Mariana Trivilin Mendes

**Aminopeptidase básica e Leucotrieno-A4-
hidrolase em Ratos Sensíveis e Insensíveis à
Indução de Artrite por Colágeno Tipo II**

*Basic aminopeptidase and Leukotriene-A4-hydrolase
of Rats Sensitive and Insensitive to Induction of
Arthritis by Type-II Collagen*

Versão Corrigida da Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Fisiologia Geral. Versão original encontra-se disponível no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Flávio
Silveira

São Paulo

2012

Mariana Trivilin Mendes

**Aminopeptidase básica e Leucotrieno-A4-
hidrolase em Ratos Sensíveis e Insensíveis à
Indução de Artrite por Colágeno Tipo II**

*Basic aminopeptidase and Leukotriene-A4-hydrolase
of Rats Sensitive and Insensitive to Induction of
Arthritis by Type-II Collagen*

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de
São Paulo, para a obtenção de Título
de Mestre em Ciências, na Área de
Fisiologia Geral.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Flávio
Silveira

São Paulo

2012

Mendes, Mariana Trivilin
Aminopeptidase básica (APB) e Leucotrieno-A4-
hidrolase (LTA4H) em Ratos Sensíveis e Insensíveis à
Indução de Artrite por Colágeno Tipo II/ Mariana
Trivilin Mendes ; orientador Paulo Flávio Silveira. --.
São Paulo, 2012.
66 f.

Dissertação (Mestrado) –
Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Fisiologia.
1. Artrite reumatoide 2. Aminopeptidase básica
3. Leucotrieno-A4-hidrolase
I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências.
Departamento de Fisiologia Geral.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a). Paulo Flávio Silveira - Orientador

Dedicatória

Agradeço primeiramente a **Deus**, que me colocou ao encontro de pessoas tão especiais neste mundo e sempre esteve ao meu lado.

À minha mãe, **Linéia Ruiz Trivilin**, que me ensinou o que é caráter, sempre me incentivou a estudar e esteve junto comigo em cada derrota, comemoração, lágrimas e sorrisos nessa jornada chamada vida.

Ao meu pai, **José Mendes Filho**, pelo apoio mesmo sem entender muito bem o que faço, pelo abraço amoroso todas as vezes que o vejo, por sempre me lembrar de Deus e pelos conselhos sempre certos.

Ao amor da minha vida **Denis Pupo**, que não me deixa desistir, aguenta meu mau humor, me faz esquecer as preocupações, é meu companheiro e me lembra sempre que todo o esforço vale a pena por um futuro melhor ao seu lado, por nós.

À minha melhor amiga, **Camilla de Cássia Sovenhi**, por uma amizade maravilhosa de nove anos, por entender minhas ausências, pela companhia inestimável até para ficar sem fazer nada, pelas conversas, risadas, trapalhadas, pelo ombro pra chorar e força sem tamanho.

A todos da minha família, irmãs (**Anna e Marília**), padrasto (**Pedro Kobler**), tios (**Amilton, Luiz**), tias (**Ligia, Livânia, Rosana**), avós (**Ana e Agripina**), avô (**Leonildo**) e **primos** por toda experiência que me é doada, por todo carinho que me é dado e por me apoiarem sempre.

Às minhas amigas: **Nathalia Fávero, Kelly de Albuquerque, Lorraine Istefane, Natassja Foizer, Aline Blasques, Jéssica Camila Rodrigues, Carmen Capell** por mesmo sem entender meu trabalho ou fazendo a mesma coisa que eu, concordando ou não, me fazerem pensar que o que faço é importante, por me mostrarem o valor da amizade, das risadas fora de hora e dos abraços apertados quando se é preciso.

A todas as pessoas que fizeram ou que fazem parte da minha vida e que de alguma maneira me ajudaram a ser quem sou e estar onde estou.

Epígrafe

“Sem sonhos, a vida não tem brilho.
Sem metas, os sonhos não têm alicerces.
Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais.
Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades
e corra riscos para executar seus sonhos.
Melhor é errar por tentar do que errar por omitir!”

Augusto Cury

Agradecimentos

Ao meu orientador **Prof. Dr. Paulo Flávio Silveira**, pela oportunidade e por sua inegável competência com que estabeleceu os caminhos e diretrizes desta pesquisa, por confiar no meu trabalho e por me deixar fazer parte de sua equipe tão maravilhosa.

Aos meus colegas de laboratório, **Rafaela Fadoni Alponi Vendrame e Rodrigo Frezzatti** pela companhia diária, pelas risadas, brincadeiras e também pela ajuda quando necessário, por sempre responderem minhas dúvidas e pela amizade que me é especial.

Aos colegas da Farmacologia II: **Marlos Cortez, Ana Eduarda Zulim Carvalho, Marina Nogueira, Livia Rocha e Márcio Matsubara** por tornarem o trabalho agradável, pelos momentos de riso e pela constante ajuda.

Ao **Eduardo Frare** pelo grande auxílio na montagem dos meus slides, ajuda experimental inestimável e principalmente pela amizade.

Ao **Leonardo Zambotti Villela**, pela paciência e atenção com que me auxiliou durante meu trabalho.

A todos da **equipe e colegas de trabalho do Instituto Butantan**.

Agradeço à **Joana Darc Carvalho Vieira e Roseli Silva Santos**, secretárias, respectivamente, do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan e do Departamento de Fisiologia da Universidade de São Paulo, pela dedicação e auxílio.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela bolsa concedida.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo auxílio financeiro que tornou possível o desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Programa de pós-graduação em Fisiologia Geral no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo**.

LISTA DE ABREVIATURAS

5-LO	5-lipoxigenase
AACII	anticorpo anti-colágeno tipo II
Ang	angiotensina
APB	aminopeptidase básica
AR	artrite reumatoide
ArgNA	L-arginina β -naftilamida
BSA	albumina sérica bovina
CIA	modelo de indução da artrite por colágeno tipo II
COX	cicloxigenase
CII	colágeno tipo II
cPLA2	fosfolipase A2 citosólica
DEPC	dietilpirocarbonato
DMSO	dimetil-sulfóxido
DPPIV	dipeptidil peptidase IV
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EIA	ensaio imunoenzimático
FM	fração de membrana solubilizada
FS	fração solúvel
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
id	via intradérmica
Inc	amostra incubada com LT-A4
ip	via intraperitoneal
LDH	desidrogenase láctica
LT	leucotrieno
LT-A4-H	leucotrieno-A4-hidrolase
MHC	moléculas do complexo principal de histocompatibilidade
NADH	β -nicotinamida adenina di-nucleotídeo, forma reduzida
PBMCs	células mononucleares do sangue periférico
PBS	tampão fosfato
PGP	Pro-Gly-Pro
qPCR	reação quantitativa em tempo real em cadeia da polimerase
RT	real time
s-inc	amostra sem incubação com LT-A4
SY	líquido sinovial

TS	tecido sinovial
TNF- α	fator de necrose tumoral tipo α

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade APB no plasma, líquido sinovial (SY), frações solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM) do tecido sinovial (TS) e de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de ratos controles, artríticos e resistentes-----20

Tabela 2 - Níveis de LT-B4 (pg/mL) medidos por área dos picos do HPLC e por EIA direto das amostras de plasma, líquido sinovial (SY), frações solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM) do tecido sinovial (TS) e de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de ratos controles, artríticos e resistentes, incubadas (inc) ou não (s-inc) com LT-A4-----24

Tabela 3 - Atividade LT-A4-H (pg de LT-B4 formado / min/ mL) do plasma, líquido sinovial (SY) e frações solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM) do tecido sinovial (TS) e de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de ratos controles, artríticos e resistentes-----26

Tabela 4 - Sentido das alterações nos níveis de LT-B4 e de atividades de APB e LT-A4-H em ratos artríticos e resistentes no modelo CIA, relativamente aos controles sadios-----27

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Análise bidimensional da atividade hidrolítica de LT-A4-H sobre substrato epóxido LT-A4 e sobre substrato peptídico, conforme proposto por DE OLIVEIRA *et al* (2011)-----8
- Figura 2** - Expressão gênica relativa da aminopeptidase básica (APB) (EC 3.4.11.6) e da leucotrieno-A4-hidrolase (LT-A4-H) (EC 3.3.2.6) no tecido sinovial de animais controles sadios-19
- Figura 3** - Corrida típica em HPLC do padrão LT-B4 e de material biológico-----21
- Figura 4** - Regressão linear entre níveis de LT-B4 e áreas dos picos correspondentes no HPLC---21
- Figura 5** - Regressão linear entre níveis de LT-B4 e valores de absorbância em $\lambda=412\text{nm}$ obtidos no EIA para as amostras analisadas-----22
- Figura 6** - Análise de regressão comparativa-----23
- Figura 7** - Regressão linear entre os níveis de LT-B4 em todas as amostras sob estudo, medidos por área do pico do HPLC e por EIA-----24
- Figura 8** - Esquema ilustrativo dos resultados obtidos na presente dissertação, mostrando alterações nos níveis do conteúdo de LT-B4 e de atividades LT-A4-H e APB em ratos artríticos e resistentes à indução de artrite no modelo CIA-----28

Índice

1. ABSTRACT	1
2. RESUMO	3
3. INTRODUÇÃO	5
3.1. Artrite Reumatoide (AR)	5
3.2. Artrite induzida em ratos por colágeno tipo II	6
3.3. Atividades aminopeptidásica e epóxido-hidrolase na AR	6
4. OBJETIVO	9
5. ESTRATÉGIAS DE ESTUDO	9
6. MATERIAL E MÉTODOS	10
6.1. Animais e tratamentos	10
6.2. Avaliação do edema das patas	11
6.3. Coleta de material	11
6.4. Obtenção de Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMCs)	12
6.4.1. Contagem de PBMCs	12
6.4.2. Viabilidade de PBMCs	12
6.5. Obtenção da FS e da FM do tecido sinovial e de PBMCs	12
6.6. Medida de TNF- α e AACII	13
6.7. Proteína total	13
6.8. Medida de LDH	13
6.9. Atividade APB	14
6.10. Padronização da medida do LT-A4-H	14
6.10.1. EIA	14
6.10.2. HPLC	15
6.10.3. Teor de LT-B4	16
6.10.4. Atividade LT-A4-H	16
6.11. Expressão gênica da APB e da LT-A4-H	16
6.11.1. Extração do RNA	16
6.11.2. Transcrição Reversa (construção da fita de DNA complementar – cDNA)	17
6.11.3. qPCR	17
6.12. Análise dos resultados	18
7. RESULTADOS	18
7.1. Classificação dos animais pela suscetibilidade à indução de artrite	18
7.2. Eficiência do fracionamento do TS e de PBMCs	19
7.3. Expressão gênica de APB (EC 3.4.11.6) e de LT-A4-H (EC 3.3.2.6)	19
7.4. Atividade APB	19
7.5. Teor de LT-B4 e atividade LT-A4-H	20

8. DISCUSSÃO	27
8.1. Avaliação da indução da artrite no modelo CIA	29
8.2. Avaliação do fracionamento do tecido sinovial e de PBMCs	30
8.3. Atividade APB	30
8.4. Níveis de LT-B4 e atividade de LT-A4-H	31
8.4.1. <i>Por que comparar as medidas de LT-B4 nas metodologias HPLC e EIA</i>	31
8.4.2. <i>Níveis de LT-B4 medidos pela área do pico obtido em HPLC</i>	32
8.4.3. <i>Níveis de LT-B4 medidos por EIA diretamente em material bruto</i>	32
8.4.4. <i>Comparação dos níveis de LT-B4 obtidos por EIA do pico de HPLC versus EIA das amostras brutas</i>	32
8.4.5. <i>Significado da medida de LT-B4 em amostras sem incubar e incubadas com LT-A4</i>	32
8.5. Expressão gênica de APB (EC 3.4.11.6) e de LT-A4-H (EC 3.3.2.6)	34
8.6. Correlações entre os níveis de LT-B4 e as atividades LT-A4-H e APB e seu possível significado na funcionalidade das proteínas responsáveis por estas atividades e na resistência e no desenvolvimento de artrite no modelo CIA	34
9. CONCLUSÕES	37
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
11. ANEXO	47

1. ABSTRACT

Whether L-arginyl-B-naphthylamide (ArgNA) and leukotriene (LT)-A4 hydrolyses by LT-A4 hydrolase (LT-A4-H) (EC 3.3.2.6) and basic aminopeptidase (APB) (EC 3.4.11.6) influence the development of collagen-induced arthritis (CIA) is presently uncertain. The objective of this study was to investigate the interrelationship among LT-A4-H, APB and LT-B4 in CIA rats. High-performance liquid chromatography (HPLC), enzyme immunoassay (EIA), spectrofluorometry and quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR) were used as methodologies. The existence of genes for EC 3.3.2.6 and EC 3.4.11.6 proteins was confirmed in the synovial tissue of healthy control rats. ArgNA hydrolysis was higher in soluble fraction of synovial tissue in rats submitted to CIA that developed the disease (CIA-arthritis) than in those that did not develop the disease (CIA-resistant) or healthy control. Synovial fluid and blood plasma had lower ArgNA hydrolysis in CIA-resistant than in CIA-arthritis or control. In the peripheral blood mononuclear cells ArgNA hydrolysis was higher in soluble fraction of control and in membrane-bound fraction of CIA-resistant than in CIA-arthritis. ArgNA hydrolysis differed between CIA-arthritis and CIA-resistant in soluble and membrane-bound fractions of synovial tissue, membrane-bound fraction of mononuclear cells, synovial fluid and blood plasma. Compared with healthy control, LT-A4 hydrolysis was higher in synovial fluid and in soluble fraction from mononuclear cells of CIA-arthritis and CIA-resistant. LT-A4 hydrolysis was also higher in membrane-bound fraction from synovial tissue of CIA-resistant, while it was lower in membrane-bound fraction of mononuclear cells of CIA-arthritis and CIA-resistant than in control. In all these locations hydrolysis of ArgNA remained unchanged or it was inversely related with LT-A4 hydrolysis, comparatively to healthy control. Also compared with control, changes on the levels of LT-A4 hydrolysis and LT-B4 content had the same sense between CIA-resistant and CIA-arthritis in all compartments, with the exception of membrane-bound fraction of synovial tissue and soluble fraction of mononuclear cells. However, quantitative comparison between CIA-arthritis and CIA-resistant showed different levels of LT-A4 hydrolysis in synovial fluid, membrane-bound fraction of synovial tissue and soluble fraction of mononuclear cells, together with different levels of LT-B4 content in membrane-bound fraction of synovial tissue and soluble fraction of mononuclear cells. On the other hand, a same-sense relationship was found between altered levels of LT-A4 hydrolysis and LT-B4 content only in synovial fluid and membrane-bound fraction of mononuclear cells of CIA-arthritis and CIA-resistant and in membrane-bound fraction of synovial tissue of CIA-resistant, comparatively to healthy control. In conclusion, the levels of LT-A4-H activity and LT-B4 content of CIA-arthritis and

CIA-resistant in relation to control permit the distinction of these two statuses from healthy status. Although changes on LT-A4-H activity and LT-B4 content of CIA-arthritic and CIA-resistant in relation to control have the same sense, quantitatively they are distinctive between these two statuses. The measurements of LT-A4-H activity and LT-B4 content have potential diagnostic use and their altered levels might be implications on the development or resistance to arthritis. APB activity is a potential marker of CIA-arthritis and resistance to CIA. The levels of LT-B4 are not controlled only by LT-A4-H. LT-A4-H and APB are related in a compartment-dependent manner acting as independent enzymes with differential modulation of their specificity, efficiency and/or catalytic affinity on the aminoacyl and epoxy substrates, or as bifunctional or interdependent enzymes which activities are inversely related due to the concurrent inhibition of one of these.

keywords: autoimmunity, arthritis, animal model, bifunctional enzymes, aminopeptidase, leukotriene.

2. RESUMO

Atualmente, ainda é incerto se a hidrólise de L-arginil- β -naftilamida (ArgNA) e do leucotrieno (LT)-A4 pela LT-A4-hidrolase (LT-A4-H) (EC 3.3.2.6) e pela aminopeptidase básica (APB) (EC 3.4.11.6) tem influência no desenvolvimento da artrite induzida por colágeno (CIA). O objetivo deste estudo foi investigar a inter-relação entre LT-A4-H, APB e LT-B4 em ratos submetidos à CIA. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), ensaio imunoenzimático (EIA), espectrofluorimetria e reação quantitativa em tempo real em cadeia da polimerase (qPCR) foram usados como metodologias. A existência dos genes para as proteínas EC 3.3.2.6 e EC 3.4.11.6 foi confirmada no tecido sinovial de ratos controles saudáveis. A hidrólise de ArgNA foi maior na fração solúvel do tecido sinovial dos animais submetidos à CIA que desenvolveram a doença (artríticos-CIA) que naqueles que não desenvolveram a doença (resistentes-CIA) e nos controles saudáveis. No líquido sinovial e no plasma sanguíneo houve menor hidrólise de ArgNA nos resistentes-CIA que nos artríticos-CIA e controles. Nas células mononucleares do sangue periférico a hidrólise de ArgNA foi maior na fração solúvel dos controles e na fração de membrana dos resistentes que nos artríticos-CIA. A hidrólise de ArgNA diferiu entre artríticos-CIA e resistentes-CIA nas frações solúvel e de membrana do tecido sinovial, fração de membrana das células mononucleares, líquido sinovial e plasma. Em comparação com controles saudáveis, a hidrólise de LT-A4 foi maior no líquido sinovial e na fração solúvel de células mononucleares de artríticos-CIA e resistentes-CIA. A hidrólise de LT-A4 também foi maior na fração de membrana do tecido sinovial de resistentes-CIA, enquanto foi menor na fração de membrana de células mononucleares de artríticos-CIA e resistentes-CIA, comparativamente aos controles. Em todos estes compartimentos a hidrólise de ArgNA permaneceu inalterada ou relacionou-se inversamente com a hidrólise de LT-A4, comparativamente aos controles saudáveis. Também comparativamente aos controles, as alterações nos níveis de hidrólise de LT-A4 e do conteúdo de LT-B4 tiveram o mesmo sentido entre artríticos-CIA e resistentes-CIA em todos os compartimentos, com exceção da fração de membrana do tecido sinovial e da fração solúvel das células mononucleares. No entanto, a comparação quantitativa entre artríticos-CIA e resistentes-CIA mostrou níveis diferentes de hidrólise de LT-A4 no fluido sinovial, fração de membrana do tecido sinovial e fração solúvel de células mononucleares, juntamente com níveis diferentes do conteúdo de LT-B4 na fração de membrana do tecido sinovial e na fração solúvel das células mononucleares. Por outro lado, uma relação no mesmo sentido foi encontrada entre alterações nos níveis de hidrólise de LT-A4 e do teor de LT-B4 apenas no líquido sinovial e na fração de membrana de células mononucleares dos artríticos-CIA e resistentes-CIA e na fração de membrana do tecido

sinovial dos resistentes-CIA, comparativamente aos controles sadios. Em conclusão, os níveis de atividade LT-A4-H e do teor de LT-B4 de artríticos-CIA e resistentes-CIA em relação aos controles permitem a distinção dessas duas condições da condição saudável. Apesar das alterações de atividade LT-A4-H e do teor de LT-B4 dos artríticos-CIA e resistentes-CIA em relação aos controles terem o mesmo sentido, elas são quantitativamente distintas entre essas duas condições. As medidas da atividade LT-A4-H e do teor de LT-B4 têm potencial para uso diagnóstico e as alterações em seus níveis devem ter implicação no desenvolvimento ou resistência à artrite. A atividade APB é potencial marcadora da artrite-CIA e da resistência à CIA. Os níveis de LT-B4 não são controlados somente pela LT-A4-H. LT-A4-H e APB estão relacionadas de uma forma compartimento-dependente, atuando como enzimas independentes, com modulação diferencial das suas especificidades, eficiências e/ou afinidades catalíticas sobre os substratos epóxi e peptídico, ou como enzimas bifuncionais ou interdependentes, cujas atividades são inversamente relacionadas devido à inibição concorrente de uma destas atividades.

palavras-chave: autoimunidade, artrite, modelo animal, enzimas bifuncionais, aminopeptidase, leucotrieno.

