

CRISTIANO ROSSATO

**CARACTERIZAÇÃO DA FASE INICIAL DA ARTRITE
INDUZIDA PELO PRISTANE EM CAMUNDONGOS
SELECIONADOS PARA ALTA OU BAIXA PRODUÇÃO
DE ANTICORPOS: ENVOLVIMENTO CELULAR E
MOLECULAR.**

Dissertação Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para Obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2011

CRISTIANO ROSSATO

**CARACTERIZAÇÃO DA FASE INICIAL DA ARTRITE
INDUZIDA PELO PRISTANE EM CAMUNDONGOS
SELECIONADOS PARA ALTA OU BAIXA PRODUÇÃO
DE ANTICORPOS: ENVOLVIMENTO CELULAR E
MOLECULAR.**

Dissertação Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para Obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia
Orientador: Dr. José Ricardo Jensen
Versão original.

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Rossato, Cristiano.

Caracterização da fase inicial da artrite induzida pelo pristane em camundongos selecionados para alta ou baixa produção de anticorpos: envolvimento celular e molecular / Cristiano Rossato. -- São Paulo, 2012.

Orientador: José Ricardo Jensen.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunologia celular e molecular.

Versão do título para o inglês: Characterization of the initial phase of PIA in mice genetically selected for high or low antibody production: cellular and molecular involvement.

Descritores: 1. Autoimunidade 2. Camundongos 3. Citocinas 4. Células 5. Linfócitos 6. Peritônio I. Jensen, José Ricardo II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0223/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: Cristiano Rossato.

Título da Dissertação: Caracterização da fase inicial da artrite induzida pelo pristane em camundongos selecionados para alta ou baixa produção de anticorpos: envolvimento celular e molecular.

Orientador: José Ricardo Jensen.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

Aprovado

Reprovado

Examinador: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

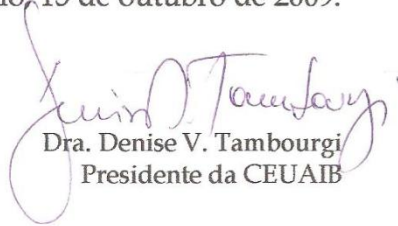
CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização da fase inicial da artrite induzida pelo pristane em camundongos selecionados para alta ou baixa produção de anticorpos: envolvimento celular e molecular", **protocolo n° 655/09**, sob a responsabilidade de José Ricardo Jensen e Cristiano Rossato, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de **13/10/2009**.

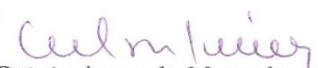
"We certify that the Research entitled "Characterization of the early-phase of Pristane-induced Arthritis (PIA) in mice selected for High or Low antibody production: molecular and cellular involvement", protocol n° 655/09, under the responsibility of José Ricardo Jensen and Cristiano Rossato, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 10/13/2009".

Vigência do Projeto: 11/2009 – 07/2012	N° de animais/espécie
Laboratório de Imunogenética	168/camundongo/HIII e LIII(Macho e Fêmea)

São Paulo, 15 de outubro de 2009.


Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:


Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan



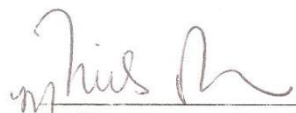
**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

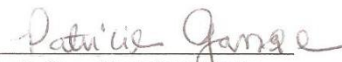
CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **124** nas fls. **76** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) José Ricardo Jensen, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Caracterização da fase inicial da artrite induzida pelo pristane em camundongos selecionados para alta ou baixa produção de anticorpos:envolvimento celular e molecular** do qual participou(aram) o(s) alunos **Layra Lucy Maria Albuquerque da Costa e os pesquisadores Olga Célia Martinez, Marcelo De Franco, Orlando Ribeiro Filho, Nancy Starobinas**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA) em **15.12.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 16 de dezembro de 2009.



Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP



Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan com apoio financeiro da FAPESP, CNPq e CAPES.

A minha família: meus amados pais, Valdir e Asmíria, que são fontes maiores de inspiração e perseverança; e ao meu irmão companheiro, Franco, pela união e força.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. José Ricardo Jensen, meu profundo respeito e gratidão. Soube apoiar e conduzir de forma segura para o amadurecimento dos meus conhecimentos científicos, sempre me incentivando de maneira tranquila e objetiva para a conclusão desta dissertação.

Aos meus pais, Valdir e Asmíria, pelo apoio e forte incentivo.

Ao meu irmão, Franco, que sempre me encoraja a seguir e enfrentar novas batalhas; à sua namorada Mariana, por cuidar bem do maninho.

À minha querida Naieli pelo amor, compreensão e carinho; e à sua família: pais, Sérgio e Nancy, e irmãs: Alani e Laura pelo afeto e carinho.

A todos os meus parentes queridos, em especial, àqueles que estão sempre juntos compartilhando alegrias.

Aos Professores, Dr. Anderson Nunes, Dr. Gustavo Pessini e Dr. Niels Olsen, pelas atenciosas e criteriosas observações em minha qualificação.

Aos pesquisadores do Laboratório de Imunogenética: Dra. Andrea Borrego, Dr. Marcelo de Franco, Dra. Milene de Franco, Dra. Mônica Spadafora, Dra. Nancy Starobinas, Dra. Olga Ibañez, Dr. Orlando Garcia Ribeiro, Dra. Solange Carbonare, Dra. Solange Massa e Dra. Wafa Cabrera; pelo convívio, sugestões e análises críticas.

