Jr, Cardoso F, Souza AL, Teixeira MM. Increased serum concentrations of monokine induced by interferon-gamma/CXCL9 and interferon-gamma-inducible protein 10/CXCL10 in Sydenham's chorea patients. *J Neuroimmunol* 2004; 150: 157–62.
- [23] Algood HM, Chan J, Flynn JL. Chemokines and tuberculosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14: 467–7.
- [24] Peters W, Ernst JD. Mechanisms of cell recruitment in the immune response to Mycobacterium tuberculosis. *Microbes Infect* 2003; 5: 151–8.
- [25] Perez RL, Rivera-Marrero CA, Roman J. Pulmonary granulomatous inflammation: From sarcoidosis to tuberculosis. *Semin Respir Infect* 2003; 18: 23–32.
- [26] Azzurri A, Sow OY, Amedei A, Bah B, Diallo S, Peri G et al. IFN-gamma-inducible protein 10 and pentraxin 3 plasma levels are tools for monitoring inflammation and disease activity in Mycobacterium tuberculosis infection. *Microbes Infect* 2005; 7: 1–8.
- [27] Miotto D, Christodoulopoulos P, Olivenstein R, Taha R, Cameron L, Tsicopoulos A et al. Expression of IFN-gamma-inducible protein; monocyte chemoattractant proteins 1, 3, and 4; and eotaxin in TH1- and TH2-mediated lung diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 664–70.
- [28] Ragno S, Romano M, Howell S, Pappin DJ, Jenner PJ, Colston MJ. Changes in gene expression in macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis: a combined transcriptomic and proteomic approach. *Immunology* 2001; 104: 99–108.
- [29] Weng Y, Siciliano SJ, Waldburger KE, Sirotna-Meisher A, Staruch MJ, Daugherty BL et al. Binding and functional properties of recombinant and endogenous CXCR3 chemokine receptors. *J Biol Chem* 1998; 17: 18288–91.
- [30] Gear AR, Camerini D. Platelet chemokines and chemokine receptors: linking hemostasis, inflammation, and host defense. *Microcirculation* 2003; 10: 335–50.
- [31] Struyf S, Burdick MD, Proost P, Van Damme J, Strieter RM. Platelets release CXCL4L1, a nonallelic variant of the chemokine platelet factor-4/CXCL4 and potent inhibitor of angiogenesis. *Circ Res* 2004; 95: 855–7.

- [32] Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity* 1995; 2: 561–72.
- [33] Gardam MA, Keystone EC, Menzies R, Manners S, Skamene E, Long R et al. Anti-tumour necrosis factor agents and tuberculosis risk: mechanisms of action and clinical management. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 148–55.
- [34] Mohan VP, Scanga CA, Yu K, Scott HM, Tanaka KE, Tsang E et al. Effects of tumor necrosis factor  $\alpha$  on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. *Infect Immun* 2001; 69: 1847–55.
- [35] Roach DR, Bean AG, Demangel C, France MP, Briscoe H, Britton WJ. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol* 2002; 168: 4620–7.



To access this journal online:  
<http://www.birkhauser.ch>

---