3. INTRODUÇÃO

3.1. Artrite Reumatoide (AR)

A AR é uma doença inflamatória crônica que acomete preferencialmente mulheres e é primordialmente caracterizada pela progressiva destruição da cartilagem e ossos articulares (MCINNES *et al.*, 2011; DOAN & MASSAROTTI, 2005; PANAYI, 2005; BRAND *et al.*, 2003; NAKAMURA, 2000). Sua etiologia é desconhecida (DOAN & MASSAROTTI, 2005) e os mecanismos para o seu estabelecimento ainda não são completamente compreendidos (ROSENZWEIG *et al.*, 2009).

A AR é caracterizada por poliartrite periférica, simétrica, com erosões ósseas e da cartilagem, consequente deformidade e destruição das articulações (HOLMDAHL *et al.*, 2001). Este processo está associado com a hiperplasia inflamatória da membrana sinovial, também conhecida como *pannus* (STUART *et al.*, 1984), pela neovascularização, que ocorre depois da infiltração das células inflamatórias na membrana sinovial (PANAYI, 2005), e pela resposta imune contra os componentes da cartilagem, entre eles o colágeno tipo II (CII), o qual tem sido o mais usualmente relacionado com essa resposta (HOLMDAHL *et al.*, 2001).

Estima-se que a predisposição genética relacionada aos genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) teria uma contribuição de cerca de 50% ou menos para o desenvolvimento da doença (STRIETHOLT *et al.*, 2008). Assim, diversos fatores epigenéticos também estão envolvidos no desencadeamento da AR, como metilação do DNA, splicing alternativo, micro RNAs e modificações de histonas (STRIETHOLT *et al.*, 2008). Além disso, fatores como infecções, fumo, gravidez, hormônios sexuais e outros podem levar à autoimunidade (KOBAYASHI *et al.*, 2008).

Sabe-se que a AR ocorre em função de uma resposta imune contra componentes da cartilagem (BRAND *et al.*, 2003; CREMER *et al.*, 1998). Várias citocinas estão implicadas na AR, como o fator de necrose tumoral tipo (TNF)- α , a interleucina (IL)-1 e IL-6. Destas, o TNF- α destaca-se como um mediador pró-inflamatório dominante e um importante alvo terapêutico (OKAMOTO *et al.*, 2008), sendo encontrado em altas concentrações no soro e no líquido sinovial de pacientes com a doença (SCOTT *et al.*, 2010; CAO *et al.*, 2007; DOAN & MASSAROTTI, 2005; PANAYI, 2005; WEYAND & GORONZY, 1999).

3.2. Artrite induzida em ratos por colágeno tipo II (CIA)

O CII é evidentemente o antígeno primário na CIA e é provável que também tenha importância destacada na AR, por se tratar de um dos componentes mais abundantes da cartilagem articular (NAKAMURA, 2000). Anticorpos anti-CII (AACII) são detectados no líquido sinovial (HIETALA *et al.*, 2004; CREMER *et al.*, 1998), enquanto células B estão presentes na membrana sinovial (CREMER *et al.*, 1998). Além disso, a artrite induzida em ratos por CII (CIA) é um modelo experimental de autoimunidade (KIM *et al.*, 2012; BRAND *et al.*, 2003; MYERS *et al.*, 1997; GRIFFITHS, 1988; STUART *et al.*, 1988; TRENTAN *et al.*, 1977) que gera uma poliartrite erosiva (BRAND *et al.*, 2003; CREMER *et al.*, 1998; STUART *et al.*, 1988) e tem sido estudado intensivamente por causa de suas semelhanças com a AR (KIM *et al.*, 2012; HIETALA *et al.*, 2004; CREMER *et al.*, 1998; MYERS *et al.*, 1997; TRENTAN *et al.*, 1977). A transferência de AACII também é capaz de induzir a AR, já que esses anticorpos se ligam à cartilagem normal ativando o sistema complemento (HIETALA *et al.*, 2004).

No modelo CIA os sintomas em ratos e camundongos têm início cerca de 21 dias após a injeção de CII na dose usualmente utilizada (TRENTAN *et al.*, 1977). De acordo com STUART *et al.* (1988), a lesão inicial observável é a deposição de fibrina na membrana sinovial no 5º dia após a imunização. No 12º dia observa-se intensa deposição de fibrina e hiperplasia do tecido, e no 19º dia começa a infiltração de células mononucleares e polimorfonucleares. A inflamação é tão rápida que a destruição da cartilagem e a erosão óssea ocorrem em poucos dias (STUART *et al.*, 1988). As principais características comuns conhecidas entre esse modelo e a AR são sinovite, formação progressiva de *pannus*, erosão marginal do osso e destruição da cartilagem (KIM *et al.*, 2012; MYERS *et al.*, 1997; STUART *et al.*, 1988).

3.3. Atividades aminopeptidásica e epóxido-hidrolase na AR

O papel de enzimas na etiologia de doenças inflamatórias tais como a AR e a osteoartrite tem sido foco de investigações há várias décadas (TU *et al.*, 2008; XUE *et al.*, 2007; LEE & MURPHY, 2005). Duas metaloenzimas dependentes de zinco (PHAM *et al.*, 2007; PENNING *et al.*, 2002; FOULON *et al.*, 1999; RAWLINGS *et al.*, 1998) parecem exibir concomitantemente atividades hidrolíticas sobre L-arginil- β -naftilamida (ArgNA) e sobre o leucotrieno (LT)-A₄. São elas a LT-A₄-hidrolase (LT-A₄-H) (EC 3.3.2.6) e a aminopeptidase

básica (APB) (EC 3.4.11.6) (GRICE *et al.*, 2008; LIANG *et al.*, 2007; MANTLE *et al.*, 1999; RAWLINGS *et al.*, 1998; RUDBERG *et al.*, 2002; FITZPATRICK *et al.*, 1994).

A APB hidrolisa preferencialmente resíduos básicos (arginina e lisina) (HUI *et al.*, 2006; PIESSE *et al.*, 2004; FOULON *et al.*, 1999; RAWLINGS *et al.*, 1998) e é estruturalmente semelhante à LT-A4-H (33% de identidade e 48% de similaridade), também exibindo essa atividade (PENNING *et al.*, 2002; FOULON *et al.*, 1999; CADEL *et al.*, 1997). Não está esclarecido se haveria interferência recíproca dos substratos peptídico e eicosanóide em cada uma das atividades catalíticas da APB. MANTLE *et al.* (1999) sugerem que alterações nos LTs geram alterações na atividade da APB. Outras atividades aminopeptidásicas, especificamente a neutra e a dipeptidil peptidase IV (DPPIV) já foram relacionadas com a etiologia e desenvolvimento de alterações artríticas no modelo CIA (YAMASAKI *et al.*, 2012). A potencial importância da atividade APB na AR estaria relacionada com sua participação no processamento de peptídeos (HWANGA & HOOKA, 2008), provavelmente associada com a maturação pós-translacional na rede trans-Golgi, e em processos de regulação na membrana plasmática, o que inclui hidrólise extracelular de vários potenciais substratos peptídicos de relevância fisiológica, além da participação nas etapas finais de processamento de precursores de hormônios (PHAM *et al.*, 2007). No presente momento, a relevância das duas funções catalíticas da APB continua a ser uma questão em aberto (PHAM *et al.*, 2007; PIESSE, *et al.*, 2002, FOULON *et al.*, 1999), mas sua ação em ampla faixa de pH demonstra sua adaptabilidade a vários sub-compartimentos celulares e seu envolvimento em um amplo espectro de fenômenos fisiológicos (FOULON *et al.*, 1999), no qual se inclui os processos inflamatórios (PHAM *et al.*, 2007; FOULON *et al.*, 1999).

A **Figura 1** ilustra a possível relação da bifuncionalidade catalítica sobre substrato peptídico e substrato epóxido da EC 3.3.2.6, na qual se observa que quando o substrato LT-A4 (ácido 5,6-óxido-7,9-*trans*-11,14-*cis*eicosatetraenóico) e um substrato peptídico são alinhados nas suas porções de ácido carboxílico, a adição de água ocorre provavelmente em pelo menos duas regiões diferentes da enzima e que, portanto, o local de hidrólise dos dois substratos ocorre em regiões diferentes da enzima. (ANDERSON *et al.*, 2009).

Figura 1. Análise bidimensional da atividade hidrolítica de LT-A4-H sobre substrato epóxido LT-A4 e sobre substrato peptídico, conforme proposto por DE OLIVEIRA *et al* (2011).

É reconhecido que LT-A4-H de humanos e roedores é uma enzima solúvel e monomérica (ZAITSU *et al.*, 2000; RAWLINGS *et al.*, 1998), mas há pelo menos um relato de atividade LT-A4-H ligada à membrana em hepatócitos (GUT *et al.*, 1987). Além da atividade epóxido hidrolase sobre LT-A4, a LT-A4-H também parece exibir atividade sobre ArgNA, o substrato sintético preferencial da APB (GRICE *et al.*, 2008). Ambas as atividades catalíticas da LT-A4-H são inibidas por cátions divalentes e a atividade de aminopeptidase é estimulada por ânions monovalentes, incluindo cloreto (LIANG *et al.*, 2007; RUDBERG *et al.*, 2002; RAWLINGS *et al.*, 1998;). A LT-A4-H parece sofrer inativação suicida (de ambas atividades: epóxido e aminopeptidásica) quando exposta ao seu substrato lipídico LT-A4 (RAWLINGS *et al.*, 1998; FITZPATRICK *et al.*, 1994).

Embora pareça óbvia a potencial importância da atividade LT-A4-H na AR, por sua ação decisiva na formação de LT-B4 (ácido 5[S],12[R]-dihidroxi-6,14-*cis*-8,10-*transeicosatetraenóico*), ainda são raros os estudos abordando esta questão (ANDERSON *et al.*, 2009). Por outro lado, é necessário avaliar a possível inter-relação das atividades catalíticas sobre ArgNA e LT-A4 na AR, pois isto ajudaria a identificar possíveis alterações na formação de LT-B4, a inferir o papel de substratos peptídicos suscetíveis e a revelar um possível padrão de bifuncionalidade catalítica alterado nesta doença. O envolvimento da LT-A4-H com a AR, por meio da formação de LT-B4 é uma hipótese atraente, pois o LT-B4 é um potente mediador pró-inflamatório sintetizado por células imunes, como eosinófilos, neutrófilos e macrófagos, o qual estimula a produção de várias citocinas (PENNING *et al.*, 2002), sendo reconhecidamente um fator quimiotático potente durante o início da inflamação (RYAN & GODSON, 2010; HAEGGSTRÖM, 2000), além de promover degranulação, aumento da liberação de enzimas lisossômicas e produção de superóxidos por neutrófilos (FORD-HUTCHINSON, 1990; SAMUELSSON *et al.*, 1987). Sabe-se que a via de síntese do

LT-B4 tem três fatores cruciais. O primeiro relacionado com a formação de ácido araquidônico, onde as cicloxigenases (COX) oferecem uma alternativa para a 5-lipoxigenase (5-LO), enzima chave na síntese de LT-B4, gerar prostaglandinas. A 5-LO incorpora um grupo hidropoxi ao carbono 5 do ácido araquidônico, formando o ácido 5-hidropoxieicosatetraenóico, que é precursor do LT-A4. O LT-A4 pode ser convertido em LT-B4 por hidrólise, ou em LT-C/D/E4 por conjugação com glutatona. Assim, outro ponto crucial relaciona-se com a LT-C4 sintase, a qual gera LT-C/D/E4. Um último fator correlaciona-se com a ação da LT-A4-H, a qual gera LT-B4 a partir da hidrólise de LT-A4 (HAEGGSTRÖM & WETTERHOLM, 2002; PENNING *et al.*, 2002; FOULON *et al.*, 1999). Sobretudo, a bifuncionalidade catalítica da APB/LT-A4-H e o seu significado fisiopatológico ainda são pouco conhecidos.

4. OBJETIVO

Analisar a inter-relação entre LT-A4-H, APB, LT-B4 e o desenvolvimento e a resistência à indução da AR no modelo CIA em ratos.

5. ESTRATÉGIAS DE ESTUDO

- Classificar e agrupar os animais experimentais (ratos) em controles, artríticos e resistentes à indução de artrite no modelo CIA, segundo a formação de edema artrítico, eritema, cianose e título de AACII no plasma e teor de TNF- α no soro;
- Nos homogenatos do tecido sinovial (TS) de animais controles sadios:
 - identificar e quantificar a expressão gênica das proteínas EC 3.3.2.6 e EC 3.4.11.6, por meio da reação quantitativa em tempo real em cadeia da polimerase (qPCR);
- No plasma, líquido sinovial (SY), e frações solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM) do TS e de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de animais de todos os grupos:

- quantificar proteína para normalizar o cálculo das atividades APB e desidrogenase láctica (LDH), este último um marcador de FS;
- quantificar a atividade APB, por medida espectrofluorimétrica da hidrólise de L-arginina β -naftilamida (ArgNA);
- padronizar, comparar e eleger a metodologia mais adequada, entre cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e ensaio imunoenzimático (EIA), e utilizá-la para a quantificação do teor de LT-B4 e da atividade LT-A4-H.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Animais e tratamentos

Ratos Wistar, adultos, machos, 160-180g, mantidos com comida e água *ad libitum* e sob condições controladas, em gaiolas com até 4 animais, alojadas em estante climatizada (25°C, umidade relativa 65,3 $\pm$ 0.9%), com fotoperíodo de 12h:12h claro:escuro (com início do período claro as 6:00 da manhã), foram submetidos aos procedimentos descritos a seguir, aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan, sob protocolo nº 682/09.

Com base no método de CREMER (1998), aqui modificado, 4 mg de CII de galinha (Sigma, USA) diluído em 1 mL de ácido acético 0,01M e emulsificado em mesmo volume de adjuvante incompleto de Freund (Sigma, USA) (concentração final = 2 mg de CII / mL ácido acético 0,01M e adjuvante) foi administrado em parte dos animais num volume de 200 μ L (dose: 0,4 mg / 160-180 g massa corporal), via intradérmica (id), no primeiro terço proximal da cauda. Outros animais (controles) receberam 0,9% NaCl no mesmo volume, via e local supracitados. Todos os animais que receberam a emulsão ou salina foram previamente anestesiados com solução de cetamina (3,75%) (Fort Dodge, USA) e xilazina (0,5%) (Vetbrands, Brasil) em dose de 0,2 mL / 100 g de massa corporal, via intraperitoneal (ip). Todos esses procedimentos supracitados, assim como a avaliação do edema, eritema e cianose, e coleta de material foram realizados no período matinal.

6.2. Avaliação do edema das patas

Foram observados os aspectos de eritema e cianose e quantificada, com um paquímetro (Mitutoyo, EUA), a espessura dorso-plantar das patas posteriores na região do metatarso. Ambas as patas foram medidas e calculou-se a média da espessura para cada animal. A medida dessa espessura foi realizada em dois momentos: no dia da indução por CII nos grupos CIA e injeção de NaCl nos controles, e no dia da eutanásia e coleta de material para ambos os grupos.

6.3. Coleta de material

No 41º dia após a indução, os animais foram anestesiados, com as mesmas drogas e doses descritas no item 6.1, e submetidos à exsanguinação por punção cardíaca com seringas heparinizadas e não heparinizadas. Parte do sangue heparinizado foi centrifugado a 5.000 rpm, por 10 min, a 4°C para separar o plasma. Outra parte do sangue heparinizado foi destinada à obtenção de PBMCs. O soro foi obtido do sangue não heparinizado, após 45 min, a 37°C, e centrifugação a 200 X g, por 10 min, para a obtenção do soro. Soro e plasma foram armazenados a -20°C e utilizados, em até 10 dias, respectivamente para as medidas de TNF- α , teor proteico, atividades APB e LT-A4-H e título de AACII. O SY e o TS foram retirados dos joelhos da seguinte forma: a cavidade articular foi aberta, o ligamento patelar foi cuidadosamente removido e, então, 200 μ L de NaCl 0,9% estéril foram injetados intra-articularmente, em cada joelho, com seringas com agulhas ultrafinas (0,45x13 mm). Subsequentemente, o SY, assim diluído, foi aspirado com as mesmas seringas. Depois dessa aspiração, utilizando uma pinça fina e lâmina, o TS foi removido. O TS consistiu da membrana sinovial, juntamente com o tecido conjuntivo e a almofada de gordura da cápsula articular, após a remoção cuidadosa do tecido adiposo ao redor da patela. O SY foi armazenado a -20°C e utilizado em até 10 dias para as medidas do teor proteico e atividades APB e LT-A4-H. O TS também foi armazenado a -20°C e submetido, em até 10 dias, ao fracionamento previsto (FS e FM). Mediante as medidas da espessura das patas, dos níveis de TNF- α no soro e do título de AACII no plasma, os animais foram subdivididos em dois grupos: Artríticos e Resistentes (que não desenvolveram artrite). Após os procedimentos supramencionados os animais foram eutanasiados por decapitação.

6.4. Obtenção de Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMCs)

Baseado no relato de GRAGE-GRIEBENOW *et al.* (1997), o sangue heparinizado foi cuidadosamente depositado sobre uma solução de Percoll (densidade = 1,077 g / mL) (GE – Healthcare, USA) com PBS (56%); para cada 5 mL de sangue coletado foi usado 3 mL da solução de Percoll e PBS (56%), sendo centrifugado a 1.000 X g, por 40 min, a 25°C. A camada de PBMCs (segunda faixa de cima para baixo, aspecto esbranquiçado) foi retirada do tubo com pipetas Pasteur e transferida para microtubos identificados para a realização de contagem destas células.

6.4.1. Contagem de PBMCs

A quantificação do número total de PBMCs foi realizada em alíquotas de 20 µL de suspensão de células diluídas em líquido de Turk (1:20, v/v), em câmara de Neubauer, ao microscópio óptico.

6.4.2. Viabilidade de PBMCs

A viabilidade celular foi avaliada utilizando 40 µL de suspensão de células diluídas em Tripan (v/v), em câmara de Neubauer, ao microscópio óptico.

6.5. Obtenção da FS e da FM do TS e de PBMCs

O TS dos joelhos de um mesmo animal foi homogeneizado em tampão 10mM Tris-HCl, pH 7,4, (0,1 g de tecido/ 3 mL), por 3 min a 15.000 rpm (Polytron-Aggregate, Kinematica) e ultracentrifugado a 100.000 X g por 35 min (Hitachi modelo HIMAC CP60E). O sobrenadante corresponde a FS. Os pellets foram lavados duas vezes com o mesmo tampão (ultracentrifugação a 100.000 X g por 35 min), homogeneizados por 3 min a 800 rpm (homogeneizador Tecnal TE 099), em mesmo volume de tampão 10mM Tris-HCl, pH 7,4, acrescido de Triton X-100 (0,1%). Em seguida, os homogenatos foram ultracentrifugados a 100.000 X g por 35 min. Os sobrenadantes resultantes desta última ultracentrifugação correspondem a FM.