À Dra. Eliana Blini Marengo, pela gentil colaboração e amizade.

Aos professores, Dr. Gustavo Pompermaier Garlet da FOB/USP pelo trabalho histopatológico e ao Dr. Frederico Azevedo da Costa Pinto da VPT/FMVZ/USP pelas análises patológicas e discussões.

A todos os professores das várias disciplinas que cursei, na FCF, FM e no ICB IV, por contribuírem para o meu crescimento científico.

Aos meus amigos e companheiros do Laboratório de Imunogenética: Alessandra, Aline, Andréa, Camila, Débora, Francisca, Iana (além da ajuda nos experimentos), Juliana, Jussara, Lilian, Luciana, Mara, Marcela, Priscília (Prini), Priscila, Renata, Tatiane (além da ajuda nos experimentos), Thaís e Vinícius.

Aos amigos Marcos, Norio, Paulo, Ricardão e Vivi.

À Layra, em especial, por tudo que me ensinou e pela ajuda nos experimentos.

Aos muitos amigos e colegas do Instituto Butantan, da USP, em especial do ICB IV – Departamento de Imunologia e Faculdade de Medicina, da UNICAMP, UNIFESP e UNESP de Botucatu, que de alguma maneira estiveram presentes nesta caminhada.

Aos meus amigos que não se enquadraram nos itens anteriores, por serem de fato, amigos, dentre eles: Emerson, Marcelino e Pó (CEMP); Gisele Quinallia, Gustavo Góia e Porva; Simone, Gradin, Yurie e Simone (*in memorian*).

À Andressa pelo carinho e amizade.

Aos funcionários e colegas do Laboratório de Imunogenética: Manoel, Mara, Marinalva Lima, Neusa, Ronaldo, Sandra e Tânia pelo convívio e participação na conclusão dos trâmites necessários para a conclusão deste trabalho.

Aos funcionários e colegas do Biotério: Aline, Celso, Hilário, Joel, Manoel, Marinalva dos Santos, Rosa e Sérgio e pela ajuda com os animais.

Aos funcionários e colegas do Departamento, Amanda, Amarildo Utiana (*in memorian*), Jotelma, Maria Eni e Thiago.

À Maria do Socorro pela correção de minha dissertação.

Aos amigos, colegas e conhecidos que não citei anteriormente.

Ao CNPq, FAPESP e CAPES pelo auxílio financeiro.

"Give so much time to the improvement of yourself that you have no time to criticize others" (Christian D. Larson), for *"Great minds discuss ideas; Average minds discuss events; Small minds discuss people"* (Eleanor Roosevelt). It is said that *"The wisdom of life consists in the elimination of nonessentials"* (Lin Yutang), perhaps because *"Great spirits have always encountered violent opposition from mediocre minds"* (Albert Einstein), then why not *"Keep away from people who try to belittle your ambitions."* ? *"Small people do that, but the really great make you feel that you, too, can somehow become great"* (Mark Twain). It is also important to take into account that *"The future belongs to those who believe in the beauty of their dreams"* (Eleanor Roosevelt). Therefore, *"Don't criticize, condemn or complain"* (Dale Carnegie) for the sake of becoming extraordinarily great.

RESUMO

ROSSATO, C. **Caracterização da fase inicial da artrite induzida pelo pristane em camundongos selecionados para alta ou baixa produção de anticorpos: envolvimento celular e molecular.** 2011. 81f. (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A artrite induzida por pristane (PIA) em camundongos H_{III} (resistentes) e L_{III} (suscetíveis) foi usada para estudar mecanismos inflamatórios e imunes atuantes na fase pré-clínica da doença, os quais são pouco conhecidos. Estudos anteriores mostraram diferenças significativas na produção de citocinas nos animais H_{III} e L_{III} na fase pré-clínica da PIA, sugerindo forte influência no fenótipo de PIA. A PIA foi induzida apenas por via intraperitoneal nos animais L_{III}, com intensa infiltração de neutrófilos, linfócitos, monócitos e macrófagos, altos níveis de IL-12p40 e maior expressão de genes de citocinas inflamatórias após a injeção de pristane. Por outro lado, na linhagem H_{III} houve aumento de eosinófilos e neutrófilos, mas redução de monócitos e linfócitos. Não observamos diferenças nos níveis de TNF- α , IFN- γ , IL-12p70, IL-17, IL-10. Concluimos que a intensidade e o tipo de resposta inflamatória na fase inicial da PIA podem ser mecanismos envolvidos na diferença de resistência/ susceptibilidade entre as linhagens H_{III} e L_{III}.

Palavras-chave: Autoimunidade. Camundongos. Citocinas. Células. Linfócitos. Peritônio.

ABSTRACT

ROSSATO, C. **Characterization of the initial phase of PIA in mice genetically selected for high or low antibody production: cellular and molecular involvement.** 2011. 81f. Master Thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Imunologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Pristane-induced arthritis (PIA) in HIII (resistant) and LIII (susceptible) mice was used in this work to characterize the cellular and molecular alterations of the pre-clinical phase of the disease, of which little is known. Previous reports showed significant differences in cytokine production of HIII and LIII mice in the pre-clinical phase of PIA, suggesting a strong influence on PIA phenotype. PIA was induced only by the intraperitoneal route in LIII animals, which showed intense infiltration of neutrophils, lymphocytes, monocytes and macrophages, with high levels of IL-12p40 after pristane injection. Inflammatory cytokine genes were also upregulated in LIII mice. On the other hand, HIII strain had increased eosinophils and neutrophils, but reduced monocytes and lymphocytes. No significant differences were found in TNF- α , IFN- γ , IL-12p70, IL-17, IL-10 levels. We conclude that the intensity and type of inflammatory response in the initial phase of PIA may be different mechanisms involved in resistance / susceptibility between HIII and LIII mice.