As PBMCs ($3,0 \times 10^6$ células/ mL; viabilidade média de 90%) foram sonicadas em tampão Tris-HCl 10mM, pH 7,4, a uma amplitude de 40 por 10 segundos e ultracentrifugadas, conforme o mesmo procedimento descrito no parágrafo anterior, para a obtenção de FS e FM.

Todos os procedimentos foram realizados a 4°C. As FS e FM foram utilizadas para determinar as atividades de APB, LT-A4-H, LDH e teor proteico.

6.6. Medida de TNF- α e AACII

O teor de TNF- α no soro e o título de AACII no plasma foram avaliados utilizando kits EIA comerciais (respectivamente, Biosource e Chondrex, USA), segundo as recomendações dos fabricantes.

6.7. Proteína total

Foi medida pelo método de BRADFORD (1976) com o kit Bio-Rad (Hercules, USA), utilizando triplicatas de 40 μ L de amostras de SY e FS (diluída 10 vezes) e FM (diluída duas vezes) de TS e PBMCs, e plasma (diluído 500 vezes), lidas a 630nm em espectrofotômetro leitor de microplaca Bio-Tek Power Wave X® (Bio-Tek Instruments, EUA). O conteúdo de proteína foi interpolado pela comparação com a respectiva curva-padrão obtida com albumina de soro bovino (BSA) (Sigma, St. Louis, USA) dissolvida no mesmo diluente da amostra. Os valores foram utilizados para normalização do cálculo das atividades APB e LDH.

6.8. Medida de LDH

Foi realizada de acordo com o método de BERGMAYER & BRENT (1972). Utilizou-se triplicatas de 3 μ L de amostras de FS e FM de TS e de PBMCs incubados com 297 μ L de tampão 100mM de fosfato, pH 7,4, contendo 200mM de NaCl e 1,6mM de solução de piruvato de sódio e 0,2mM de sal dissódico de nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida (NADH) (Sigma). As leituras foram realizadas espectrofotometricamente a 340nm em leitor de microplaca Bio-Tek Power Wave X®, a primeira no tempo zero e a segunda após 10 min de incubação a 37°C. A atividade LDH foi determinada subtraindo-se o valor da leitura, após 10 min de incubação, do obtido no tempo zero e, então, o resultado foi interpolado por comparação com uma curva-padrão de NADH. A atividade LDH foi expressa como mmol NADH oxidado/min/mg proteína. Os valores foram utilizados para avaliar a eficiência do fracionamento do TS e dos PBMCs.

6.9. Atividade APB

Foi medida com base na quantidade de β -naftilamina liberada pela reação das amostras incubadas com o substrato ArgNA (Sigma). As amostras foram incubadas a 37°C, por 30 min, em microplacas de 96 poços (Corning Inc., New York, USA), num volume final de 275 μ L de solução 0,5mM de substrato em tampão fosfato 0,05M, pH 6,5, contendo 150mM NaCl, 0,02mM puromicina (Sigma) e 0,1 mg BSA/mL. A quantidade de β -naftilamina liberada foi estimada fluorimetricamente, utilizando leitor de microplaca (FL600FA, Bio-Tek), no comprimento de onda de emissão de 460/40nm e comprimento de onda de excitação de 360/40nm. O valor da leitura do “branco” do tempo zero de incubação foi subtraído dos valores do incubado de 30 min e o resultado foi interpolado por comparação com a respectiva curva-padrão de β -naftilamina (Sigma). A atividade catalítica de APB foi expressa como picomoles de substrato hidrolisado/min/mg proteína (ZAMBOTTI-VILLELA *et al.*, 2007).

6.10. Padronização da medida do LT-A4-H

6.10.1. EIA

Amostras incubadas com LT-A4

Baseado na metodologia de LIANG *et al* (2007), 1 μ L de solução LT-A4 (Sigma) (100 μ g/ml) foi diluída em 1499 μ L de tampão HEPES (Sigma) 50mM, pH 7,5, contendo 0,0625% glicerol e 1% dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma). Foram pipetados em cada poço da microplaca (96 poços) (Corning) 50 μ L de amostras de plasma, SY, e FS e FM de TS e de PBMCs e 250 μ L de solução do tampão supracitado contendo LT-A4 (concentração final de LTA4 = 166,66 nM). Essa mistura foi incubada por 10 min em agitador orbital de microplacas a 25°C, sob constante agitação (250 rpm). Após a incubação, 10 μ L de cada incubado foram transferidos para microtubo contendo 190 μ L do tampão de ensaio gelado (EIA buffer) do kit de EIA para LT-B4. Os 290 μ L restantes de cada incubado foram transferidos para microtubos e armazenados a -80°C, para serem posteriormente aplicados em HPLC, do qual se coletou o pico obtido no tempo de retenção (RT) do LT-B4 que, por sua vez, também teve seu conteúdo de LT-B4 medido por EIA.

Amostras sem adição de LT-A4

Foram diluídas na mesma quantidade e forma descrita acima, mas sem a adição de LT-A4, e da mesma forma assim incubadas e submetidas à medida de LT-B4 pelo kit de EIA ou à cromatografia em HPLC, do qual se coletou o pico obtido no RT do LT-B4 que, por sua vez, também teve seu conteúdo de LT-B4 medido por EIA.

Procedimento de EIA

As amostras, obtidas como descrito acima, foram submetidas à leitura de absorbância em $\lambda=412\text{nm}$, conforme instruções do fabricante do kit EIA para LT-B4 (Leukotriene B4 EIA kit; Cayman Chemical, USA). Foram utilizadas duas soluções do tampão HEPES, com e sem LT-A4, ambas sem amostras, submetidas às mesmas condições da incubação supracitadas, para leitura do “branco” da reação contra o “branco” fornecido no kit.

6.10.2. HPLC

Extração de LT-B4 por fase sólida

Em conformidade com instruções do manual do kit de EIA, amostras incubadas ou não com LT-A4 e destinadas à passagem no HPLC foram acidificadas com ácido fórmico 1M ($\text{pH}=3,5$) e aplicadas em microcolunas Sep-Pak C18 (Waters, Irlanda) previamente equilibradas, sequencialmente, com 5 mL de metanol e 5 mL de água deionizada. Após a passagem da amostra, a coluna foi lavada com 5 mL de água deionizada e 5 mL de hexano e mantida 5 min a 25°C . Subsequentemente o LT-B4 foi eluído com 5 mL de etil acetato em 1% de metanol (99:1 v/v), sendo este eluato aliquoteado e seco em SpeedVac (TAKAMOTO *et al.*, 1995). Após secagem, o material foi armazenado a -20°C até sua passagem no HPLC.

Procedimento cromatográfico

Foi utilizada coluna analítica (4,6 mm X 25 cm, partículas de 5 μm de diâmetro) C18 de fase reversa (Shimadzu, Japão). O LT-B4 (Cayman, USA) foi utilizado como padrão para determinação do RT. As amostras desidratadas e armazenadas obtidas na extração por Sep-Pak foram dissolvidas em 130 μL de solução (10 : 10 : 30 : 50) metanol : tetrahidrofurano : acetonitrila : H_2O deionizada e aplicadas na coluna em volume de 40 μL . As condições de análise cromatográfica foram as seguintes: corrida isocrática de 20 min com 100% solução (30 : 30 : 40 : 0,01) metanol : acetonitrila : H_2O deionizada : ácido acético, fluxo de 0,8 mL/min, monitorada a $\lambda=270\text{nm}$ (RUDBERG *et al.*, 2002) com detector UV acoplado ao

equipamento (Shimadzu Prominence, Japão). A quantidade de LT-B4 nas amostras foi determinada pela área dos picos obtidos no mesmo RT do LT-B4 comercial padrão (Cayman Chemical, USA), por interpolação numa curva-padrão (**Figura 2**).

6.10.3. Teor de LT-B4

Foi mensurado por interpolação do valor das áreas dos picos em curva-padrão (**Figura 3**) construída com concentrações conhecidas do padrão LT-B4 cromatografado em HPLC nas mesmas condições das amostras, e por interpolação do valor de leituras de absorbância em curva-padrão (**Figura 4**) construída com concentrações conhecidas de padrão de LT-B4 no kit comercial EIA.

6.10.4. Atividade LT-A4-H

Expressa pela medida (por EIA e HPLC) de LT-B4 (produto de hidrólise do LT-A4 pela LT-A4-H) formado em 1 min por 1 mL de amostra, calculada pelo resultado da subtração do teor de LT-B4 em amostras brutas (sem incubar com LT-A4) do teor de LT-B4 em amostras incubadas com LT-A4.

6.11. Expressão gênica da APB e da LT-A4-H

6.11.1. Extração do RNA

O RNA da suspensão de TS de cada animal controle sadio foi extraído utilizando o RiboPure™ Kit (Applied Biosystems, EUA), conforme recomendado pelo fabricante. Em resumo, a amostra foi homogeneizada sobre gelo com TriReagent® (Applied Biosystems, EUA) (1 mL de TriReagent® para cada 0,05 a 0,1 mg de tecido inicial), em Poly Tron® a 11.000 rpm e, sequencialmente, foram incubadas por 5 min a 25°C e centrifugadas a 12.000 X g, por 10 min a 4°C. Para cada 1 mL de amostra, foi adicionado 200 µL de clorofórmio, misturando em agitador vortex por 15 segundos. As amostras foram incubadas por 5 min a 25°C e depois centrifugadas a 12.000 X g, por 10 min a 4°C. Após centrifugação, o RNA se encontra na fase aquosa, enquanto o DNA e as proteínas estão presentes na interfase e na fase fenol. 400 µL da fase aquosa foram transferidos para um novo tubo, misturados com 200 µL de etanol absoluto (99,9%), homogeneizados no vortex por 15 min e transferidos para um complexo filtro-tubo coletor (fornecido com o kit). O complexo filtro-tubo coletor foi centrifugado a 12.000 X g, por 30 segundos a 25°C; o líquido que escoou para o tubo coletor foi descartado, e o filtro colocado no mesmo tubo coletor; o RNA está ligado ao filtro. Foram

aplicados 500 µL de solução de lavagem (fornecida com o kit) ao complexo filtro-tubo coletor. A lavagem e a centrifugação foram repetidas mais uma vez e o líquido que escoou foi descartado novamente. Então, o complexo filtro-coletor foi centrifugado a 12.000 X g por 30 segundos a 25°C, para remover resíduos da solução de lavagem. O filtro foi transferido para um novo tubo coletor e foram adicionados 100 µL de tampão de eluição (fornecido com o kit) na coluna do filtro, seguido de uma incubação de 2 min a 25°C. Após incubação, o complexo filtro-tubo coletor foi centrifugado a 12.000 X g, por 30 segundos, a 25°C. O RNA recuperado foi armazenado a -20°C.

6.11.2. *Transcrição Reversa (construção da fita de DNA complementar – cDNA)*

A expressão da APB, LT-A4-H e GAPDH foi avaliada utilizando qPCR.

Cada tubo contendo RNA total foi tratado com 1 µL de TURBOTM DNase (2U) para até 10 µg de RNA em 50 µL de reação, por 30 min a 37°C. Foi adicionado EDTA 15mM na solução de RNA, a qual foi aquecida a 75°C, por 10 min, para inativar a DNase. Foram utilizados até 2 µg de RNA (contidos em no máximo 9 µL) para a transcrição reversa utilizando o High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, EUA). Foram adicionados 10 µL de tampão de reação (fornecido com o kit), 1 µL de mix de enzima (fornecido com o kit) e o volume foi completado para 20 µL com água DEPC (dietilpirocarbonato). As amostras foram colocadas no termociclador, por 60 min, a 37°C, seguido por 5 min, a 95°C. Depois disso, as amostras foram armazenadas a -80°C.

6.11.3. *qPCR*

Foi utilizado o sistema Taqman, empregando-se, além dos pares de *primers*, uma sonda que se hibridiza de forma específica com a fita molde de cDNA antes do par de *primers*. As condições do termociclador para a reação de PCR foram: 1 ciclo de 2 min a 50°C, 1 ciclo de 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos: 15 segundos a 95°C e 1 min a 60°C. Foram utilizados *primers* e sonda da APB com ID: Rn 00579477_m1 (Nº de acesso ao GenBank: NM_020216), da LT-A4-H com ID Rn01503878_m1 (Nº de acesso ao GenBank: NM_001030031). Como controle positivo, foi utilizado o GAPDH (Nº de acesso ao GenBank: NM_017008). Todos os *primers* e sondas supracitados são da Life Technologies (Brasil).

No método comparativo, para expressão relativa de um gene-alvo em comparação a um gene de referência e baseado na eficiência dos *primers* (PFAFFL, 2001), a quantidade do gene-alvo foi normalizada a um controle endógeno e calculada em relação ao calibrador, o

qual é a amostra com maior *cycle threshold* (menor expressão gênica) e que foi utilizada como base para os resultados comparativos.

6.12. Análise dos resultados

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente usando o programa computacional GraphPad Prism®. Análise de regressão foi usada para obtenção de curvas-padrão de proteína, NADH, β -naftilamina e LT-B4. O teste “t” de Student foi utilizado para comparar valores de edema da pata e parâmetros entre amostras com e sem incubação com LT-A4 e valores de LDH entre FS e FM. Para comparar valores entre os grupos controle, artrítico e resistente foi utilizada a análise de variância ANOVA, seguida por teste post-hoc Newman-Keuls para múltiplas comparações, quando foram detectadas diferenças no ANOVA. Em todos os cálculos foi adotado o nível crítico $p < 0,05$.

7. RESULTADOS

7.1. Classificação dos animais pela suscetibilidade à indução de artrite

O edema (em mm; n=número de animais, teste t de Student não-pareado bicaudal $p < 0,0017$), bem como o eritema e a cianose, caracterizaram macroscopicamente as patas posteriores dos artríticos. O edema foi encontrado em grau severo ($5,899 \pm 0,037$; n=10) em 60% dos animais tratados com CII. 30% dos animais tratados com CII não apresentaram edema ($4,762 \pm 0,309$; n=10), eritema ou cianose, comparativamente aos controles ($4,745 \pm 0,052$; n=10). O teor de TNF- α (em pg/mL; n=número de animais; ANOVA $p < 0,001$; teste post hoc Student-Newman-Keuls $p < 0,001$) no soro é detectável ($21,1 \pm 1,2$; n=4) somente nos animais com edema artrítico severo, sendo igualmente indetectável nos animais tratados com CII que não apresentaram nenhum grau de edema e nos controles. Os títulos de AACII no plasma (em $\mu\text{g/mL}$; n=número de animais; ANOVA $p < 0,001$; teste post hoc Student-Newman-Keuls $p < 0,001$) são marcadamente elevados tanto nos animais tratados com CII que não apresentaram nenhum grau de edema ($191 \pm 1,5$; n=3), quanto nos que apresentaram

edema artrítico severo ($186 \pm 5,7$; $n=3$), comparativamente aos controles ($0,039 \pm 0,018$; $n=2$). Portanto, considerando o conjunto de critérios supramencionados, puderam ser seguramente agrupados como artríticos os animais tratados com CII que apresentaram edema e níveis detectáveis de TNF- α no soro e como resistentes à indução de artrite os animais tratados com CII que não apresentaram edema.

7.2. Eficiência do fracionamento do TS e de PBMCs

Em todos os grupos sob estudo a atividade LDH (n =número de animais; teste t de Student não-pareado, bicaudal, $p < 0,0001$) foi detectada somente na FS do TS dos animais controles ($0,3633 \pm 0,0071$; $n=6$), artríticos ($0,9383 \pm 0,0094$; $n=6$) e resistentes ($0,8633 \pm 0,0088$; $n=6$) e na FS de PBMCs dos animais controles ($0,4417 \pm 0,01014$; $n=6$), artríticos ($0,1058 \pm 0,001851$; $n=6$) e resistentes ($0,9217 \pm 0,02212$; $n=6$), sendo nula na FM tanto do TS quanto de PBMCs.

7.3. Expressão gênica de APB (EC 3.4.11.6) e de LT-A4-H (EC 3.3.2.6)

A **Figura 2** mostra que os genes da APB (EC 3.4.11.6) e da LT-A4-H (EC 3.3.2.6) são expressos no TS de animais controles sadios.

Figura 2. Expressão gênica relativa de aminopeptidase básica (APB) (EC 3.4.11.6) e LT-A4 hidrolase (LT-A4-H) (EC 3.3.2.6) em tecido sinovial de ratos controles sadios. Número de animais = 2.

7.4. Atividade APB

A **Tabela 1** mostra a atividade APB no plasma, SY e FS e FM do TS e de PBMCs. Comparado aos controles esta atividade é menor no plasma e SY e maior na FM de PBMCs nos resistentes, sendo maior na FS e FM do TS dos animais artríticos. A atividade APB na FS de PBMCs é menor em animais artríticos-CIA e resistentes-CIA, em relação aos controles.

Tabela 1 - Atividade APB no plasma, líquido sinovial (SY), frações solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM) do tecido sinovial (TS) e de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de ratos controles, artríticos e resistentes.

Amostras	Controle	Artrítico	Resistente	ANOVA
Plasma	136 $\pm$ 4 (8) ^a	140 $\pm$ 6 (9) ^a	121 $\pm$ 3 (9) ^b	p= 0,0159
SY	793 $\pm$ 45 (8) ^a	714 $\pm$ 135 (8) ^a	398 $\pm$ 45 (5) ^b	p= 0,0397
FS – TS	1583 $\pm$ 211 (5) ^a	2650 $\pm$ 313 (7) ^b	1159 $\pm$ 203 (9) ^a	p= 0,0014
FM – TS	3727 $\pm$ 663 (6) ^a	6887 $\pm$ 997 (6) ^b	4573 $\pm$ 332 (6) ^a	p= 0,0192
FS – PBMCs	1162 $\pm$ 96 (7) ^a	430 $\pm$ 20 (7) ^b	484 $\pm$ 99 (6) ^b	p= 0,0046
FM – PBMCs	347 $\pm$ 38 (9) ^a	329 $\pm$ 31 (9) ^a	773 $\pm$ 71(6) ^b	p< 0,0001

Valores são média $\pm$ EPM. Número de animais entre parênteses, valores de cada animal medidos em duplicata. Análise de variância ANOVA, Student-Newman-Keuls, p<0,05: Controle vs Artrítico vs Resistente para uma mesma amostra (letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa).

7.5. Teor de LT-B4 e atividade LT-A4-H

Padronização da medida

A **Figura 3** ilustra uma corrida cromatográfica típica do padrão LT-B4 (em vermelho) e de material biológico (em preto). Em cada corrida foram coletadas, em *pool*, frações no intervalo de 11,5 a 13,5 min perfazendo um total de 1,6 mL, sendo seco e assim mantido a -80°C até ser utilizado.

Figura 3. Corrida típica em HPLC (C18 de fase reversa, corrida isocrática de 20 min com 100% solução de 30 : 30 : 40 : 0,01 metanol : acetonitrila : H₂O deionizada : ácido acético, monitorada em $\lambda = 270$ nm, num fluxo de 0,8 mL/min) de padrão LT-B4 33,33 pg/mL (0,4 μ M) (em preto) e amostra de líquido sinovial de animal artrítico incubado com LT-A4 (em vermelho). O mesmo aspecto ocorreu para as demais amostras e grupos sob estudo.