Key words: Autoimmunity. Mice. Cytokines. Cells. Lymphocytes. Peritoneum.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1MT	1-metil-triptofano
APC	Célula Apresentadora de Antígenos
Ctsk	catepsina K
Ctss	catepsina S
CD (4, 11b)	<i>Cluster of Differentiation</i> (4, 11b)
CIA	<i>Collagen-induced arthritis</i>
CCL2	Quimiocina (C-C motif) ligante 2 (ou MCP-1)
CCP	Peptídeo citrulinado cíclico
DC	Células dendríticas
dsDNA	Ácido desoxirribonucléico de dupla fita
EAE	Encefalomielite autoimune experimental
Ebi3	<i>Epstein-Barr virus induced gene 3</i>
Foxp3	Forkhead box p3
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócito-monócito
H_{III}	High _{III} – Seleção _{III} de camundongos com altos títulos de anticorpos contra antígenos de <i>Salmonella</i>
Hsp	<i>Heat shock protein</i>
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
IDO	<i>Indoleamine 2,3-dioxygenase</i>
IFN-γ	Interferon- γ
IFNGR1 e 2	Receptor 1 e 2 de Interferon- γ
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-8	Interleucina 8
IL-12	Interleucina 12 (forma biativa - p70)
IL-12p40	Interleucina 12 (peptídeo 40kd)
IL-17	Interleucina 17
IL-17R	Receptor de interleucina 17
IL-21	Interleucina 21
IL-23	Interleucina 23
IL-23R	Receptor de interleucina 23

IL-25	Interleucina 25
IL-27	Interleucina 27
L_{III}	Low _{III} – Seleção _{III} de camundongos com baixos títulos de anticorpos contra antígenos de <i>Salmonella</i>
MHC-II	Complexo principal de histocompatibilidade de classe II
MPO	Mieloperoxidase
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	<i>Nitric oxide</i>
O₂⁻	Ânion superóxido
PAMP	Padrões moleculares associados aos patógenos
PGIA	<i>Proteoglycan-induced arthritis</i>
PIA	<i>Pristane-induced arthritis</i>
QTL	<i>Quantitative Trait Locus</i>
qPCR	Reação de cadeia polimerase quantitativa
STAT (1,2,4)	Transdutor de sinal e ativador de transcrição (1, 2, 4)
QTL	<i>Quantitative Trait Locus</i>
Tbet	Fator de transcrição T box
TCR	T cell receptor
TGF-β	<i>Transforming growth factor-β</i>
T_H	Linfócito T CD4 auxiliar
TMPD	Pristane (2, 6, 10, 14-tetrametilpentadecano)
TNF-α	Fator α de necrose tumoral
RA	<i>Rheumatoid arthritis</i>
RF	<i>Rheumatoid factor</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
λ	Gama
Δ	Delta
μ	Miu
$^{\circ}$	Graus
\pm	Mais ou menos
$<$	Menor
®	Marca registrada

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Suscetibilidade dos camundongos L_{III} a PIA depende da via de inoculação
- Figura 2** Gravidade da PIA é inalterada pelo número de doses.
- Figura 3** Histologia das patas dos animais tratados com pristane.
- Figura 4** Cinética de inflamação na cavidade peritoneal pós-pristane.
- Figura 5** Infiltração celular aumentada no peritônio dos camundongos L_{III} aos 7 dias.
- Figura 6** Populações de linfócitos e células dendríticas peritoneais.
- Figura 7** Análise por citometria de fluxo das subpopulações de células B peritoneais.
- Figura 8** Perfil de citocinas do lavado peritoneal pós-pristane.
- Figura 9** Peróxido de hidrogênio produzido por células.
- Figura 10** Expressão gênica diferencial de citocinas de células peritoneais.
- Figura 11** Expressão gênica dos fatores transcrição de linfócitos T no mLN.
- Figura 12** Percentual de células Treg no mLN.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Artrite reumatóide	19
1.2	Modelos experimentais de artrite	20
1.3	Células, citocinas e moléculas na artrite experimental	23
2	OBJETIVO	30
3	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1	Desenho experimental	31
3.2	Animais experimentais	31
3.3	Artrite induzida por pristane	31
3.4	Quantificação da inflamação induzida pelo pristane	31
3.5	Determinação da produção de citocinas no exsudato inflamatório	32
3.6	Quantificação da liberação de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	32
3.7	Caracterização fenotípica das células do peritônio mLN por citometria de fluxo	32
3.8	Extração de RNA total de linfonodos e células peritoneais	33
3.9	Obtenção do DNA complementar (cDNA)	33
3.10	Sequências de oligonucleotídeos utilizados na expressão de proteínas	34
3.11	Quantificação da expressão gênica por PCR em Tempo-Real (qPCR)	35
3.12	Análise histológica	36
3.13	Análise Estatística	37
4	RESULTADOS	38
4.1	Influência da via de inoculação e do número de doses na PIA	38
4.1	Análise histológica	40
4.2	Inoculação intraperitoneal de pristane induz infiltrados celulares distintos	43
4.3	Citometria de Fluxo de células do lavado peritoneal	46
4.4	Avaliação do lavado peritoneal dos animais H _{III} e L _{III}	49

4.5	Produção <i>in vitro</i> de peróxido de hidrogênio por células peritoneais	51
4.6	Expressão gênica	52
4.6.1	Células do lavado peritoneal	52
4.6.2	Fatores de transcrição associados à diferenciação de células T CD4 em células do linfonodo mesentérico	52
4.7	Citometria de fluxo de células do mLN.....	54
5	DISCUSSÃO	55
6	CONCLUSÕES.....	65
	REFERÊNCIAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

A artrite reumatóide (RA) é uma doença inflamatória crônica com envolvimento autoimune que acomete as articulações sinoviais e pode levar à incapacidade funcional. Por ser uma doença de etiologia desconhecida, a RA vem sendo alvo de intensa pesquisa. Alguns tratamentos são eficazes no controle dos sintomas, porém não afetam os mecanismos que a desencadeiam. Pouco é conhecido sobre os mecanismos envolvidos na fase anterior ao estabelecimento da doença, ou seja, na fase pré-clínica. Além disso, a RA apresenta caráter complexo de desenvolvimento, envolvendo um conjunto amplo de células reguladas por citocinas da resposta imune.

1.1 Artrite reumatóide

A artrite reumatóide (RA) afeta entre 0,5-1% da população humana com maior incidência em adultos do sexo feminino (ALAMANOS; DROSOS, 2005), e acomete primariamente as articulações das extremidades dos membros superiores e inferiores. (FIRESTEIN, 2003). O *American College of Rheumatology* utiliza como critério de diagnóstico, a inflamação das articulações; a presença de nódulos subcutâneos em protuberâncias ósseas, superfícies extensoras ou regiões justarticulares; alterações radiográficas das extremidades, como erosão ou descalcificação adjacente às articulações afetadas; e positividade para o fator reumatóide (RF), composto principalmente por anticorpos IgM anti-IgG (ARNETT et al., 1988). Mais recentemente, os anticorpos anti-CCP (Peptídeos citrulinados cíclicos) têm ganhado maior importância no diagnóstico da RA (SCHELLEKENS et al., 2000), e sua presença está associada a mau prognóstico (GERARD et al., 2000).

O RF, descrito por Zvaifler em 1973, e outros autoanticorpos fixadores de complemento (anti-dsDNA, anti-CCP), que se depositam nas articulações na forma de imunocomplexos, induzem a liberação de fatores quimiotáticos (como o fragmento C5a do complemento) e quimiocinas por células adjacentes, promovendo o recrutamento de células inflamatórias para a articulação. Os neutrófilos, ao se acumularem no líquido sinovial, fagocitam os imunocomplexos e liberam metabólitos do oxigênio (ROS) e enzimas proteolíticas, tais como mieloperoxidase (MPO) e metaloproteinases. Macrófagos e linfócitos T e B também infiltram a membrana sinovial formando agregados e induzindo alta taxa de proliferação das populações de sinoviócitos, tipos 1 (similares a macrófagos) e 2 (similares a fibroblastos),

ocasionando hiperplasia da camada íntima. Em conjunto com os neutrófilos, os sinoviócitos que expressam metaloproteases, serino-proteases e agrecanases destroem as articulações (AFONSO et al., 2007; FIRESTEIN, 2003), devido à digestão da matriz extracelular e do aumento da atividade de osteoclastos (YASUDA; KALETA; BROMME, 2005). Ocorre também angiogênese, a qual contribui facilitando a migração de células para as articulações (TAYLOR; SIVAKUMAR, 2003). Entretanto, estas alterações imunopatológicas são observadas quando a doença já se encontra instalada e são resultado de eventos primordiais dos quais pouco é conhecido.

O estresse e as infecções são alguns fatores ambientais que podem contribuir para o estabelecimento da artrite reumatóide humana (STOJANOVICH; MARISAVLJEVICH, 2008). Por outro lado, é evidente a participação de genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), em particular o gene *HLA-DRB1*, que codifica para a proteína HLA-DRβ1, cujos alelos DRB*0401, DRB*0404 DRB*0101 possuem associação significativa com a ocorrência da doença (GREGERSEN; SILVER; WINCHESTER, 1987; FIRESTEIN, 2003). Entretanto, o gene *HLA-DRB* responde por cerca de 30 a 50% da variabilidade fenotípica de origem genética (DEIGHTON et al., 1989; DEIGHTON; WALKER, 1991), indicando que outros genes fora do MHC também regulam a suscetibilidade à RA. Os principais candidatos são o gene *PTPN22*, que codifica uma tirosina fosfatase, e o *PADI4*, enzima envolvida na citrulinação de peptídeos, os quais são alvo de autoanticorpos na RA.

Polimorfismos em genes codificadores de citocinas ou seus receptores determinam variantes que também predispõem o indivíduo a autoimunidade (HOLLIS-MOFFATT et al., 2009; VALLVÉ et al., 2008).