A **Figura 4** ilustra a curva-padrão relacionando áreas dos picos obtidos com as concentrações conhecidas de LT-B4 injetadas no HPLC. O teor desconhecido de LT-B4 em amostras foi obtido por interpolação dos valores de área dos picos obtidos no mesmo RT do LT-B4 padrão.

Figura 4. Regressão linear entre níveis de LT-B4 e áreas dos picos correspondentes no HPLC. Slope= $0,7496 \pm 0,0383$, $r^2=0,9922$, $p=0,0003$.

A **Figura 5** ilustra a curva-padrão do EIA relacionando a leitura de absorbância em $\lambda=412\text{nm}$ (kit) com concentrações de LT-B4 em pg/mL. O teor desconhecido de LT-B4 em amostras foi obtido por interpolação dos valores de absorbância obtidos no EIA.

Figura 5. Regressão linear entre níveis de LT-B4 e valores de absorbância em $\lambda=412\text{nm}$ obtidos no EIA. Slope= $0,0046 \pm 0,0003$, $r^2=0,9923$, $p=0,0038$.

A **Figura 6-I** ilustra a análise de regressão entre valores de concentrações de LT-B4 padrão dos picos obtidos no HPLC que foram medidos no EIA, mostrando a ausência de correlação e, portanto, que algum fator existente nos picos coletados e secos interfere na qualidade do EIA. A **Figura 6-II** ilustra a análise de regressão entre valores de concentrações de LT-B4 dos picos obtidos no HPLC e que foram medidos no EIA e de medida direta no EIA de todas as amostras avaliadas neste estudo, confirmando a ausência de correlação observada na **Figura 6-I** e a existência de fator interferente na qualidade do EIA nos picos coletados do HPLC e secos.

Figura 6. Análise de regressão comparativa. Em (I), padrão LT-B4 coletado nos picos do HPLC medido por área do pico versus medido por EIA; slope= $0,0006 \pm 0,0006$, $r^2=0,3280$, $p=0,4273$. Em (II), teor de LT-B4 dos picos obtidos no HPLC medidos no EIA versus medida direta no EIA de todas as amostras avaliadas neste estudo antes e após passagem no HPLC ($n=36$); slope= $-0,3592 \pm 0,8776$, $r^2=0,0083$, $p=0,6867$.

Embora tenha sido evidenciado na **Figura 6** que algum interferente afeta a medida por EIA nos picos coletados do HPLC, a **Figura 7** mostra que há consistente correlação linear entre as concentrações de LT-B4 obtidas pela área dos picos do HPLC e as concentrações de LT-B4 obtidas pelo EIA em todas as amostras avaliadas neste estudo, indicando que ambas as metodologias são eficazes na medida do teor de LT-B4.

Figura 7. Regressão linear entre os níveis de LT-B4 em todas as amostras sob estudo (n=36), medidos por área do pico do HPLC e por EIA; slope=1,106±0,1207; $r^2=0,7566$; $p<0,0001$.

A **Tabela 2** mostra os níveis do conteúdo de LT-B4. De um modo geral, como esperado pela correlação (**Figura 7**), há equivalência entre os valores de concentração de LT-B4 obtidos pela medida da área do pico das corridas em HPLC e pela medida direta por EIA, tanto nas amostras incubadas, como nas sem incubação com LT-A4. Ambos os valores obtidos por EIA foram usados para calcular a atividade LT-A4-H (**Tabela 3**). Os valores de EIA sem incubação com LT-A4 refletem o conteúdo de LT-B4 endógeno das amostras, o qual comparado aos controles é maior no SY e FM do TS e menor na FS de TS e na FM de PBMCs de artríticos e resistentes, e menor na FS de PBMCs de resistentes (Tabela 2).

Tabela 2 – Níveis de LT-B4 (pg/mL), medidos por área dos picos do HPLC e por EIA direto, nas amostras de plasma, líquido sinovial (SY), e frações solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM) do tecido sinovial (TS) e de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de ratos controles, artríticos e resistentes, incubadas (inc) ou não (s-inc) com LT-A4.

Amostras			Controle	Artrítico	Resistente	ANOVA
PLASMA	s-inc	HPLC	144,166±3,998 ^a	179,679±2,221 ^b	166,335±10,255 ^{ab}	p=0,0271
		EIA	145,38±0,646 ^a	211,92±20,778 ^b	213±12,46 ^b	p=0,0223
	inc	HPLC	161,843±3,939 ^{a*}	452,467±14,773 ^{b****}	160,896±3,722 ^a	p<0,0001
		EIA	215,7±30,3	312,3±6,3 ^o	221,4±28,8	p=0,1126
SY	s-inc	HPLC	78,059±11,817	73,153±4,878	75,277±10,171	p=0,8779
		EIA	28,32±3,696 ^a	55,2±6,06 ^b	53,76±8,58 ^b	p=0,0214
	inc	HPLC	89,575±1,723 ^a	86,384±2,049 ^a	515,347±15,422 ^{b**}	p<0,0001
		EIA	70,83±8,712 ^{ooo****}	126,42±34,5 ^{oo}	169,2±16,236 ^o	p=0,0577
FS-TS	s-inc	HPLC	37,665±4,998 ^a	49,908±9,373 ^b	48,941±16,340 ^a	p=0,7208
		EIA	403,84±7,2 ^{aooo}	145,2±26,22 ^b	183,6±56,04 ^b	p=0,0090
	inc	HPLC	103,845±4,705 ^{a*}	108,249±1,317 ^{b****}	64,241±1,039 ^c	p=0,0030
		EIA	597,9±34,5 ^{ao}	275,76±19,38 ^{bo}	360,6±18,6 ^{boo}	p=0,0016
FM-TS	s-inc	HPLC	35,999±6,663 ^a	238,997±7,575 ^b	59,862±0,145 ^a	p=0,0003
		EIA	95,4±0,6 ^{ao}	158,1±3,9 ^{bo}	119,4±0,6 ^{cooo}	p=0,0007
	inc	HPLC	68,688±3,093 [*]	269,401±1,890	131,357±0,928 ^{****}	p<0,0001

		EIA	141,96 $\pm$ 13,44 ^{ao}	129,42 $\pm$ 21,78 ^{ao}	308,82 $\pm$ 44,94 ^{b***}	p=0,0093
FS-PBMCs	s-inc	HPLC	206,8 $\pm$ 1,727 ^a	224,7 $\pm$ 0,291 ^b	372,6 $\pm$ 0,7412 ^c	p<0,0001
		EIA	716,3 $\pm$ 14,09 ^{ao}	697,5 $\pm$ 16,8 ^{ao}	436,8 $\pm$ 13,86 ^{bo}	p<0,0001
	inc	HPLC	682,8 $\pm$ 0,3066 ^{a***}	555,3 $\pm$ 17,12 ^{b***}	676,4 $\pm$ 17,02 ^{a***}	p=0,0010
		EIA	571,2 $\pm$ 56,12 ^a	770,7 $\pm$ 16,92 ^{bo}	2973 $\pm$ 31,47 ^{co}	p<0,001
FM-PBMCs	s-inc	HPLC	174,8 $\pm$ 2,265	168,6 $\pm$ 2,891	175,6 $\pm$ 0,1324	p=0,1117
		EIA	304,5 $\pm$ 63,57 ^a	55,5 $\pm$ 5,023 ^{bo}	68,4 $\pm$ 2,078 ^{bo}	p=0,0051
	inc	HPLC	497,5 $\pm$ 0,9772 ^{a***}	542,4 $\pm$ 24,95 ^{a***}	192,2 $\pm$ 3,359 ^{b***}	p<0,0001
		EIA	789,3 $\pm$ 280,5 ^{ao}	248,4 $\pm$ 94,2 ^{bo}	232,8 $\pm$ 7,2 ^{bo}	p<0,001

Valores são média $\pm$ EPM. Número de animais=3; valores de cada animal medidos em duplicata.

Student-Newman-Keuls, p<0,05: Controle vs Artrítico vs Resistente para uma mesma amostra, para valores estimados por HPLC ou EIA, incubada e sem incubar (letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa).

HPLC: *p<0,05; **p<0,008, ***p<0,001 em relação a amostra incubada do mesmo grupo (teste t-Student não pareado, bicaudal).

EIA: **p<0,007; ***p<0,0007 em relação a amostra incubada de um mesmo grupo (teste t-Student não pareado, bicaudal).

Comparação entre as diferentes metodologias (HPLC e EIA) da mesma amostra incubada e sem incubar: °p<0,05; °°p<0,008, °°°p<0,008, teste t-Student não pareado, bicaudal.

A **Tabela 3** mostra a atividade LT-A4-H *in vitro* do plasma, SY e de FS e FM do TS e de PBMCs (calculada pela subtração pareada do valor de cada amostra sem incubação daquele após incubação com LT-A4, obtidos por medida direta no EIA – vide **Tabela 2**). Comparado aos controles, esta atividade é maior no SY e FS de PBMCs e menor na FM de PBMCs de artríticos e resistentes, e maior na FM do TS dos animais resistentes.

Tabela 3 – Atividade LT-A4-H (pg de LT-B4 formado / min/ mL) do plasma, líquido sinovial (SY) e frações solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM) do tecido sinovial (TS) e de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de ratos controles, artríticos e resistentes.

Amostras	Controle	Artrítico	Resistente	ANOVA
PLASMA	7,03±0,26	9,73±1,12	9,84±1,27	p=0,1540
SY	4,26±0,29 ^a	7,12±0,45 ^b	15,11±1,01 ^c	p<0,0001
FS-TS	19,42±2,76	13,06±2,30	17,64±1,55	p=0,2023
FM-TS	4,66±0,01 ^a	0±1,16 ^a	18,94±5,08 ^b	p=0,0060
FS-PBMCs	0±4,20 ^a	7,32±3,37 ^b	253,60±1,76 ^c	p<0,0001
FM-PBMCs	47,88±10,66 ^a	19,32±4,89 ^b	16,44±0,21 ^b	p=0,0306

Valores são média±EPM. Número de animais=3; valores de cada animal medidos em duplicata. Student-Newman-Keuls, p<0,05: Controle vs Artrítico vs Resistente para uma mesma amostra (letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa).

Comparando artríticos versus resistentes, evidenciam-se diferentes níveis do teor de LTB4 na FM do TS e na FS de PBMCs (maiores no AR) (**Tabela 2**), juntamente com níveis distintos de hidrólise de LT-A4 no SY, FM de TS e FS de PBMCs (maiores no RE) (**Tabela 3**).

A **Tabela 4** mostra o resumo das alterações observadas nas atividades APB e LT-A4-H e nos níveis de LT-B4 em ratos artríticos e resistentes no modelo CIA em relação aos controles sadios.

Tabela 4 – Sentido das alterações nos níveis de LT-B4 e de atividades de APB e LT-A4-H em ratos artríticos e resistentes no modelo CIA, relativamente aos controlos sadios.

Amostras	LT-B4		Atividade LT-A4-H		Atividade APB	
	Artrítico	Resistente	Artrítico	Resistente	Artrítico	Resistente
PLASMA	↑	↑	=	=	=	↓
SY	↑	↑	↑	↑	=	↓
FS-TS	↓	↓	=	=	↑	=
FM-TS	↑	↑	=	↑	↑	=
FS-PBMCs	=	↓	↑	↑	↓	↓
FM-PBMCs	↓	↓	↓	↓	=	↑

Atividade LT-A4-H avaliada por EIA e atividade APB avaliada fluorimetricamente.
(=) Sem diferença; (↓) diminuição; (↑) aumento.

8. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo subsidiam a proposta do esquema da **Figura 8**, ilustrando um mecanismo de inter-relação hipotético entre os níveis de LT-B4 e das atividades de LT-A4-H e de APB em ratos artríticos e resistentes no modelo CIA, comparativamente a controlos sadios.

Figura 8 – Esquema ilustrativo dos resultados obtidos na presente dissertação, mostrando alterações nos níveis do conteúdo de LT-B4 e de atividades LT-A4-H e APB em ratos artríticos e resistentes à indução de artrite no modelo CIA. Setas ↑ e ↓ indicam, respectivamente, valores maiores ou menores em relação a ratos controles saudáveis. Linha contínua em azul indica situação em que a alteração no nível de LT-B4 relaciona-se positivamente com a alteração no nível de atividade LT-A4-H. Linha tracejada em preto indica situação em que a alteração no nível de LT-B4 não se relaciona positivamente com a alteração no nível de atividade LT-A4-H. Em lilás ou verde estão assinalados os materiais biológicos onde os níveis de atividade APB são, respectivamente, marcadores de artrite ou resistência. Notar que o sentido das alterações nos níveis do conteúdo de LT-B4 e de atividade LT-A4-H (**Tabela 4**) na maioria dos materiais biológicos examinados não permite a distinção entre artríticos e resistentes, o que, no entanto, é evidenciado pelas diferenças quantitativas mostradas nas **Tabelas 2 e 3**. As linhas contínuas em vermelho destacam o fato de que em todas as situações e materiais em que ocorrem alterações concomitantes nos níveis de atividades LT-A4-H e APB, estas se relacionam inversamente.

8.1. Avaliação da indução da artrite no modelo CIA

O aspecto inflamado do joelho vem sendo frequentemente utilizado como parâmetro de avaliação da presença de artrite (CUZZOCREA *et al.*, 2005; TRENTAM *et al.*, 1977; WESTMAN *et al.*, 2006). O presente estudo mostra que animais artríticos e resistentes no modelo CIA, no início do desenvolvimento da doença, podem ser distinguidos macroscopicamente de acordo com a presença de eritema e/ou cianose e inchaço grave que toma inteiramente ambas as patas traseiras (artríticos), bem como pela total ausência destes sinais (resistentes), condições também já confirmadas pelos aspectos histológicos correspondentes da articulação tíbio-tarsal de ratos submetidos a este mesmo modelo (YAMASAKI *et al.*, 2012). Com base na escala de classificação macroscópica proposta por ERLANDSSON HARRIS *et al.* (1997), todos os animais artríticos selecionados no presente estudo obtiveram a pontuação máxima para as patas traseiras.

O aumento do título de AACII não é um indicativo diferencial da AR. Sabe-se que ocorre em outras doenças e que animais submetidos ao tratamento com CII heterólogo apresentam aumento deste título (ERLANDSSON HARRIS *et al.*, 1997). Embora a transferência passiva de anticorpos contra CII tenha sido descrita como um modelo para induzir artrite semelhante à AR em roedores (NANDAKUMAR, 2010), não havia informação da ocorrência ou não de alteração no título de AACII em animais que não desenvolvessem inflamação típica da artrite no modelo CIA, tal qual agora mostrado no presente estudo. Segundo NANDAKUMAR (2010), a resposta de células B em modelos experimentais de CIA ocorre contra uma série de epítomos da tripla hélice de colágeno. A hipótese proposta é a de que o aumento do título de AACII em ratos imunizados com CII, que desenvolvem ou não inflamação, ocorre porque o colágeno, como uma molécula grande que conteria diferentes epítomos, seria imunorreativo em diferentes graus para diferentes anticorpos contra os seus diferentes epítomos, corroborando então a existência de anticorpos patogênicos e não patogênicos para o CII (NANDAKUMAR, 2010; MORGAN, 1990). Por outro lado, o alto título de AACII em animais resistentes à manifestação da artrite reforça a concepção de que o desencadeamento da doença é multifatorial.

O TNF- α é uma das principais citocinas pró-inflamatórias na AR, sendo encontrado em altas concentrações no soro e líquido sinovial de pacientes com esta doença (MCINNEES *et al.*, 2011; SCOTT *et al.*, 2010; DOAN & MASSAROTTI, 2005). De fato, neste modelo experimental de AR os resultados do presente estudo mostram que a presença de TNF- α em

níveis detectáveis ocorre somente nos animais tratados com CII e que desenvolvem edema artrítico.

8.2. Avaliação do fracionamento do tecido sinovial e de PBMCs

A atividade LDH é bem conhecida como um marcador citosólico (ALPONTI *et al.*, 2011; OLIVO *et al.*, 2008; ZAMBOTTI-VILLELA *et al.*, 2007; MARINHO *et al.*, 2006; OLIVO *et al.*, 2005; GASPARELLO-CLEMENTE *et al.*, 2003; ERLANDSSON HARRIS *et al.*, 1997) e seu maior nível na FS, em comparação com FM, no tecido sinovial e PBMCs, reflete a eficiência do processo de fracionamento aqui utilizado. Assim, o presente estudo é o primeiro a detectar e analisar as atividades APB e LT-A4-H nessas frações separadas do tecido sinovial e de PBMCs.

8.3. Atividade APB

Apesar de ser considerada predominantemente citosólica, a APB foi encontrada associada à membrana no presente trabalho e em outros (FOULON *et al.*, 1999; BALOGH *et al.*, 1998) e também ao complexo de Golgi, onde parece chegar transitando do retículo endoplasmático (BALOGH *et al.*, 1998). No entanto, não há descrição de domínios transmembranais na sua estrutura e uma hipótese é que interaja com um receptor de membrana (FOULON *et al.*, 1999). Intracelularmente, a proteína EC 3.4.11.6 pode estar envolvida no processamento antigênico, por estar presente no proteassoma (HATTORI & TSUJIMOTO, 2004). Os peptídeos gerados pela degradação do proteassoma são transportados para o retículo endoplasmático (HATTORI & TSUJIMOTO, 2004) onde podem se ligar ao MHC II (LI *et al.*, 2005). Além disso, muitos peptídeos do retículo endoplasmático sofrem clivagem do resíduo N-terminal (HATTORI & TSUJIMOTO, 2004) e a APB poderia também atuar nesse compartimento, auxiliando no processamento antigênico. Por outro lado, a APB associada à membrana pode agir sobre peptídeos angiogênicos extracelulares como a calidina (BALOGH *et al.*, 1998) e angiotensina (Ang) III gerando a Ang IV (RUIZ-ORTEGA *et al.*, 2007). A formação de *pannus*, tanto na AR como na CIA, é dependente da angiogênese e tem sido cada vez mais reconhecido que peptídeos são parte do mecanismo que contribui para a inflamação autoimune na AR (KOFFEMAN *et al.*, 2009). Por sua vez, o papel dos polimorfismos na

suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças é cada vez mais relevante para as perspectivas da prática médica atual (CRONSTEIN, 2010).

No presente estudo, foi encontrada atividade APB na fração de membrana do tecido sinovial e esta atividade também está presente na fração de membrana de PBMCs. Uma pergunta a ser feita é se a atividade APB encontrada no líquido sinovial e no plasma deriva do tecido sinovial e/ou PBMCs. Para outra aminopeptidase, a DPPIV, acredita-se que o mecanismo de desprendimento desta proteína da superfície da célula para o plasma é causado por enzimas do plasma (GORRELL *et al.*, 2001).

Na fração solúvel de PBMCs houve decréscimo da atividade APB nos animais artríticos e resistentes. Os animais artríticos apresentaram aumento da APB nas frações solúvel e de membrana do tecido sinovial, o que poderia resultar na formação de Ang IV e agravar a inflamação no local afetado pela artrite, mostrando ser a atividade APB um marcador da artrite e que intracelularmente em PBMCs (na fração solúvel das células) esta atividade pode ser crucial no desencadeamento da doença. Além disso, destaca-se também o decréscimo da atividade APB do líquido sinovial e no plasma e o aumento desta atividade na fração de membrana de PBMCs como uma das peculiaridades dos animais resistentes à indução de artrite e que poderia refletir um mecanismo da resistência ao desenvolvimento da doença e com potenciais implicações prognósticas.

8.4. Níveis de LT-B4 e atividade de LT-A4-H

8.4.1. Por que comparar as medidas de LT-B4 nas metodologias de HPLC e EIA?

Até recentemente, a metodologia usual para a medida de LT-B4 era o HPLC, por permitir o uso de padrões (prostaglandinas B1 e B2) de tempo de retenção similar ao do LT-B4, mas de menor custo e labilidade. Atualmente, há a disponibilidade comercial do LT-B4 a preços mais acessíveis e a possibilidade de seu manuseio mais rigoroso, além do desenvolvimento de kits imunoenzimáticos para sua medida direta. Daí, no presente estudo, a comparação entre ambas as metodologias pretendeu adicionar informações importantes sobre a qualidade e adequação das medidas de LT-B4 proporcionadas por estas metodologias em amostras obtidas sob diferentes circunstâncias fisiopatológicas e de manuseio.

8.4.2. Níveis de LT-B4 medidos pela área do pico obtido em HPLC

A medida de LT-B4 por HPLC, baseada no método de RUDBERG *et al* (2002), foi aprimorada metodologicamente no presente estudo tendo sido adaptada, simplificada e convalidada.

8.4.3. Níveis de LT-B4 medidos por EIA diretamente em material bruto

Observou-se que a quantificação de LT-B4 por esta metodologia propicia valores com elevado grau de correlação com os obtidos pela medida da área do pico obtido da cromatografia em HPLC. Comparativamente ao HPLC, a metodologia EIA, além de também apresentar alta especificidade, dispensa etapas de limpeza (remoção de substâncias interferentes), assim encurtando o tempo e simplificando a análise. Outras vantagens relativas desta metodologia são o menor custo, uso de pequenas quantidades de amostra e facilidade de realizar os procedimentos. Um único inconveniente é que o kit de EIA tem uma vida útil limitada. Assim, comparando os valores de LT-B4 obtidos em cada uma das metodologias usadas, observa-se que os valores do EIA resultaram em diferenças estatísticas mais consistentes entre os grupos que os obtidos por HPLC, o que pode ser atribuído aos procedimentos inerentes ao HPLC (extração em coluna Sep-Pak para minimizar impurezas e secagem, por exemplo). Consequentemente, no presente estudo apenas os valores de LT-B4 obtidos por EIA foram usados nas comparações dos níveis deste leucotrieno e da atividade LT-A4-H entre os grupos animais e com a atividade APB.

8.4.4. Comparação dos níveis de LT-B4 obtidos por EIA do pico de HPLC versus EIA das amostras brutas

Os picos do HPLC de LT-B4 padrão ou das amostras contendo LT-B4 quando coletados e aplicados no EIA não se correlacionam quanto aos valores medidos de LT-B4 por EIA ou medidos por área do pico do HPLC. Mais uma vez, o processo que estas amostras sofrem no procedimento de HPLC antes da aplicação no EIA mostrou-se capaz de alterar a integridade imunogênica do LT-B4.

8.4.5. Significado da medida de LT-B4 em amostras sem incubar e incubadas com LT-A4

No presente estudo foi medido LT-B4 endógeno pré-existente *ex vivo* nas amostras sob estudo e nestas mesmas amostras após incubação *in vitro* com LT-A4. Neste último caso, o teor de LT-B4 pré-existente soma-se ao formado sob a ação hidrolítica de LT-A4-H eventualmente presente em tais amostras. Portanto, a subtração do teor de LT-B4 pré-

existente daquele obtido após incubação com LT-A4 foi utilizada para estimar a atividade LT-A4-H das amostras. Surpreendentemente, neste estudo, por este método, a atividade LT-A4-H foi encontrada na fração de membrana do tecido sinovial e de PBMCs. Pelo nosso conhecimento, como só há um relato anterior (em hepatócitos) sobre atividade LT-A4-H ligada à membrana (GUT *et al.*, 1987), a confirmação e o significado fisiopatológico deste achado requer aprofundamento, em especial uma avaliação por *immunoblot*. Quanto a possíveis especulações sobre este achado, embora a 5-LO tenha sido inicialmente purificada como uma proteína citosólica, atualmente sabe-se que se trata de enzima translocada para o envelope nuclear (BROCK *et al.*, 1997; BROCK *et al.*, 1995) e para corpos lipídicos de eosinófilos, após estimulação (BOZZA *et al.*, 1997). Fosfolipase A2 citosólica (cPLA2) também é translocada para o envelope nuclear (HIRABAYASHI *et al.*, 1999), e COX-1 e COX-2 também estão presentes na membrana nuclear, de modo que, atualmente, é correntemente aceito que a membrana nuclear é o principal local de produção dos eicosanóides. Sabe-se, também, que embora a 5-LO tenha uma expressão limitada a células B, macrófagos, monócitos, mastócitos, neutrófilos, neurônios, eosinófilos e células dendríticas (YOKOMIZO *et al.*, 2001; HEDI *et al.*, 2004), todas as células são fontes potenciais de produção de LT-B4, porque a LT-A4-H é expressa de forma ubíqua e o excesso de LT-A4 gerado pelas células que expressam 5-LO pode difundir-se para células vizinhas que não possuem significativa atividade 5-LO e que, portanto, não possuem também a capacidade de gerar o substrato LT-A4 (YOKOMIZO *et al.*, 2001; HAEGGSTRÖM *et al.*, 2000), mas que possuem LT-A4-H para efetuarem sua conversão em LT-B4, num mecanismo conhecido como biossíntese transcelular (WERZ, 2002). Os neutrófilos, monócitos, linfócitos e hemácias são ricas fontes de LT-A4-H. Em contraste, os eosinófilos têm baixos níveis, enquanto basófilos e plaquetas parecem ser praticamente desprovidos da enzima (HAEGGSTRÖM *et al.*, 2000). O mecanismo molecular e os domínios de 5-LO necessários para a translocação têm sido intensivamente estudados (YOKOMIZO *et al.*, 2001). Em contraste com a 5-LO, há informações limitadas sobre a ativação e eventual translocação de LT-A4-H. Acredita-se que o LT-B4 seja produzido em condições normais principalmente pelos leucócitos. Na inflamação, no entanto, a produção de LT-B4 é incrementada tanto em leucócitos quanto em outras células (YOKOMIZO *et al.*, 2001; HAEGGSTRÖM *et al.*, 2000), o que tem sido explicado pela biossíntese transcelular (CHEN *et al.*, 2010; YOKOMIZO *et al.*, 2001; HAEGGSTRÖM *et al.*, 2000; SALA *et al.*, 1996; SAMUELSSON *et al.*, 1989). Essa biossíntese transcelular pode ser considerada um fenômeno promovido por interações célula-célula e que já foi demonstrado *in vitro* na formação de leucotrienos em

monócitos e linfócitos (JAKOBSSON *et al.*, 1991) e entre neutrófilos e células endoteliais, eritrócitos, plaquetas e lavado do fluido broncoalveolar humano (IVERSEN *et al.*, 1995; MUNAFO *et al.*, 1994; CLAEISSON *et al.*, 1988; MACLOUF *et al.*, 1988).

8.5. Expressão gênica de APB (EC 3.4.11.6) e de LT-A4-H (EC 3.3.2.6)

A existência dos genes para as proteínas EC 3.3.2.6 e EC 3.4.11.6 foi confirmada no tecido sinovial de ratos controles saudáveis. O tecido sinovial e o líquido sinovial retirados dos animais sob estudo contêm, em algum grau, infiltrados leucocitários. Portanto, o conteúdo total de ambas as enzimas no plasma, líquido sinovial e tecido sinovial deve ser ao menos parcialmente derivado destas células, em especial nos animais artríticos.

8.6. Correlações entre os níveis de LT-B4 e as atividades LT-A4-H e APB e seu possível significado na funcionalidade das proteínas responsáveis por estas atividades e na resistência e no desenvolvimento de artrite no modelo CIA

O sentido das alterações nas medidas de hidrólise de LT-A4 e dos níveis de LT-B4 entre artríticos versus resistentes, comparativamente aos controles, relaciona-se positiva e paralelamente em todos os compartimentos sob estudo, exceto na fração de membrana do tecido sinovial e na fração solúvel de PBMCs, evidenciando essas medidas como fatores diferenciais dessas duas condições em relação à condição saudável. Por sua vez, constatou-se que também há diferenças quantitativas entre artríticos versus resistentes quanto aos níveis de hidrólise de LT-A4 e de teor de LTB4 o que distingue essas duas situações. Por outro lado, como sumarizado na Tabela 4, comparando as alterações de hidrólise de LT-A4 versus conteúdo de LT-B4 em relação aos controles, nota-se que no líquido sinovial e na fração de membrana de PBMCs dos artríticos e resistentes e na fração de membrana do tecido sinovial dos resistentes essas alterações ocorrem no mesmo sentido, o que confirma nestes casos o papel primordial desempenhado pelas alterações da LT-A4-H na biossíntese de LT-B4. No entanto, no plasma, na fração solúvel do tecido sinovial e de PBMCs de artríticos e resistentes e na fração de membrana do tecido sinovial de artríticos não há qualquer correlação entre LT-B4 e LT-A4-H, indicando que as alterações na formação de LT-B4 nestes casos envolveriam outros passos da biossíntese e degradação do LT-B4 que não o da atividade LT-A4-H. O

próprio teor de LT-B4 não apresenta um sentido único de alteração em todos os materiais biológicos examinados nos artríticos e resistentes em relação aos controles sadios, ou seja, as alterações dos níveis de LT-B4 podem ter sentidos distintos de acordo com o compartimento biológico em que se realizam as medidas. Comparando artríticos e resistentes, nos compartimentos onde há diferenças entre ambos são observados maiores teores de LT-B4 em artríticos e de hidrólise de LT-A4 nos resistentes. Esse achado é coerente no que se refere ao aumento de LT-B4 (pró-inflamatório) nos artríticos, mas à primeira vista parece paradoxal no que se refere aos resistentes, considerando que a maior hidrólise de LT-A4 deveria levar a um maior teor de LT-B4 nestes animais, comparativamente aos artríticos. O aumento do LT-B4 nos artríticos deve contribuir para a cronicidade da inflamação e ocorre justamente na fração de membrana do tecido sinovial e na fração solúvel dos PBMCs, alvos importantes da doença. Nos resistentes a atividade LT-A4-H está aumentada nos mesmos compartimentos e também no líquido sinovial, enquanto a atividade APB está diminuída na fração solúvel dos PBMCs e no líquido sinovial e inalterada na fração de membrana do tecido sinovial, o que é sugestivo de que a formação de LT-B4 esteja inversamente correlacionada com a atividade APB e que o papel desta última atividade (cujo aumento induz aumento da angiogênese, por exemplo), em relação ao da formação de LT-B4, seja comparativamente mais decisivo no desenvolvimento da artrite. Por sua vez, a comparação das atividades LT-A4-H e APB entre artríticos e resistentes revela que no plasma de animais resistentes e nas frações solúvel e de membrana do tecido sinovial dos artríticos, as alterações observadas na atividade APB não implicam em qualquer alteração na atividade LT-A4-H. Por outro lado, no líquido sinovial dos artríticos e na fração de membrana do tecido sinovial e de PBMCs dos resistentes as alterações observadas na atividade LT-A4-H não implicam em qualquer alteração na atividade APB. Tais constatações sugerem a existência de modulação diferencial da especificidade/eficiência/afinidade catalítica de cada uma destas enzimas sobre os substratos epóxi e peptídico, ou que atuem independentemente com uma única ação catalítica nestes materiais biológicos. Porém, nas situações em que concomitantemente ocorrem alterações da APB e da LT-A4-H, tais alterações relacionam-se eminentemente de modo inverso, corroborando o padrão de bifuncionalidade correntemente descrito tanto para a proteína APB (EC 3.4.11.6) (PHAM *et al.*, 2007; PIESSÉ *et al.*, 2004; CADEL *et al.*, 1997) quanto para a proteína LT-A4-H (EC 3.3.2.6) (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011; HAEGGSTRÖM *et al.*, 2000; FOULON *et al.*, 1999; CADEL *et al.*, 1997). Uma análise estrutural da APB e da LT-A4-H mostrou que diferenças na distribuição de potencial eletrostático entre APB e LT-A4-H podem refletir interações diferentes entre proteína-proteína e entre a proteína e o meio em que

esta está inserida, sendo que a APB apresenta mais partes hidrofóbicas do que a LT-A4-H (PHAM *et al.*, 2007). A diferença entre os potenciais negativos eletrostáticos no sítio catalítico poderia explicar a diferença de especificidade enzimática e entre os seus respectivos substratos (PHAM *et al.*, 2007), implicando na possibilidade de que uma ação catalítica não interfira na outra. Ainda, FUKASAWA *et al* (1999) defende a ausência de atividade epóxi-hidrolase na APB de ratos e humanos, sugerindo que, apesar da grande semelhança estrutural entre as proteínas APB e a LT-A4-H, a APB parece ter evoluído como uma enzima funcional diferente da LT-A4-H.

Quanto ao envolvimento da APB na AR, como já mencionado, poderia ser hipotetizado que estaria relacionado com a angiogênese, pois a calidina (HEFFELFINGER, 2007; BALOGH *et al.*, 1998) e Ang III (RUIZ-ORTEGA *et al.*, 2007), substratos da APB, têm reconhecidas ações na regulação da angiogênese (HEFFELFINGER, 2007). Também se cogita que a APB, ao hidrolisar o quimioatraente de neutrófilos Pro-Gly-Pro (PGP), facilitaria a resolução da inflamação, mas que esta ação também poderia levar ao acúmulo de PGP e neutrófilos (SNELGROVE *et al.*, 2010). No entanto, ainda é prematuro definir um possível papel da APB na AR. No caso da LT-A4-H o envolvimento com a AR parece mesmo relacionar-se com o LT-B4. HASHIMOTO *et al* (2003) quantificaram a expressão gênica dos receptores de LT-B4, BLT1 e BLT2, por RT-PCR e hibridização *in situ*, em tecidos sinoviais de pacientes artríticos, mostrando forte expressão de ambos neste tecido inflamado. MATHIS *et al* (2010) mostraram uma redução da incidência e gravidade da doença, incluindo a proteção contra a perda óssea e da cartilagem, em ratos nocauteados para os receptor BLT2 em modelo de artrite induzida por auto-anticorpos. Maiores níveis de LT-B4 foram encontrados no plasma na fase ativa da AR, quando comparado com a fase inativa e indivíduos saudáveis (XU, 2010). Porém, paradoxalmente, o presente estudo constatou que em alguns compartimentos (fração solúvel do tecido sinovial, fração solúvel de PBMCs só nos resistentes e fração de membrana de PBMCs) o nível de LT-B4 em artríticos e resistentes, ao invés de maior, como nos demais materiais aqui estudados, é relativamente menor que nos controles saudáveis. Este menor nível de LT-B4 na fração solúvel do tecido sinovial nos animais artríticos e resistentes em relação aos controles pode ser relacionado com o aumento concomitante deste nível na fração de membrana do tecido sinovial, sugerindo translocação do citosol para a membrana em resposta à reação inflamatória. Uma possível difusão de LT-B4 para outras células e/ou compartimentos durante o processo inflamatório por sua vez poderia explicar o menor nível deste leucotrieno na fração de membrana de PBMCs dos artríticos e resistentes e na fração solúvel de PBMCs dos resistentes.

Em suma, apesar de seu significado na artrite reumatoide ser ainda pouco conhecido, em certos compartimentos aqui estudados a atividade APB destaca-se como marcadora da resistência e da suscetibilidade ao desenvolvimento de artrite no modelo CIA, característica que também foi constatada para a atividade LT-A4-H e para o conteúdo de LT-B4. As enzimas com atividades APB e LT-A4-H podem exibir cada qual somente uma única dessas atividades catalíticas modulada independentemente, ou ambas as atividades moduladas inversamente sob as situações de artrite e resistência.

9. CONCLUSÕES

O presente estudo mostra que:

1. Níveis elevados de TNF- α , sem alteração nos títulos de AACII e, obviamente, a presença de edema, eritema e cianose caracterizam a presença de artrite no rato submetido ao modelo CIA;
2. LT-A4-H (EC 3.3.2.6) e APB (EC 3.4.11.6) têm expressão gênica no tecido sinovial em animais controles sadios;
3. A atividade APB, o conteúdo de LT-B4 e a atividade LT-A4-H são detectáveis na FS e FM do tecido sinovial e de PBMCs, e no líquido sinovial e plasma de todos os grupos estudados;
4. Considerando custo, praticidade e confiabilidade, a medida do teor de LT-B4 pelo EIA é a mais adequada, comparativamente ao HPLC;
5. Os níveis de LT-B4 medidos após incubação *in vitro* com LT-A4 (substrato) e amostra biológica, após a exclusão dos níveis endógenos de LT-B4 (já formado), mostrou-se uma estratégia eficiente para medida da atividade de LT-A4-H *in vitro* de tais amostras;
6. A atividade APB é marcadora do desenvolvimento da artrite (aumento da APB na FS e FM do tecido sinovial) e da resistência ao desenvolvimento da doença (decréscimo da atividade APB no líquido sinovial e no plasma e aumento na FM de PBMCs) no modelo CIA.

7. Em geral, o sentido das alterações no teor de LT-B4 e na atividade LT-A4-H em relação aos controles é indistinguível entre artríticos e resistentes no modelo CIA, mas quantitativamente tais alterações, compartimento-dependentes, distinguem marcadamente estes dois grupos entre si. Estas características podem ser úteis tanto para subsidiar futuros estudos explorando uma possível utilidade diagnóstica da medida do teor de LT-B4 e da atividade LT-A4-H, como para explorar o papel das diferenças quantitativas de ambas no desenvolvimento ou resistência à artrite;

8. Comparativamente aos controles, alterações nos níveis de LT-B4 podem ser relacionadas diretamente com alterações na atividade LT-A4-H apenas no líquido sinovial e FM de PBMCs de animais artríticos e resistentes e na FM do tecido sinovial dos resistentes, mostrando que a regulação dos níveis de LT-B4 nem sempre depende da atividade de LT-A4-H;

9. LT-A4-H e APB apresentam modulação diferencial de especificidade / eficiência / afinidade catalíticas sobre os substratos epóxi e peptídico, ou atuam independentemente com uma única ação catalítica em certos compartimentos. Porém, nas situações em que alterações em ambas as atividades catalíticas ocorrem concomitantemente, tais atividades relacionam-se inversamente, sugerindo interação ou bifuncionalidade dependente de inibição concorrente de uma delas.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALPONTI, R. F.; FREZZATTI, R.; BARONE, J. M.; ALEGRE, V. D.; SILVEIRA, P. F. Dipeptidyl peptidase IV in the hypothalamus and hippocampus of monosodium glutamate obese and food deprived rats. **Metabolism**. 2011;60:234-242.

ANDERSON, G. D.; KEYS, K. L.; DE CIECHI, P. A.; MASFERRER, J. L. Combination therapies that inhibit cyclooxygenase-2 and leukotriene synthesis prevent disease in murine collagen induced arthritis. **Inflamm Res**. 2009;58:109-117.

BALOGH, A.; FOULON, T.; PICART, R.; DER GARABEDIAN, A.; ROUSSELET, A.; TOUGARD, C.; COHEN, P. Aminopeptidase B: a processing enzyme secreted and associated with the plasma membrane of rat pheochromocytoma (PC12) cells. **J Cell Sci**. 1998;111:161-169.

BERGMEYER, H. U.; BRENT, E. Methods in enzymatic analysis. **London: Academic Press**. 1972; v. 2.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**. 1976;72:248-254.