1.2 Modelos experimentais de artrite

Os modelos animais de artrite reumatóide são amplamente usados no estudo da imunopatologia, genética, no conhecimento da patogênese e na validação de alvos terapêuticos. A artrite pode ser induzida em camundongos ou ratos pela imunização com componentes protéicos das articulações (autólogos ou heterólogos) em adjuvante. A artrite induzida por colágeno (CIA) utiliza o colágeno do tipo II bovino (TRENTHAM; TOWNES; KANG, 1977) enquanto a induzida por proteoglicanos (PGIA) utiliza agrecanos (cartilagem) como antígenos (GLANT et al., 1987).

É também possível a indução de artrite pela injeção intraperitoneal de óleos minerais

não-imunogênicos, como o pristane (TMPD - 2, 6, 10, 14-tetrametilpentadecano), artrite induzida por pristane (PIA) (POTTER; WAX, 1981), além de modelos de ocorrência espontânea de artrite (MOUNTZ et al., 2005). A susceptibilidade à artrite experimental também é associada com os genes do complexo principal de histocompatibilidade (H-2) de classe II e seu desenvolvimento é acompanhado por uma robusta resposta de células T e B a componentes articulares. As principais características patológicas desses modelos incluem sinovite proliferativa com infiltração de polimorfonucleares e mononucleares, formação de pannus, degradação da cartilagem, erosão óssea e fibrose (GREGERSEN; SILVER; WINCHESTER, 1987; FIRESTEIN, 2003). Como na RA, citocinas próinflamatórias, como fator α de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina (IL)-1 β , são expressas em abundância nas articulações artríticas no modelo de CIA, e o bloqueio destas moléculas resulta em redução da gravidade da doença (WILLIAMS, 2004).

O modelo utilizado neste trabalho foi o da PIA, o qual é dependente de células T CD4⁺, acompanhado por hipergamaglobulinemia e produção de autoanticorpos. Além do fator reumatóide, observa-se a presença de anticorpos anti-dsDNA (*double strand DNA*), Hsp (Heat shock protein, proteínas do choque térmico) e colágeno (MORGAN et al., 2004; THOMPSON et al., 1990; WOOLEY et al., 1989).

Animais de linhagens suscetíveis, mantidos em condições livres de patógenos específicos (SPF) são resistentes à PIA, mas após serem transferidos para o ambiente convencional sua suscetibilidade é restaurada (THOMPSON; ELSON, 1993), evidenciando a participação da biota intestinal na indução da doença. A autoimunidade contra a proteína de choque térmico de micobactérias (hsp65, de 65 kDa) está associada com o desenvolvimento da PIA (THOMPSON et al., 1990). Foi proposto que o pristane, ao provocar um processo inflamatório crônico na cavidade peritoneal, promoveria a permeabilização vascular intestinal favorecendo a transferência de antígenos da microbiota para o peritônio. Essa transferência levaria ao desenvolvimento de anticorpos anti-hsp65 bacteriana, a qual reage cruzadamente com uma variedade de hsp60, inclusive a homóloga murina (e humana), resultando, assim, no desenvolvimento da autoimunidade (BARKER; WELLS; GHORAISHIAN, 1996; KAUFMANN, 1990). No entanto, se a hsp65 for administrada em IFA, é capaz de suprimir a PIA e a resposta imune contra a HSP (BEECH et al., 1997). Na literatura há escassez de dados quanto à influência da via de inoculação do pristane para dar suporte a essa hipótese, pois, em ratos, a PIA é induzida pela via subcutânea ou intradérmica (VINGSBO et al., 1996).

Além disso, dados anteriores do nosso grupo demonstram que a presença de anticorpos

anti-hsp é *per se* insuficiente para desencadear o quadro clínico de artrite (JENSEN et al., 2006). Neste trabalho, que utilizou camundongos H_{III} e L_{III}, selecionados geneticamente segundo a capacidade de produzir altos ou baixos títulos de anticorpos, foi demonstrado que, apesar de se comportarem diferentemente quanto à suscetibilidade/ resistência à PIA, os animais das duas linhagens produzem títulos similares de IgG total anti-hsp65, diferindo em relação aos isotipos predominantes. A linhagem resistente H_{III} produziu predominantemente IgG1 e IgG2a enquanto a linhagem suscetível L_{III} apresentou níveis de IgG2b e IgG3 elevados (JENSEN et al., 2006). Estes dados sugerem que outros mecanismos imunes estão envolvidos, entre os quais o balanço de sub-populações de células T CD4⁺ e células B1, as quais são as principais produtoras de anticorpos IgG3 (SIDMAN et al., 1986).

Há variações entre os modelos experimentais quanto aos parâmetros de avaliação do desenvolvimento a doença. Por exemplo, os animais suscetíveis L_{III} (H-2^Z, FRANGOULIS et al., 1990) têm incidência de 100% aos 100 dias após a primeira injeção de pristane (JENSEN et al., 2006) e desenvolvem artrite muito mais rapidamente (início aos 45 dias de indução) do que os animais isogênicos susceptíveis BALB/cJ (H-2^d), os quais apresentam 70% de incidência, com início aos 160 dias (POTTER; WAX, 1981). Os animais DBA/1 (H-2^q) tem média de incidência de 90% aos 130 dias (WOOLEY et al., 1998), enquanto que os da linhagem AIRmax, selecionados para a alta resposta inflamatória, apresentam 65% de incidência de PIA após 200 dias de indução. Em linhagens consideradas resistentes, como os camundongos AIRmin selecionados para a baixa resposta inflamatória, 7% desenvolvem a PIA (VIGAR et al., 2000) enquanto a linhagem DBA/2 (H-2^d) (WOOLEY et al., 1998), não apresenta nenhum sinal de artrite no mesmo período, bem como os animais H_{III} (JENSEN et al., 2006).