BRAND, D. D.; KANG, A. H.; ROSLONIEC, E. F. Immunopathogenesis of Collagen Arthritis. **Springer Semin Immunopathology**. 2003;25:3-18.

BROCK, T. G.; MCNISH, R. W.; PETERS-GOLDEN, M. Translocation and leukotriene synthetic capacity of nuclear 5-lipoxygenase in rat basophilic leukemia cells and alveolar macrophages. **J Biol Chem**. 1995;270:21652-21658.

BROCK, T. G.; MCNISH, R. W.; BAILIE, M. B.; PETERS-GOLDEN, M. Rapid import of cytosolic 5-lipoxygenase into the nucleus of neutrophils after in vivo recruitment and in vitro adherence. **J Biol Chem**. 1997;272:8276-8280.

BOZZA, P. T.; YU, W.; PENROSE, J. F.; MORGAN, E. S.; DVORAK, A. M.; WELLER, P. F. Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. **J Exp Med**. 1997;186:909-920.

CADEL, S.; FOULON, T.; VIRON, A.; BALOGH, A.; MIDOL-MONNET, S.; NOEL, N.; COHEN, P. Aminopeptidase B from the rat testis is a bifunctional enzyme structurally related to leukotriene-A4 hydrolase. **Natl Acad Sci Proc USA**. 1997;94:2963-2968.

CAO, Y.; BROMBACHER, F.; TUNYOGI-CSAPO, M.; GLANT, T. T.; FINNEGAN, A. Interleukin-4 regulates proteoglycan-induced arthritis by specifically suppressing the innate immune response. **Arthritis Rheumatoid**. 2007;56:861-870.

CHEN, M.; LAM, B. K.; LUSTER, A. D.; ZARINI, S.; MURPHY, R. C.; BAIR, A. M.; SOBERMAN, R. J.; LEE, D. M. Joint Tissues Amplify Inflammation and Alter Their

Invasive Behavior via Leukotriene B4 in Experimental Inflammatory Arthritis. **J Immunol.** 2010;185:5503-5511.

CLAESSION, H. E.; HAEGGSTRÖM, J. Human endothelial cells stimulate leukotriene synthesis and convert granulocyte released leukotriene A4 into leukotrienes B4, C4, D4 and E4. **Eur J Biochem.** 1988;173:93-100.

CREMER, M. A.; ROSLONIEC, E. F.; KANG, A. H. The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease. **Journal Mol Med.** 1998;76:275-288.

CRONSTEIN, B. N. A personal journey from the joint to the heart. **Arthritis Res Ther.** 2010;12:134.

CUZZOCREA, S.; MAZZON, E.; DI PAOLA, R.; GENOVESE, T.; MUIÀ, C.; CAPUTI, A.P.; SALVEMINI, D. Synergistic interaction between methotrexate and a superoxide dismutase mimetic: pharmacologic and potential clinical significance. **Arthritis Rheum.** 2005;52:3755-3760.

DE OLIVEIRA, E. O.; WANGA, K.; KONG, H.; KIM, S.; MIESSAU, M.; SNELGROVEI, R. J.; SHIM, Y. M.; PAIGEET, M. Effect of the leukotriene A4 hydrolase aminopeptidase augmentor 4-methoxydiphenylmethane in a pre-clinical model of pulmonary emphysema. **Medicinal Chemistry Letters.** 2011;21:6746-6750.

DOAN, T.; MASSAROTTI, E. Rheumatoid arthritis: an overview of new and emerging therapies. **J. Clin Pharmacology.** 2005;45:751-762.

ERLANDSSON HARRIS, M.; LILJESTROM, M.; KLARESKOG, L. Characterization of synovial fluid effusion in collagen-induced arthritis (CIA) in the DA rat; a comparison of histology and antibody reactivities in an experimental chronic arthritis model and rheumatoid arthritis (RA). **Clin Exp Immunol.** 1997;107:480-484.

FITZPATRICK, F. A.; LEPLEY, R.; ORNING, L.; DUFFIN, K. Suicide inactivation of leukotriene A4 hydrolase/aminopeptidase. **Ann N Y Acad Sci.** 1994;744:31-38.

FORD-HUTCHINSON, A. W. Leukotriene B4 in inflammation. **Crit Rev Immunol.** 1990;10:1-12.

FOULON, T.; CADEL, S.; COHEN, P. Aminopeptidase B (EC 3.4.11.6). **Int J Biochem Cell Biol.** 1999;31:747-750.

FUKASAWA, K. M.; FUKASAWA, K.; HARADA, M.; HIROSE, J.; IZUMI, T.; SHIMIZU, T. Aminopeptidase B is structurally related to leukotriene-A4 hydrolase but is not a bifunctional enzyme with epoxide hydrolase activity. **Biochem J.** 1999;339:497-502.

GASPARELLO-CLEMENTE, E.; CASIS, L.; VARONA, A.; GIL, J.; IRAZUSTA, J.; SILVEIRA, P.F.; Aminopeptidases in visceral organs during alterations in body fluid volume and osmolality. **Peptides.** 2003;24:1367-1372.

GORRELL, M. D.; GYSBERS, V.; MCCAUGHAN, G. W. CD26: a multifunctional Integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. **Scand J Immunol.** 2001;54:249–264.

GRAGE-GRIEBENOW, E.; BARAN, J.; LOPPNOW, H.; LOSS, M.; ERNST, M.; HAD, H.; PRYJMA, J. An Fcγ receptor I (CD64)- negative subpopulation of human peripheral blood monocytes is resistant to killing by antigen-activated CD4-positive cytotoxic T cells. **Eur J Immunol.** 1997;27:2358-2365.

GRICE, C. A.; TAYS, K. L.; SAVALL, B. M.; WEI, J.; BUTLER, C. R.; AXE, F. U.; BEMBENEK, S. D.; FOURIE, A. M.; DUNFORD, P. J.; LUNDEEN, K.; COLES, F.; XUE, X.; RILEY, J. P.; WILLIAMS, K. N.; KARLSSON, L.; EDWARDS, J. P. Identification of a Potent, Selective, and Orally Active Leukotriene A4 Hydrolase Inhibitor with Anti-Inflammatory Activity. **J Med Chem.** 2008;51:4150–4169.

GRIFFITHS, M. M. Immunogenetics of collagen-induced arthritis in rats. **Int Rev Immunology.** 1988;4:1-15.

GUT, J.; GOLDMAN, D. W.; JAMIESON, G. C.; TRUDELL, J. R. Conversion of leukotriene A4 to leukotriene B4: catalysis by human liver microsomes under anaerobic conditions. **Arch Biochem Biophys.** 1987;259:497–509.

HAEGGSTRÖM, J. Z.; WETTERHOLM, A. Enzymes and receptors in the leukotriene cascade. **Cell Mol Life Sci.** 2002;59:742-753.

HAEGGSTRÖM, J. Z. Structure, Function, and Regulation of Leukotriene A4 Hydrolase. **Am J Respir Crit Care Med.** 2000;161:S25-31.

HASHIMOTO, A.; ENDO, H.; HAYASHI, I.; MURAKAMI, Y.; KITASATO, H.; KONO, S.; MATSUI, T.; TANAKA, S.; NISHIMURA, A.; URABE, K.; ITOMAN, M.; KONDO, H. Differential Expression of Leukotriene B4 Receptor Subtypes (BLT1 and BLT2) in Human Synovial Tissues and Synovial Fluid Leukocytes of Patients with Rheumatoid Arthritis. **J Rheumatol.** 2003;30:1712-1718.

HATTORI, A.; TSUJIMOTO, M. Processing of antigenic peptides by aminopeptidases. **Biol Pharm Bull.** 2004;27:777-780.

HEDI, H.; NORBERT, G. 5-Lipoxygenase Pathway, Dendritic Cells, and Adaptive Immunity. **J Biomed Biotechnol.** 2004;2004:99-105.

HEFFELFINGER, S. C. The renin angiotensin system in the regulation of angiogenesis. **Curr Pharm Des.** 2007;13:1215-1229.

HIETALA, M.A.; NANDAKUMAR, K. S.; PERSSON, L.; FAHLÉN, S.; HOLMDAHL, R.; PEKNA, M. Complement activation by both classical and alternative pathways is critical for the effector phase of arthritis. **Eur J Immunology.** 2004;34:1208-1216.

HIRABAYASHI, T.; KUME, K.; HIROSE, K.; YOKOMIZO, T.; IINO, M.; ITOH, H.; SHIMIZU, T. Critical duration of intracellular Ca²⁺ response required for continuous

translocation and activation of cytosolic phospholipase A2. **J Biol Chem.** 1999;274:5163-5169.

HOLMDAHL, R.; LORENTZEN, J. C.; LU, S.; OLOFSSON, P.; WESTER, L.; HOLMBERG, J.; PETTERSSON, U. Arthritis induced in rats with nonimmunogenic adjuvants as models for rheumatoid arthritis. **Immunol Rev.** 2001;184:184-202.

HUI, M.; HUI, K. S. A novel aminopeptidase with highest preference for lysine. **Neurochemical Research.** 2006;31:95-102.

HWANGA, S.; HOOKA, V. Zinc Regulation of Aminopeptidase B Involved in Neuropeptide Production. **FEBS Letters.** 2008;582:2527-2531

IVERSEN, L.; KRISTENSEN, P.; NISSEN, J. B.; MERRICK, W. C.; KRAGBALLE, K. Purification and characterization of leukotriene A 4 hydrolase from human epidermis. **FEBS Letters.** 1995;358:316-322.

JAKOBSSON, P. J.; ODLANDER, B.; CLAEISSON, H. E. Effects of monocyte-lymphocyte interaction on the synthesis of leukotriene B4. **Eur J Biochem.** 1991;196:395-400.

KIM, H.; BANG, J.; CHANG, H. W.; KIM, J. Y.; PARK, K. U.; KIM, S.; LEE, K.; CHO, C.; HWANG, I.; PARK, S. D.; HA, E.; JUNG, S. Anti-inflammatory effect of quetiapine on collagen-induced arthritis of mouse. **Eur J Pharmacol.** 2012;678:55-60.

KOBAYASHI, S.; MOMOHARA, S.; KAMATANI, N.; OKAMOTO, H. Molecular aspects of rheumatoid arthritis: role of environmental factors. **FEBS J.** 2008;275:4456-4462.

KOFFEMAN, E. C.; GENOVESE, M.; AMOX, D.; KEOGH, E.; SANTANA, E.; MATTESON, E. L.; KAVANAUGH, A.; MOLITOR, J. A.; SCHIFF, M. H.; POSEVER, J. O.; BATHON, J. M.; KIVITZ, A. J.; SAMODAL, R.; BELARDI, F.; DENNEHEY, C.; VAN DEN BROEK, T.; VAN WIJK, F.; ZHANG, X.; ZIESENIS, P.; LE, .; PRAKKEN, B. A.; CUTTER, G. C.; ALBANI, S. Epitope-specific immunotherapy of rheumatoid arthritis: clinical responsiveness occurs with immune deviation and relies on the expression of a cluster of molecules associated with T cell tolerance in a double-blind, placebo-controlled, pilot phase II trial. **Arthritis Rheum.** 2009;60:3207-3216.

LEE, M. H. & MURPHY, G. What are the roles of metalloproteinases in cartilage and bone damage? **Ann Rheum Dis.** 2005;64:iv44-iv47.

LIANG, A. M.; CLARET, E.; OULED-DIAF, J.; JEAN, A.; VOGEL, D.; LIGHT, D. R.; JONES, S. W.; GUILFORD, W. J.; PARKINSON, J. F.; SNIDER, R. M. Development of a homogeneous time-resolved fluorescence leukotriene B4 assay for determining the activity of leukotriene A4 hydrolase. **J Biomol Screening.** 2007;12:536-544.

MACLOUF, J. A.; MURPHY, R. C. Transcellular metabolism of neutrophil-derived leukotriene A4 by human platelets. A potential cellular source of leukotriene C4. **J Biol Chem.** 1988;263:174-181.

MANTLE, D.; FALKOUS, G.; WALKER, D. Quantification of protease activities in synovial fluid from rheumatoid and osteoarthritis cases: comparison with antioxidant and free radical damage markers. **Clin Chim Acta**. 1999;284:45-58.

MARINHO, C.E.; OLIVO, R.A.; ZAMBOTTI-VILLELA, L.; RIBEIRO-DE-ANDRADE, T. N.; FERNANDES, C.M.; SILVEIRA, P.F. Renal and macrophage aminopeptidase activities in cyclosporin-treated mice. **Int Immunopharmacol**. 2006;6:415-425.

MATHIS, S. P.; JALA, V. R.; LEE, D. M.; HARIBABU, B. Nonredundant Roles for Leukotriene B4 Receptors BLT1 and BLT2 in Inflammatory Arthritis. **J Immunol**. 2010;185:3049-3056.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. **N Engl J Med**. 2011;365:2205-2219.

MORGAN, K. What do anti-collagen antibodies mean? **Ann Rheum Dis**. 1990;49:62-65.

MUNAFO, D. A.; SHINDO, K.; BAKER, J. R.; BIGBY, T. D. Leukotriene A4 hydrolase in human bronchoalveolar lavage fluid. **J Clin Invest**. 1994;93:1042-1050.

MYERS, L.K.; ROSLONIEC, E. F.; CREMER, M. A.; KANG, A. H. Collagen-Induced arthritis, an animal model of autoimmunity. **Life Science**. 1997;61:1861-1878.

NAKAMURA, R.M. Progress in the use of biochemical and biological markers for evaluation of rheumatoid arthritis. **J Clin Lab Analyses**. 2000;14:305-313.

NANDAKUMAR, K. S. Pathogenic antibody recognition of cartilage. **Cell Tissue Res**. 2010;339:213-220.

OKAMOTO, H.; KIIRE, A.; YAMANAKA, H.; KAMATANI, N. Molecular Targets of Rheumatoid Arthritis. **Inflammation & Allergy - Drug Targets**. 2008;7:53-66.

OLIVO, R. A.; NASCIMENTO, N. G.; TEIXEIRA, C. F.; SILVEIRA, P. F.; Methotrexate and cyclosporine treatments modify the activities of dipeptidyl peptidase IV and prolyl oligopeptidase in murine macrophages. **Clin Dev Immunol**. 2008; ID:794050.

OLIVO, R. A.; TEIXEIRA, C. F.; SILVEIRA, P. F. Representative aminopeptidases and prolyl endopeptidase from murine macrophages: comparative activity levels in resident and elicited cells. **Biochem Pharmacol**. 2005;69:1441-1450.

PANAYI, G. S. B cells: a fundamental role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis? **Rheumatology**. 2005;44 Suppl 2:ii3-ii7.

PENNING, T. D.; RUSSELL, M. A.; CHEN, B. B.; CHEN, H. Y.; LIANG, C. D.; MAHONEY, M. W.; MALECHA, J. W.; MIYASHIRO, J. M.; YU, S. S.; ASKONAS, L. J.; GIERSE, J. K.; HARDING, E. I.; HIGHKIN, M. K.; KACHUR, J. F.; KIM, S. H.; VILLANI-PRICE, D.; PYLA, E. Y.; GHOREISHI-HAACK, N. S.; SMITH, W. G. Synthesis of potent leukotriene A(4) hydrolase inhibitors. Identification of 3-[methyl[3-[4-(phenylmethyl)phenoxy]propyl]amino] propanoic acid. **J Med Chem**. 2002;45:3482-3490.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**. 2001;29:e45.

PHAM, V.; CADEL, M.; GOUZY-DARMON, C.; HANQUEZ, C.; BEINFELD, M. C.; NICOLAS, P.; ETCHEBEST, C.; FOULON, T. Aminopeptidase B, a glucagon-processing enzyme: site directed mutagenesis of the Zn²⁺-binding motif and molecular modeling. **BMC Biochemistry**. 2007;8:21.

PIESSE, C.; CADEL, S.; GOUZY-DARMONA, C.; JEANNY, J.; CARRIÈRE, V.; GOIDIN, D.; JONET, L.; GOURDJI, D.; COHENA, P.; FOULON, T. Expression of aminopeptidase B in the developing and adult rat retina. **Experimental Eye Research**. 2004;79:639–648.

RAWLINGS, N.D.; BARRETT, A. J.; WOESSNER, J. F. Handbook of proteolytic enzymes. **Academic Press**. 1998;1022-1029.

ROSENZWEIG, H. L.; JANN, M. M.; GLANT, T. T.; MARTIN, T. M.; PLANCK, S. R.; VAN EDEN, W.; VAN KOOTEN, P. J.; FLAVELL, R. A.; KOBAYASHI, K. S.; ROSENBAUM, J. T.; DAVEY, M. P. Activation of nucleotide oligomerization domain 2 exacerbates a murine model of proteoglycan-induced arthritis. **J Leukoc Biol**. 2009;85:711-718.

RUDBERG, P.C.; THOLANDER, F.; THUNNISSEN, M. M.; SAMUELSSON, B.; HAEGGSTRÖM, J. Z. Leukotriene A4 hydrolase: selective abrogation of leukotriene B4 formation by mutation of aspartic acid 375. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2002;99:4215-4220.

RUIZ-ORTEGA, M.; ESTEBAN, V.; EGIDO, J. The regulation of the inflammatory response through nuclear factor-kappaB pathway by angiotensin IV extends the role of the renin angiotensin system in cardiovascular diseases. **Trends Cardiovasc Med**. 2007;17:19-25.

RYAN, A.; GODSON, C. Lipoxins: regulators of resolution. **Curr Opin Pharmacol**. 2010;10:166–172.

SALA, A.; BOLLA, M.; ZARINI, S.; MULLER-PEDDINGHAUS, R.; FOLCO, G. Release of leukotriene A4 versus leukotriene B4 from human polymorphonuclear leukocytes. **J Biol Chem**. 1996;271:17944-17948.

SAMUELSSON, B.; DAHLÉN, S. E.; LINDGREN, J. A.; ROUZER, C.A.; SERHAN C. N. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. **Science**. 1987;237:1171-1176.

SAMUELSSON, B.; FUNK, C. D. Enzymes Involved in the Biosynthesis of Leukotriene B4. **J Biol Chem**. 1989;264:19469-19472.

SCOTT, D.L.; WOLFE, F.; HUIZINGA, T. W. J. Rheumatoid arthritis. **Lancet**. 2010;376:1094–1108.

SNELGROVE, R. J.; JACKSON, P. L.; HARDISON, M. T.; NOERAGER, B. D.; KINLOCH, A.; GAGGAR, A.; SHASTRY, S.; ROWE, S. M.; SHIM, Y. M.; USSELL, T.; BLALOCK, J. E. A Critical Role for LT-A4-H in Limiting Chronic Pulmonary Neutrophilic Inflammation. **Science**. 2010;330:70–74.

STRIETHOLT, S.; MAURER, B.; PETERS, M. A.; PAP, T.; GAY, S. Epigenetic modifications in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther.** 2008;10:219.

STUART, J. M.; WATSON, W. C.; KANG, A. H. Collagen autoimmunity and arthritis. **FASEB J.** 1988;2:2950-2956.

STUART, J. M.; TOWNES, A. S.; KANG, A. H. Collagen autoimmune arthritis. **Annu Rev Immunol.** 1984;2:199-218.

TAKAMOTO, M.; YANO, T.; SHINTANI, T.; HIRAKU, S. A highly sensitive and selective method for the determination of Leukotriene B4 in human plasma by negative ion chemical ionization/gas chromatography/tandem mass spectrometry. **J Pharm Biomedical Analysis.** 1995;13:1465-1472.