Em relação à gravidade da doença, os animais L_{III} apresentam um quadro de extrema gravidade atingindo o escore visual máximo (JENSEN et al., 2006), utilizado na maioria dos trabalhos para a avaliação clínica da doença, enquanto que as demais linhagens suscetíveis em geral apresentam quadros de gravidade baixa a moderada (THOMPSON; ELSON, 1993; VAN DE VELDE et al., 2010).

As linhagens L_{III} e H_{III} foram selecionadas segundo a capacidade de produção de baixo ou alto título de anticorpos contra antígenos complexos de *Salmonella enterica*. Após 20 ou mais gerações de acasalamentos admitiu-se que os alelos responsáveis pelos fenótipos de seleção alcançaram a homozigose nas linhagens (SIQUEIRA et al., 1976). Durante o processo seletivo foram observados ganhos progressivos no fenótipo de seleção, uma vez que as

populações de baixa ou de alta produção de anticorpos se afastavam da população inicial de seleção, evidenciando a regulação poligênica da produção de anticorpos. Por métodos clássicos de genética quantitativa, foi estimada a participação de 4 a 7 QTLs reguladores do fenótipo de produção de anticorpos para o antígeno de seleção. Um mapeamento genômico destas linhagens detectou 3 QTLs com associação significativa com a produção de anticorpos, além de 7 regiões sugestivas (DE SOUZA et al., 2004), em concordância com a estimativa inicial. É importante salientar que essas linhagens diferem não somente para o fenótipo de seleção, mas também para tumorigênese experimental (BIOZZI et al., 1998; IBÁÑEZ et al., 1999), infecções bacterianas (TREZENA et al., 2002) e artrite autoimune (JENSEN et al., 2006).

Em 2006, Jensen et al., baseados em De Souza et al., 2004, evidenciaram a participação de um QTL (*Quantitative trait loci*) regulador da produção de anticorpos no desenvolvimento da PIA, cujo intervalo de confiança abrange alguns genes candidatos para exercer esses efeitos, como o *Rorc* (*Roryt*), *FcγRI* (CD64), *Il6ra* (cadeia alfa do receptor de IL6), *Il12a* (IL-12p35), catepsinas K (*Ctsk*) e S (*Ctss*), e *Cd53*.

1.3 Células, citocinas e moléculas na artrite experimental

Os granulócitos, monócitos, macrófagos, células dendríticas (DC) e *Natural Killer* (NK) representam parte do sistema imune inato que provem a primeira linha de defesa contra substâncias estranhas ao sistema imunológico. Durante o processo inflamatório, estas células deixam gradualmente a medula óssea ao mesmo tempo em que as células presentes na corrente sanguínea migram para o sítio de injúria. O tecido inflamado produz fatores que induzem a parede dos vasos adjacentes a expressar moléculas necessárias para que os leucócitos realizem a migração para o tecido perivascular, que ocorre por três passos coordenados: rolamento e adesão ao endotélio; e transmigração para o sítio inflamatório.

Uma vez no sítio inflamatório, os monócitos se diferenciam em macrófagos e/ ou em DCs, que reconhecem partículas estranhas mediante a ligação aos PAMPs, fagocitam e produzem diversos produtos tóxicos que auxiliam na eliminação da substância, tais como: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion superóxido (O_2^-) e o óxido nítrico (NO). Além disso, estas células também respondem rapidamente ao estímulo inflamatório secretando citocinas e quimiocinas como CCL3, CCL8, CXCL8, e CCL2, a qual é induzida por IFN- α/β (TRINCHIERI, 2010). As células apresentadoras de antígenos (APCs), como macrófagos, linfócitos B e DCs, portando os antígenos anteriormente fagocitados, deixam o sítio

inflamatório e migram em direção aos órgãos linfóides secundários, onde interagem com os linfócitos T CD4⁺, os quais se diferenciam e se ativam, tornando-se células efetoras.

Os linfócitos T *Helper* CD4 (T_H) são reguladores essenciais das respostas imunes adaptativas. As células T_H foram classificadas classicamente como tipo 1 (T_H1) e tipo 2 (T_H2), com base em seus perfis de expressão de citocinas e função imune reguladora (MOSMANN; COFFMAN, 1989). As células T_H1 medeiam a imunidade celular produzindo interferon- γ (IFN- γ), enquanto células T_H2 produzem interleucina 4 (IL-4), IL-5 e IL-13, e medeiam a imunidade humoral e reações alérgicas. No entanto, outras subpopulações de linfócitos, tais como T_H17, estão envolvidas na resposta contra patógenos extracelulares, e as células T reguladoras (Tregs) que são responsáveis pela supressão das respostas imunes (MELLANBY; THOMAS; LAMB, 2009; PARK et al., 2005).

A diferenciação T_H1 é regulada principalmente pelas citocinas IL-12 e IL-27, mediante a ativação do transdutor de sinal e ativador de transcrição 4 (STAT4, (GLIMCHER; MURPHY, 2000), e o fator de transcrição Tbet (BATTEN et al., 2006), respectivamente; a IL-4 atua tanto na diferenciação T_H2 quanto na diferenciação das células Tregs induzindo a expressão do fator de transcrição GATA3. O TGF- β induz a expressão de FoxP3 nas células Tregs na presença da IL-2, enquanto combinado com a IL-6 é capaz de induzir a diferenciação das células T_H17 mediante a expressão do ROR γ t (IVANOV et al., 2006; ZHENG; WANG; HORWITZ, 2008).

As células T_H17, produtoras de IL-17 (IL-17A), têm sido associadas ao desenvolvimento de artrite reumatóide, lúpus e rejeição de enxerto (AGGARWAL; GURNEY, 2002). Além disso, pacientes artríticos tiveram mastócitos produtores de IL-17 nas sinóvias acometidas (SUURMOND et al., 2011), indicando que esta citocina pode ser produzida por outras células que não linfócitos T_H. A ligação da IL-17 ao seu receptor (IL-17R) induz a produção de G-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos), GM-CSF (fator estimulador de colônias granulócito-monócito) e IL-8, o que resulta no recrutamento maciço de neutrófilos (KOLLS; LINDEN, 2004; MOSELEY et al., 2003). Camundongos tratados com antagonista de IL-17R (BUSH et al., 2002), ou deficientes de IL-17R (NAKAE et al., 2003) mostraram-se resistentes à CIA.

A diferenciação e a ativação das células T_H também é dependente da interação com as APCs, que expressam moléculas de classe II do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), CD40 e moléculas coestimulatórias, como CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2) em conjunto com citocinas (FIRESTEIN, 2003; LENSCHOW et al., 1996).

Associadas ao desenvolvimento da artrite autoimune, a IL-6, IL-12, IL-23, IL-27 e a enzima *Indoleamine 2,3-dioxygenase* (IDO) podem ser produzidas por monócitos, macrófagos e DCs em resposta ao estímulo aos PAMPs, principalmente por ligantes dos receptores Toll-like, como LPS, Poly I:C e Oligopeptídeos CpG. Entretanto, foi observado aumento significativo de IL-6 e IL-12p40/70 em lavado peritoneal de animais BALB/c *germ-free* após 6 meses da injeção i.p. de pristane (MIZUTANI et al., 2005), indicando que o pristane é capaz de induzir a produção destas citocinas mesmo na ausência de produtos bacterianos. Os autores sugerem que esse efeito pode ser devido a produtos de células NK, como IFN- γ , que induz a produção de H₂O₂, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, IL-27 e IDO em fagócitos e inibe a expressão de IL-4. (TRINCHIERI, 1995).

A IL-6 apresenta função na diferenciação de células B em plasmócitos secretores de anticorpos (KISHIMOTO, 2005); e apesar de ter sido denominada proteína de fase aguda, também está presente em processos crônicos, sendo detectada em lavados de articulações de pacientes com artrite reumatóide e em lavado peritoneal de camundongos 6 meses após o tratamento com pristane (MIZUTANI et al., 2005). Camundongos deficientes de IL-6 têm redução drástica na incidência de artrite experimental (DE HOOGE et al., 2000); e o bloqueio da atividade da IL-6 com anticorpos anti-IL-6R suprime a CIA (FUGIMOTO et al., 2008), possivelmente devido à redução de células T_H17. Os níveis de IL-6 no peritônio de animais BALB/c injetados com pristane aumentam após cerca de 30 dias, e se mantêm elevados até 150 dias (SHACTER; ARZADON; WILLIAMS, 1992). Estudos do laboratório demonstraram que os animais da L_{III} e H_{III} apresentam elevação semelhante do número de células esplênicas secretoras de IL-6 entre 4 e 15 dias pós-pristane (JENSEN et al., 2006), indicando que a presença isolada desta citocina não responde pela diferença de suscetibilidade entre estas linhagens.

A IL-12 (IL-12p70), composta por duas subunidades, p35 e p40, aumenta a imunidade celular e humoral pela ativação de células T e B. Enquanto em células T, a IL-12 induz a secreção de IFN- γ , nas células B (VOGEL et al., 1996) aumenta a produção dos isotipos de anticorpos IgG2a e IgG3. Este efeito pode ser mediado também pelo IFN- γ (BUCHANAN; ARULANANDAM; METZGER, 1998).

Observa-se que a ausência da IL-12p40, em camundongos IL-12p40^{-/-}, acarreta em resistência a artrite induzida por adjuvantes, indicando forte associação com a doença (SANTOS et al., 2006). A IL-12p40 é produzida em alta concentração (TRINCHIERI, 1995), na forma monomérica ou homodimérica (IL-12p80), por macrófagos e células dendríticas,

independente de estímulo CD40-CD40L mediado por células T CD4⁺, ao contrário da IL-12, a qual depende deste estímulo para ser produzida. A IL-12p80 atua na quimiotaxia de monócitos e macrófagos para o sítio inflamatório e induz migração de células dendríticas para os linfonodos (revisado por COOPER; KHADER, 2007). Além disso, pode competir com a IL-12 na ligação ao IL-12R α , possuindo ação antagonista. A IL-12p40 é descrita como sem atividade biológica em células do sistema imune, porém sua ausência predispõe camundongos a infecções por *Salmonella* (LEHMANN et al., 2001).