TRENTHAM, D.E.; TOWNES, A. S.; KANG, A. H. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. **J Exp Med.** 1977;146:857-868.

TU, G.; XU, W.; HUANG, H.; LI, S. Progress in the Development of Matrix Metalloproteinase Inhibitors. **Current Medicinal Chemistry.** 2008;15:1388-1395.

WERZ, O. 5-lipoxygenase: cellular biology and molecular pharmacology. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy.** 2002;1:23-44.

WESTMAN, E.; LUNDBERG, K.; ERLANDSSON HARRIS, H. Arthritogenicity of collagen type II is increased by chlorination. **Clin Exp Immunol.** 2006;145:339-345.

WEYAND, C.M.; GORONZY, J.J. HLA polymorphisms and T cells in rheumatoid arthritis. **Int Rev Immunology.** 1999;18:37-59.

XU, S.; LU, H.; LIN, J.; CHEN, Z.; JIANG, D. Regulation of TNF α and IL1 β in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by leukotriene B4. **Rheumatol Int.** 2010;30:1183–1189.

XUE, M.; MARCH, L.; SAMBROOK, P. N.; JACKSON, C. J. Differential Regulation of Matrix Metalloproteinase 2 and Matrix Metalloproteinase 9 by Activated Protein C: Relevance to Inflammation in Rheumatoid Arthritis. **Arthritis & Rheumatism.** 2007;56(9):2864–2874.

YAMASAKI, S. C.; MURARI-DO-NASCIMENTO, S.; SILVEIRA, P. F. Neutral aminopeptidase and dipeptidyl peptidase IV in the development of collagen II-induced arthritis. **Regul Pept.** 2012;173:47-54.

YOKOMIZO, T.; IZUMI, T.; SHIMIZU, T. Leukotriene B4: metabolism and signal transduction. **Arch Biochem Biophys.** 2001;385:231-41.

ZAITSU, M.; HAMASAKI, Y.; MATSUO, M.; KUKITA, A.; TSUJI, K.; MIYAZAKI, M.; HAYASAKI, R.; MURO, E.; YAMAMOTO, S.; KOBAYASHI, I.; ICHIMARU, T.; KOHASHI, O.; MIYAZAKI, S. New induction of leukotriene A (4) hydrolase by interleukin-4 and interleukin-13 in human polymorphonuclear leukocytes. **Blood.** 2000;96:601-609.

ZAMBOTTI-VILLELA, L.; YAMASAKI, S. C.; VILLARROEL, J. S.; ALPONTI, R. F.; SILVEIRA, P. F. Aspartyl, arginyl and alanyl aminopeptidase activities in the hippocampus and hypothalamus of streptozotocin-induced diabetic rats. **Brain Res.** 2007;1170:112-118.

11. ANEXO

Parte desta dissertação foi publicada em 13 de fevereiro de 2011 em 'Regulatory Peptides', artigo em anexo: MENDES, M. T.; MURARI-DO-NASCIMENTO, S.; TORRIGO, I. R.; ALPONTI, R. F.; YAMASAKI, S. C; SILVEIRA, P. F. Basic aminopeptidase activity is an emerging biomarker in collagen-induced rheumatoid arthritis. 2011;167:215–221.

Basic aminopeptidase activity is an emerging biomarker in collagen-induced rheumatoid arthritis

Mariana Trivilin Mendes^{a,b}, Stephanie Murari-do-Nascimento^a, Isis Rossetti Torrigo^a, Rafaela Fadoni Alponi^a, Simone Cristina Yamasaki^a, Paulo Flavio Silveira^{a,*}

^a Laboratory of Pharmacology, Instituto Butantan, Av. Vital Brasil, 1500, 05503-900 São Paulo, SP, Brazil

^b Department of Physiology, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 November 2010

Received in revised form 18 January 2011

Accepted 8 February 2011

Available online 13 February 2011

Keywords:

Aminopeptidase

Rat model

Inflammatory arthritis

Rheumatoid arthritis

Biomarker

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the catalytic activity of basic aminopeptidase (APB) and its association with periarticular edema and circulating tumor necrosis factor (TNF)-alpha and type II collagen (CII) antibodies (AACII) in a rat model of rheumatoid arthritis (RA) induced by CII (CIA). Edema does not occur in part of CII-treated, even when AACII is higher than in control. TNF-alpha is detectable only in edematous CII-treated. APB in synovial membrane is predominantly a membrane-bound activity also present in soluble form and with higher activity in edematous than in non-edematous CII-treated or control. Synovial fluid and blood plasma have lower APB in non-edematous than in edematous CII-treated or control. In peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) the highest levels of APB are found in soluble form in control and in membrane-bound form in non-edematous CII-treated. CII treatment distinguishes two categories of rats: one with arthritic edema, high AACII, detectable TNF-alpha, high soluble and membrane-bound APB in synovial membrane and low APB in the soluble fraction of PBMCs, and another without edema and with high AACII, undetectable TNF-alpha, low APB in the synovial fluid and blood plasma and high APB in the membrane-bound fraction of PBMCs. Data suggest that APB and CIA are strongly related.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is an inflammatory, chronic, systemic and autoimmune disease [1,2] of unknown etiology [1–4] that affects about 1% of the world's population [1,2,5]. It is associated with increased mortality and significant comorbidities and other factors that can specifically affect a patient's quality of life [6,7]. The prominent characteristic of RA is a symmetrical peripheral polyarthritis with bone erosions, mainly of cartilage, and resultant deformity and joint destruction [8]. This process is associated with inflammatory hyperplasia of the synovial membrane, also known as pannus [9], and pathological neovascularization, which occur after the infiltration of inflammatory cells into the synovial membranes [10], as well as an immune response against cartilage components, among them the type II collagen (CII) has been thought to be the most usual [8]. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha has also been found in high concentrations in the serum and synovial fluid of RA patients [1,10].

Abbreviations: AACII, antibody anti-type II collagen; Ang, angiotensin; APB, basic aminopeptidase; BSA, bovine serum albumin; CII, type II collagen; CIA, collagen-induced arthritis; LDH, lactate dehydrogenase; LTA4, leukotriene-A4; LTA4H, leukotriene A4-hydrolase; MF, membrane-bound fraction; NADH, nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; PGP, Pro-Gly-Pro; RA, rheumatoid arthritis; SF, soluble fraction.

* Corresponding author. Tel.: +55 11 7067 9058; fax: +55 11 3726 7222/2061.

E-mail address: pefesil@butantan.gov.br (P.F. Silveira).

The genetic predisposition linked to human leukocyte antigen system has been estimated to contribute with about 50% or less for the development of disease [11]. Thus, several epigenetic factors appear to be involved in the onset of RA, such as DNA methylation, alternative splicing, micro RNAs and histone modifications [11]. Moreover, factors such as infections, smoking, pregnancy, sex hormones and others may lead to autoimmunity [4]. CII is considered the primary antigen in RA, since it is the main constituent of cartilage [2] and because antibodies anti-CII (AACII) have been detected in synovial fluid [5,12], cartilage and B cells present in the synovial membrane of arthritic patients [12]. Furthermore, manifestations of RA have close similarity with those of the experimental model of CII-induced arthritis (CIA), that are: synovitis, progressive pannus formation, marginal erosion of bone and cartilage destruction [5,12,13]. The transfer of AACII is also able to induce RA, because these antibodies bind to normal cartilage and activate the complement system [5]. In the CIA model, symptoms of RA begin about 21 days after the injection of CII [13]. According to Stuart et al. [9], the initial lesion observed in this experimental model of RA is fibrin deposition in the synovial membrane 5 days after immunization. On the 12th day there is an intense deposition of fibrin and tissue hyperplasia. On the 19th day the infiltration of mononuclear and polymorphonuclear cells begins. Inflammation occurs so rapidly that the destruction of cartilage and the marginal erosion of the bone occur in a few days [9].

Regarding the evidences that altered matrix metalloproteinase and other proteins implicated in matrix degradation, cell activation, inflammation and bone collagen degradation products accompany early rheumatoid and osteoarthritis development and can precede the canonical diagnostic detection by several years [14,15], as well as that CD13, an aminopeptidase type enzyme, was histologically expressed strongly in RA synovial tissue lining cells [16], it can be hypothesized that changes of other aminopeptidase hydrolytic activities, such as the basic aminopeptidase (APB) activity, could be important in RA, mainly because APB activity was reported to be increased in the soluble fraction of elicited macrophages [17] and because kallidin [18], leukotriene(LT)-A₄ [19,20] and angiotensin (Ang) III [21], three of the known natural substrates susceptible to hydrolysis by isozymes with APB activity, have recognized actions in regulating angiogenesis [22] and inflammation [23].

To prospect new markers and contribute to elucidate the etiology of RA, this study aims to assess changes in the APB activity of blood plasma, synovial fluid and soluble (SF) and solubilized membrane-bound (MF) fractions from the synovial membrane of the knee and from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), associating this enzyme activity with hind paw edema and with the AACII titer in blood plasma and TNF-alpha levels in blood serum of control and CII-treated rats.

2. Materials and methods

2.1. Animals, treatments and samples

Adult male Wistar rats, weighing 150–160 g, provided by the Animal Facility of the Instituto Butantan, were maintained in polyethylene cages (inside length × width × height = 56 × 35 × 19 cm) with food and tap water *ad libitum*, in a container with controlled temperature of 25 °C, relative humidity of 65.3 ± 0.9% and 12 h:12 h photoperiod light:dark (lights on at 6:00 am). The animals and research protocols used in this study are in agreement with the COBEA (Brazilian College of Animal Experimentation) and were approved by the Ethics Committee of the Instituto Butantan (682/09).

The animals were anesthetized with a solution of ketamine (Ketamine, Syntec, Cotia, São Paulo, Brazil) (3.75%) and xylazine (Calmun, Agener Union, Planalto Paulista, São Paulo, Brazil) (0.5%) at a dose of 0.2 mL/100 g body weight, via intraperitoneal, and then subjected to induction of arthritis by administration of CII from chicken (Sigma, St. Louis, MO, USA) dissolved in 0.01 M acetic acid and emulsified in an equal volume of Freund's incomplete adjuvant (Sigma, St. Louis, MO, USA) (prepared at 4 °C just before use), via a single intradermal dose of 0.4 mg/0.2 mL/animal, into the proximal one-third of the tail (induced animals), or with 0.9% saline at the same scheme of administration (sham induction). On day 41 after treatment, the animals were anesthetized using the same scheme specified above and the thickness of the hind paws were measured in order to evaluate edema. Based on this measurement the following experimental groups were formed: *Control* (all animals submitted to sham induction); *Arthritic* (induced animals with hind paw thickness >7 mm); *Resistant* (induced animals with hind paw thickness similar to control). Thus, blood was withdrawn from the left ventricle with heparinized and not heparinized syringes in order to obtain plasma and serum, respectively. Heparinized blood was centrifuged (at 200 × g for 10 min at room temperature) to separate plasma (supernatant) from the pellet containing PBMCs and other blood cells. The non-heparinized blood was left at room temperature for 10 min and then centrifuged under the same conditions to obtain the serum. The synovial fluid and synovial membrane were subsequently removed from both knees of each animal. The withdrawal of synovial fluid and synovial membrane was performed as follows: 200 µL of 0.9% NaCl was injected intraarticularly into each knee and aspirated with a syringe and,

after such washing, the synovial membrane was excised together with the connective tissue of the joint capsule.

2.2. Separation of PBMCs

According to the method of Maldonado and Curi [24] with modifications as follow: the pellet resulting from the obtainment of blood plasma was reconstituted to the original volume with 0.9% NaCl and then carefully layered on equal volume of Percoll ($\rho = 1.077$ mg/mL) (GE-Healthcare) and subsequently centrifuged (200 × g for 20 min at room temperature). The layer containing the PBMCs was then removed from the tube and washed twice with 0.9% NaCl (1:3 v/v diluted blood cells) and centrifuged again at the same conditions to discard the supernatant.

2.3. Cell counting and viability

PBMCs were resuspended in 0.5 mL of 0.9% NaCl. The total number of PBMCs was assessed in 20 µL aliquots of this suspension diluted with Turk's fluid (1:20, v/v). The cell viability was assessed using 40 µL aliquots of this suspension diluted in equal volume of Trypan. Cell counting was performed in a Neubauer chamber under optical microscopy.

2.4. Evaluation of the canonical signs of RA

2.4.1. Paw edema

Hind paw swelling was quantified by macroscopic measurement of the dorsal–plantar thickness of the hind paws in the region of the metatarsus with a paquimeter (Mitutoyo, Aurora, IL, USA). Both paws were measured and the average thickness was calculated for each animal.

2.4.2. Molecular markers

AACII was measured in blood plasma and TNF-alpha was measured in blood serum with Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) kits purchased from Chondrex (Redmond, WA, USA) and Biosource (Carlsbad, CA, USA), respectively, according to the manufacturer's recommendations.

2.5. Obtaining SF and MF from the synovial membranes and PBMCs

The synovial membranes from both knees of each animal were homogenized in 10 mM Tris–HCl buffer, pH 7.4 (0.1 g tissue/3.0 mL) for 3 min at 15,000 rpm (homogenizer Polytron-Aggregate, Kinematica, Lucerne, Switzerland). PBMCs, resuspended in 0.9% NaCl, were sonicated in 10 mM Tris–HCl, pH 7.4 (3.0×10^6 cells/mL), for 10 s at an amplitude level of 40 microm at a constant frequency of 20 KHz. These samples were then ultracentrifuged at 100,000 × g for 35 min (ultracentrifuge Hitachi model CP60E). The resulting supernatants correspond to SF. The resulting pellets were washed twice with the same buffer and ultracentrifuged at 100,000 × g for 35 min, to assure the complete removal of SF. Subsequently, the pellet was homogenized for 3 min at 800 rpm (homogenizer Tecnal TE 099, Tecnal, Piracicaba, SP, Brazil) with the same volume of the same buffer plus Triton X-100 (0.1%) and ultracentrifuged again (100,000 × g for 35 min). The resulting supernatants correspond to MF. All procedures were carried out at 4 °C.

As a marker for the fractionation procedure, lactate dehydrogenase (LDH) activity was determined, photometrically, at 340 nm, in SF and MF, as previously described [25]. Briefly, samples of 3 µL of SF and MF, in triplicates, were incubated with 297 µL of 100 mM phosphate buffer, pH 7.4, containing 200 mM NaCl and 1.6 mM sodium pyruvate solution (Sigma, St. Louis, MO, USA) and 0.2 mM nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form (NADH) disodium salt (Sigma, St. Louis, MO, USA). Two measurements of absorbance at 340 nm were performed: the first at

zero time and the second after 10 min of incubation at 37 °C. Values of LDH activity ($\text{mM oxidized NADH min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$) were obtained by subtracting the values of the second from that of the first reading, and extrapolated by comparison with a standard curve of NADH.

2.6. Total protein

Total protein was measured photometrically (Bio-Tek Power Wave XR spectrophotometer, Bio-Tek, Winooski, VT, USA), at 630 nm, in triplicates of 40 μL of synovial fluid, plasma (diluted 500-fold) and SF (diluted 10-fold) and MF (diluted 2-fold) from the synovial membrane and PBMCs by the method of Bradford [26], using a Bio-Rad protein assay reagent (Hercules, CA, USA). Protein contents were extrapolated by comparison with standard curves of bovine serum albumin (BSA) in the same diluent.

2.7. APB activity

As previously described by Zambotti-Villela et al. [27], using 25 μL individual samples of blood plasma (205 to 450 μg protein), and synovial fluid (12 to 49 μg protein) and the SF (2.8 to 20 μg protein) and MF (2.6 to 15 μg protein) from the synovial membrane, and 50 μL and 100 μL individual samples respectively of SF (22 to 72 μg protein) and MF (13 to 44 μg protein) from PBMCs, on the basis of the amount of β -naphthylamine (Sigma, St. Louis, MO, USA) released as a result of the enzyme activity of samples incubated at 37 °C for 30 min in 96-well flat bottom microplates (Corning Inc., NY, USA) with prewarmed substrate solution of 0.5 mM L-arginine β -naphthylamide (Sigma, St. Louis, MO, USA) to a final volume of 300 μL in 0.05 M phosphate buffer, pH 6.5, with 150 mM NaCl, 0.02 mM puromycin (Sigma, St. Louis, MO, USA) and 0.1 mg BSA/mL. β -Naphthylamine was estimated fluorometrically using the Bio-Tek FL600FA Microplate Fluorescence/Absorbance Reader, at 460/40 nm emission wavelength and 360/40 nm excitation wavelength. The value of incubates at zero time (blank) was subtracted and the relative fluorescence was converted to picomoles of β -naphthylamine by comparison with a correspondent standard curve. APB activity was expressed as picomoles of hydrolyzed substrate $\text{min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$.

2.8. Data analysis

Data are shown as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) and were analyzed statistically using the GraphPad Instat™ software package. Regression analyses were performed to obtain standard curves of protein, NADH and β -naphthylamine. Student's *t*-test was performed to compare values of LDH between SF and MF. To compare values among the control, arthritic and resistant groups one-way analysis of variance (ANOVA) was performed, followed by Student–Newman–Keuls multiple comparisons test when differences were detected. In all the calculations a minimum critical level of $P < 0.05$ was set.

3. Results

3.1. Induction of arthritis

3.1.1. Development of paw edema

About 40% of the animals submitted to CII treatment did not develop paw swelling. Fig. 1 shows the swelling developed by animals “sensitive” to the treatment with CII relatively to the absence of swelling in control (sham induction) and animals “insensitive” to the treatment with CII.

3.1.2. Molecular markers

Table 1 shows that AACII titer in blood plasma of the CII-treated animals that developed or not the edema was higher than that of

Fig. 1. Classification of experimental animals based on the formation of edema. Control group is sham induced, and arthritic and resistant groups are CII-treated. Values are means $\pm$ SEM. Number of animals in parentheses. Analysis of variance ANOVA ($p < 0.0001$) with post-hoc Student–Newman–Keuls multiple comparisons test: * $p < 0.001$ vs control and vs resistant.

control. Table 1 also shows that TNF- α levels in blood serum did not differ between control and CII-treated animals without edema, but these levels were higher in blood serum of CII-treated animals with edema than in control.

3.2. Efficiency of synovial membrane fractionation

In all groups under study the LDH activity of the synovial membrane was detected only in the SF (mean $\pm$ SEM, control group, $n = 8$; 0.81 ± 0.15 , $P < 0.0001$, unpaired, two-side Student's *t* test); in the MF this activity was null (control group, $n = 8$). Qualitatively similar results were obtained in the SF and MF from PBMCs of all groups (data not shown).

3.3. APB activity

Fig. 2 shows that APB activity is strongly expressed in the MF from the synovial membrane of all groups under study. APB activity in the SF and MF from the synovial membrane was higher in CII-treated animals with swollen paws (arthritic) than in control or CII-treated that did not develop paw swelling (resistant). Resistant and control animals had similar APB activity in the SF and MF from the

Table 1

Titer of antibodies anti-type II collagen (AAC-II) and levels of tumor necrosis factor (TNF)- α in sham induced (control), CIA-treated that developed hind paw edema (arthritic) and CIA-treated rats that did not develop hind paw edema (resistant).

Animals	Blood plasma AAC-II ($\mu\text{g/mL}$)	Blood serum TNF- α (pg/mL)
Control	0.039 ± 0.018 (2)	<4 (2)
Arthritic	186 ± 5.7 (3)*	21.5 ± 2.5 (3)**
Resistant	191 ± 1.5 (3)*	<4 (3)

Limit of detection of ELISA kit is 4 pg TNF- α /mL.

Values are means $\pm$ SEM.

Number of animals in parentheses.

Analysis of variance ANOVA ($p < 0.001$) with post-hoc Student–Newman–Keuls multiple comparisons test.

* $p < 0.001$ vs control.

** $p < 0.001$ vs control and vs resistant.

Fig. 2. APB activity of blood plasma, synovial fluid and soluble (SF) and solubilized membrane-bound (MF) fractions of synovial membrane in sham induced (control), CII-treated that developed hind paw edema (arthritic) and CII-treated rats that did not develop hind paw edema (resistant). Values are means $\pm$ SEM. Number of animals in parentheses. Analysis of variance ANOVA (synovial membrane-SF, $p = 0.0015$; synovial membrane-MF, $p = 0.0192$; synovial fluid, $p = 0.0397$; blood plasma, $p = 0.0159$) with post-hoc Student–Newman–Keuls multiple comparisons test: * $p < 0.05$ vs other two groups.

synovial membrane. Fig. 2 also shows that APB activity in synovial fluid and blood plasma was lower in resistant than in control or arthritic animals, while arthritic animals and control animals had similar APB activity.

Fig. 3 shows that APB activity in the SF from PBMCs of control was higher than in arthritic or resistant animals. On the other hand, APB activity in the MF from PBMCs of resistant was higher than in control or arthritic animals.

Fig. 3. APB activity of soluble (SF) and solubilized membrane-bound (MF) fractions of PBMCs in sham induced (control), CII-treated that developed hind paw edema (arthritic) and CII-treated rats that did not develop hind paw edema (resistant). Values are means $\pm$ SEM. Number of animals in parentheses. Analysis of variance ANOVA (SF and MF, $p < 0.0001$) with post-hoc Student–Newman–Keuls multiple comparisons test: * $p < 0.001$ vs other two groups.

4. Discussion

4.1. Edema, AACII and TNF- α

CIA in rats or mice is the most commonly used animal model to evaluate approved and pending therapies or to investigate the pathogenesis of RA. Based on the degree of hind paw swelling (edema) formed 41 days after the treatment with CII emulsified in Freund's incomplete adjuvant, the present study characterized the existence of CII-treated animals susceptible or resistant to the induction of RA. Edema of the paws is the main feature of RA induced by CII and is commonly used as a parameter for evaluating the presence of RA [13,28]. The incidence of RA (edema) was 44% and 100% in the methods of CIA used respectively by Trentham et al. [13] and Cuzzocrea et al. [28], while in the present study was about 60%. TNF- α has been considered a major proinflammatory cytokine in RA [1,10], and the differences detected here in TNF- α levels in serum among arthritic, resistant and control animals agree with this rule. Both CII-treated with edema and without edema showed a high AACII titer, which would be expected only in immunized animals with intense edematous response [29]. However, altered AACII titer occurs in several diseases [30] and as evidenced in the present study it could not be considered a differential parameter for RA. The present study describes for the first time that a considerable proportion of CII-treated animals with high AACII titer does not develop edema, a finding that reinforces the multifactorial feature of RA triggering and the hypothesis that CII, as a large molecule, contains different epitopes with different degrees of immunoreactivity for different antibodies, and these antibodies for CII could be pathogenic and nonpathogenic [30]. The distinction between these possible types of antibodies would have great impact on the diagnosis and treatment of RA.

4.2. APB and the susceptibility and resistance to develop RA in the CIA model

Some factors can interfere with the successful onset of macroscopic signs of RA in CIA models, such as the denaturation of collagen during dissolution and differences in animal lineages used [31,32]. Obviously, the crucial question of medical interest is not related to the discrimination of exogenous factors that can determine the efficiency of the methods of induction, but the identification of possible endogenous determinants of resistance of certain animals to develop RA induced by these methods. On the other hand, as pointed out by Hegen et al. [33] the questions of which animal model is most predictive of therapeutic efficacy or has more pathophysiological features of human RA commonly arise in data evaluation, and obviously the study in several models can be more predictive than the data from either model alone. In this sense, the model used in the present study is very interesting because it showed that APB activity can be an attractive diagnostic tool for the determination of the outcome of RA, and that this catalytic activity can be also used to estimate the susceptibility to develop RA.

4.3. Possible mechanisms generating the altered APB activity in the CIA model

APB hydrolytic activity is known to be exhibited by the proteins EC 3.4.11.6 and leukotriene A₄-hydrolase (LTA₄H) (EC 3.3.2.6). The present study focuses only on APB catalytic activity without the aim to identify the protein(s) responsible for this activity. It is known that EC 3.4.11.6 preferentially hydrolyzes basic residues (arginine and lysine) of the N-terminal of several peptides [19,34], being widely distributed in various tissues as a monomeric protein with molecular weight of 72,300 kDa [19,34], comprising 649 amino acid residues, showing 33% identity and 48% similarity with EC 3.3.2.6, and also exhibiting the catalytic activity of LTA₄H [19,20]. In most cells studied, the protein EC

3.4.11.6 seems to be predominantly cytosolic and secreted, but it has also been found to be associated with the membrane [18,19] and the Golgi apparatus, possibly transiting from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex [18]. However, there is no description of transmembrane domains in its structure, and one hypothesis is that it interacts with a membrane receptor [19]. Intracellularly, the protein EC 3.4.11.6 could be involved in antigen processing, because it is present in the proteasome [35]. The peptides generated by proteasome degradation are incorporated into the endoplasmic reticulum where they bind to MHC II [35]. Moreover, many peptides in the endoplasmic reticulum undergo cleavage of N-terminal residue [35] and the protein EC 3.4.11.6 could also act in that compartment, helping antigenic processing. On the other hand, the membrane-associated APB could act on extracellular angiogenic peptides such as kallidin [18] and Ang-III [21]. Pannus formation, in both RA and CIA, is angiogenesis-dependent and it has been increasingly recognized that peptides are part of a pathogenic mechanism that contributes to autoimmune inflammation in RA [36].

In the present study, the highest expression of APB activity was found in the membrane-bound fraction from the synovial membrane, and this activity was also present in the membrane-bound fraction from PBMCs after a successful fractionation of soluble and membrane-bound fractions from these samples, as demonstrated by LDH activity. Thus, the present study is the first one to analyze APB activity in these separate fractions from the synovial membrane and PBMCs. A question arises from this data is whether soluble APB activity in synovial fluid and blood plasma is derived from synovial membrane and/or PBMCs. For another aminopeptidase, the dipeptidyl peptidase IV, the mechanism of shedding from the cell surface to the plasma is thought to be caused by plasma enzymes [37]. This question and the pathophysiological significance of APB activity, not only in the membrane fraction but also in the soluble fraction from the synovial membrane, soluble and membrane fractions of PBMCs and in synovial fluid and blood plasma need further studies to be elucidated. For example, it is known that the APB activity of the protein EC 3.4.11.6 increases in the presence of physiological concentrations of chloride [34]. It is also known that changes in the levels of LTA₄ and LTB₄ (the product of the catalytic action of the proteins EC 3.3.2.6 and EC 3.4.11.6 on LTA₄) generate changes in the APB activity of the protein EC 3.4.11.6 [15], but it is unclear whether there is a mutual interference of peptide and eicosanoid substrates in each of the catalytic activities of the protein EC 3.4.11.6. Moreover, both of the catalytic activities of the protein EC 3.3.2.6, that are epoxide hydrolase on LTA₄ [20,38,39] and peptide hydrolase on L-arginine β -naphthylamide and analogs [38–40], are inhibited by divalent cations and stimulated by monovalent anions, including chloride [34,40,41], as similarly occur with the protein EC 3.4.11.6 [34], thus complicating the distinction between these two proteins. Furthermore, the protein EC 3.3.2.6 appears to suffer suicidal inactivation when it is exposed to its lipid substrate LTA₄ [34].

4.4. Present significance of altered APB activity in the CIA model

Although the present study does not help to distinguish whether one or both proteins are responsible for APB activity, in an important area of controversy it suggested that the balance of intracellular APB in PBMCs (activity in the soluble fraction of these cells) is crucial in the triggering of RA. Furthermore, the present study clearly demonstrated that the detection of increased levels of this catalytic activity in the soluble and membrane-bound fractions from the synovial membrane could help to the diagnosis of RA, while the detection of decreased levels of this catalytic activity in synovial fluid and blood plasma, as well as of increased levels in membrane-bound fractions from PBMCs is a feature of resistance to develop RA with potential prognostic implications.

4.5. Possible implications of altered APB activity in RA

The role of polymorphisms in disease susceptibility is becoming increasingly relevant for the perspective of current medical practice [42]. Could a high stability of membrane-bound APB in the PBMCs and the consequent reduction of its release in body fluids be an individual protective factor against RA? It seems an interesting question to be further investigated. Recently, the neutrophil chemoattractant Pro-Gly-Pro (PGP), a biomarker for chronic obstructive pulmonary disease, was identified as one of the physiological substrates of the aminopeptidase activity of LTA4H [43]. In acute neutrophil driven inflammation, PGP was degraded by aminopeptidase activity, which facilitated the resolution of inflammation, but in chronic obstructive pulmonary disease, the inhibition of this aminopeptidase activity could lead to the accumulation of PGP and neutrophils [43].

4.6. Concluding remarks

The treatment with CII emulsified in Freund's incomplete adjuvant leads the rats to develop arthritic edema, high AACII, detectable TNF- α , high APB activity in the soluble and membrane-bound fractions from the synovial membrane and low APB in the soluble fraction of PBMCs or, on the other hand, absence of edema, high AACII, undetectable TNF- α , low APB in the synovial fluid and blood plasma and high APB in the membrane-bound fraction of PBMCs. Data suggest that APB represents potentially a new marker of diagnosis (in synovial membrane and soluble fraction from PBMCs) and/or prognosis (in synovial fluid, blood plasma and membrane-bound fraction from PBMCs) of RA. Given these data we believe that APB activity monitoring in RA patients at risk for or with existing joint pain and/or inflammation could be a cheap, simple and effective means to harness the clinical potential of this parameter for diagnosis and prognosis of RA. These data also suggest that the inhibition of APB activity in extracellular fluids such as synovial fluid and blood plasma needs to be investigated as a potential strategy for therapeutic intervention in RA.

Acknowledgments

This investigation was supported by Research Grant 09/17613-0 from FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil). P.F.S. was a recipient of a Productivity Grant 301417/2008-3 from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil). S.C.Y. was a recipient of a FAPESP fellowship. S.M-N was recipient of a CNPq fellowship. M.T.M. and R.F.A. were recipients of a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil) fellowship.

References

- [1] Doan T, Massarotti E. Rheumatoid arthritis: an overview of new and emerging therapies. *J Clin Pharmacol* 2005;45:751–62.
- [2] Nakamura RM. Progress in the use of biochemical and biological markers for evaluation of rheumatoid arthritis. *J Clin Lab Anal* 2000;14:305–13.
- [3] Brand DD, Kang AH, Rosloniec EF. Immunopathogenesis of collagen arthritis. *Springer Semin Immunopathol* 2003;25:3–18.
- [4] Kobayashi S, Momohara S, Kamatani N, Okamoto H. Molecular aspects of rheumatoid arthritis: role of environmental factors. *FEBS J* 2008;275:4456–62.
- [5] Hietala MA, Nandakumar KS, Persson L, Fahlén S, Holmdahl R, Pekna M. Complement activation by both classical and alternative pathways is critical for the effector phase of arthritis. *Eur J Immunol* 2004;34:1208–16.
- [6] Giles JT, Malayeri AA, Fernandes V, Post W, Blumenthal RS, Bluemke D, Vogel-Claussen J, Szklo M, Petri M, Gelber AC, Brumback L, Lima J, Bathon JM. Left ventricular structure and function in patients with rheumatoid arthritis, as assessed by cardiac magnetic resonance imaging. *Arthritis Rheum* 2010;62:940–51.
- [7] Kobayashi H, Giles JT, Polak JF, Blumenthal RS, Leffell MS, Szklo M, Petri M, Gelber AC, Post W, Bathon JM. Increased prevalence of carotid artery atherosclerosis in rheumatoid arthritis is artery-specific. *J Rheumatol* 2010;37:730–9.
- [8] Holmdahl R, Lorentzen JC, Lu S, Olofsson P, Wester L, Holmberg J, Pettersson U. Arthritis induced in rats with nonimmunogenic adjuvants as models for rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 2010;184:184–202.
- [9] Stuart JM, Townes AS, Kang AH. Collagen autoimmune arthritis. *Annu Rev Immunol* 1984;2:199–218.
- [10] Panayi GS. B cells: a fundamental role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis? *Rheumatology (Oxford)* 2005;44:ii3–7.
- [11] Strietholt S, Maurer B, Peters MA, Pap T, Gay S. Epigenetic modifications in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2008;10:219–27.
- [12] Cremer MA, Rosloniec EF, Kang AH. The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease. *J Mol Med* 1998;76:275–88.
- [13] Trentham DE, Towes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med* 1977;146:857–68.
- [14] Ling SM, Patel DD, Garner P, Zhan M, Vaduganathan M, Muller D, Taub D, Bathon JM, Hochberg M, Abernethy DR, Metter EJ, Ferrucci L. Serum protein signatures detect early radiographic osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2009;17:43–8.
- [15] Mantle D, Falkous G, Walker D. Quantification of protease activities in synovial fluid from rheumatoid and osteoarthritis cases: comparison with antioxidant and free radical damage markers. *Clin Chim Acta* 1999;284:45–58.
- [16] Koch AE, Burrows JC, Skoutelis A, Marder R, Damer PH, Anderson B, Leibovich SJ. Monoclonal antibodies detect monocyte/macrophage activation and differentiation antigens and identify functionally distinct subpopulations of human rheumatoid synovial tissue macrophages. *Am J Pathol* 1991;138:165–73.
- [17] Olivo RA, Teixeira CF, Silveira PF. Representative aminopeptidases and prolyl endopeptidase from murine macrophages: comparative activity levels in resident and elicited cells. *Biochem Pharmacol* 2005;69:1441–50.
- [18] Balogh A, Cadel S, Foulon T, Picart R, Der Garabedian A, Rousselet A, Tougaard C, Cohen P. Aminopeptidase B: a processing enzyme secreted and associated with the plasma membrane of rat pheochromocytoma (PC12) cells. *J Cell Sci* 1998;111:161–9.
- [19] Foulon T, Cadel S, Cohen P. Aminopeptidase B (EC 3.4.11.6). *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:747–50.
- [20] Penning TD, Russell MA, Chen BB, Chen HY, Liang, Mahoney MW, Malecha JW, Miyashiro JM, Yu SS, Askonas LJ, Gierse JK, Harding EI, Highkin MK, Kachur JF, Kim SH, Villani-Price D, Pyla EY, Ghoreishi-Haack NS, Smith WG. Synthesis of potent leukotriene A(4) hydrolase inhibitors. Identification of 3-[methyl(3-[4-(phenylmethyl)phenoxy]propyl)amino]propanoic acid. *J Med Chem* 2002;45:3482–90.
- [21] Ruiz-Ortega M, Esteban V, Egidio J. The regulation of the inflammatory response through nuclear factor-kappaB pathway by angiotensin IV extends the role of the renin angiotensin system in cardiovascular diseases. *Trends Cardiovasc Med* 2007;17:19–252.
- [22] Heffelfinger SC. The renin angiotensin system in the regulation of angiogenesis. *Curr Pharm Des* 2007;13:1215–29.
- [23] Ryan A, Godson C. Lipoxins: regulators of resolution. *Curr Opin Pharmacol* 2010;10:166–72.
- [24] Maldonado C, Curi R. Como Cultivar células. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.
- [25] Gasparello-Clemente E, Casis L, Varona A, Gil J, Irazusta J, Silveira PF. Aminopeptidases in visceral organs during alterations in body fluid volume and osmolality. *Peptides* 2003;24:1367–72.
- [26] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [27] Zambotti-Villela L, Yamasaki SC, Villarreal JS, Alpointi RF, Silveira PF. Aspartyl, arginyl and alanyl aminopeptidase activities in the hippocampus and hypothalamus of streptozotocin-induced diabetic rats. *Brain Res* 2007;1170:112–8.
- [28] Cuzzocrea S, Mazzon E, diPaola R, Genovese T, Muià C, Caputi AP, Salvemini D. Synergistic interaction between methotrexate and a superoxide dismutase mimetic: pharmacologic and potential clinical significance. *Arthritis Rheum* 2005;52:3755–60.
- [29] Harris HE, Liljestrom M, Klareskog L. Characteristics of synovial fluid effusion in collagen-induced arthritis (CIA) in the DA rat; a comparison of histology and antibody reactivities in an experimental chronic arthritis model and rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol* 1997;107:480–4.
- [30] Morgan K. What do anti-collagen antibodies mean? *Ann Rheum Dis* 1990;49:62–5.
- [31] Cremer M. Type II collagen-induced arthritis in rats. In: Diamond HS, Greenwald RA. *Handbook of animal model for the rheumatic diseases*. CRC Press; 1988. p. 17–27.
- [32] Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. *Nat Protoc* 2007;2:1269–75.
- [33] Hegen M, Keith Jr JC, Collins M, Nickerson-Nutter CL. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007;67:1505–15.
- [34] Haegström JZ. Leukotriene A₄ hydrolase. In: Rawlings ND, Barrett AJ, Woessner JF, editors. *Handbook of proteolytic enzymes*. Academic Press; 1998. p. 1022–5.
- [35] Hattori A, Tsujimoto M. Processing of antigenic peptides by aminopeptidases. *Biol Pharm Bull* 2004;27:777–80.
- [36] Dennehey C, van den Broek T, van Wijk F, Zhang X, Zieseniss P, Le T, Prakken BA, Cutter GC, Albani S. Epitope-specific immunotherapy of rheumatoid arthritis: clinical responsiveness occurs with immune deviation and relies on the expression of a cluster of molecules associated with T cell tolerance in a double-blind, placebo-controlled, pilot phase II trial. *Arthritis Rheum* 2009;60:3207–16.
- [37] Gorrell MD, Gysbers V, McCaughan GW. CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scand J Immunol* 2001;54(3):249–64.

- [38] Haeggström JZ, Tholander F, Wetterholm A. Structure and catalytic mechanisms of leukotriene A4 hydrolase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2007;83:198–202.
- [39] Murphy RC, Gijón MA. Biosynthesis and metabolism of leukotrienes. *Biochem J* 2007;405:379–95.
- [40] Liang AM, Claret E, Ouled-Diaf J, Jean A, Vogel D, Light DR, Jones SW, Guilford WJ, Parkinson JF, Snider RM. Development of a homogeneous time-resolved fluorescence leukotriene B4 assay for determining the activity of leukotriene A4 hydrolase. *J Biomol Screen* 2007;12:536–45.
- [41] Rudberg PC, Tholander F, Thunnissen MM, Haeggström JZ. Leukotriene A4 hydrolase/aminopeptidase. Glutamate 271 is a catalytic residue with specific roles in two distinct enzyme mechanisms. *J Biol Chem* 2002;277:1398–404.
- [42] Cronstein BN. A personal journey from the joint to the heart. *Arthritis Res Ther* 2010;12:134.
- [43] Snelgrove RJ, Jackson PL, Hardison MT, Noerager BD, Kinloch A, Gaggar A, Shastri S, Rowe SM, Shim YM, Hussell T, Blalock JE. A critical role for LTA4H in limiting chronic pulmonary neutrophilic inflammation. *Science* 2010;330:90–4.