A IL-23 é formada por duas subunidades, IL-12p40 e a IL-23p19, esta última induzida por IFN- γ . A deficiência de IL-23p19, mas não da IL-12p35, está associada com resistência a EAE (Encefalomielite autoimune experimental) e CIA em camundongos, indicando ser dependente de IL-23 e independente da IL-12 (CUA et al., 2003; MURPHY et al., 2003). Foi observado que a IL-23 pode aumentar a sobrevivência e proliferação das células T_H17 de memória, contudo não atua na diferenciação de células T CD4⁺ *naïve*, pois o receptor da IL-23 (IL-23R) é somente expresso em células efetoras (BONIFACE et al., 2008) que coexpressam IL-17F (ou IL-25, outra citocina da família da IL-17), TNF- α e IL-6 (LANGRISH et al., 2005).

A IL-27 também compreende duas subunidades, a Ebi3, regulada pela sinalização via CD40L e IL-1 β , e a p28, cuja expressão é aumentada na presença de IFN- γ (LIU et al., 2007; SCHNURR et al., 2005). Além disso, a IL-27 pode ser induzida por ligantes dos receptores semelhantes ao *Toll* (LPS, Poly I:C) e *Escherichia coli* intacta (PFLANZ et al., 2002; SCHNURR et al., 2005; WIRTZ et al., 2005), e também por IFN- α . A IL-27 suprime a resposta Th17 (GUO; CHANG; CHENG, 2008; COLGAN; ROTHMAN, 2006) e de células T reguladoras (WOJNO et al., 2011).

Outra molécula induzida por IFN- γ é a enzima IDO (*Indoleamine 2,3-dioxygenase*) que catalisa a etapa inicial e limitante da degradação do triptofano (SHIMIZU et al., 1978; YOSHIDA; HAYAISHI, 1978). Pode ser produzida por células estromais, mesenquimais, dendríticas, eosinófilos e linfócitos B, e possui um papel imune relevante. A administração de seu inibidor bioativo, o 1-metil-triptofano (1MT), (CADY; SONO, 1991) permite a ativação de células T efetoras *in vitro* (MUNN et al., 1999), acelera rejeição de transplantes mediada por células T (MELLOR et al., 2001), além de inibir o escape imunológico no câncer (MULLER; SCHERLE, 2006), e exacerbar a CIA em camundongos (SZÁNTÓ et al., 2007) levando ao conceito da enzima IDO como imunossupressora envolvida no estabelecimento da tolerância periférica. Entretanto, a inibição da atividade da IDO amenizou inesperadamente os

sintomas de artrite em camundongos K/BxN, levando a diminuição dos títulos de autoanticorpos, redução dos níveis de citocinas inflamatórias, e um curso atenuado da doença; sugerindo um papel na modulação das respostas inflamatórias mediadas por células B autorreativas (SCOTT et al., 2009).

Amplamente estudadas em modelos de autoimunidade, as células B podem estar envolvidas na resistência e na suscetibilidade à artrite experimental. Enquanto uma subpopulação de células B, produtoras de IL-10, pode prevenir o aparecimento de CIA em camundongos (MAURI et al., 2003), a outra é o principal alvo para o desenvolvimento espontâneo de artrite em animais BX2D (HSU et al., 2008).

As células B podem ser divididas em diversas subpopulações. Na cavidade peritoneal, três populações predominam: B1a (CD19⁺/CD5⁺/CD23⁻), B1b (CD19⁺/CD5⁻/CD23⁻), e B2 foliculares ou células B convencionais (CD19⁺/CD5⁺/CD23⁺). As células B1a estão presentes também na cavidade pleural, e promovem a primeira linha de defesa da imunidade inata contra patógenos, junto com as células de origem mielóide. São produtoras dos “anticorpos naturais” de baixa afinidade e polirreativos, da classe IgM, que participam diretamente no *clearance* de corpos apoptóticos e proliferam na presença de IL-5 (revisado por BAUMGARTH, 2011). Camundongos transgênicos portadores do gene *Il5* exibiram níveis elevados de IL-5, IgA e anticorpos anti-DNA polireativos da classe IgM no soro, além de induzir acúmulo de células B1a no baço e de eosinófilos no sangue periférico, medula óssea, baço, músculos e fígado (TOMINAGA et al., 1991). Devido à autorreatividade dos anticorpos da classe IgM, a expansão destas células tem sido também associada à autoimunidade, bem como as células B1b. As células B2 foram caracterizadas como sendo as principais responsáveis pelo desenvolvimento espontâneo de artrite em animais BX2D, uma vez que essas células são induzidas a produzir anticorpos autorreativos quando expostas a IL-17 (HSU et al., 2008). Em resumo, as diferentes subpopulações de células B parecem estar envolvidas com o desenvolvimento da autoimunidade.

A célula Treg é a principal responsável por limitar o dano e a inflamação tecidual associados com a resposta imune inata e adaptativa (MIYARA; SAKAGUCHI, 2007; SHEVACH et al., 2001). São geradas no timo e seu desenvolvimento é dependente da expressão do fator de transcrição Foxp3 (FONTENOT et al., 2003; HORI et al., 2003; KHATTRI et al., 2003), o qual é exclusivamente expresso por células Treg em camundongos (FONTENOT et al., 2005). A depleção de células Treg induzida por drogas em camundongos recém-nacidos ou adultos leva a lesões em múltiplos órgãos (FONTENOT; RUDENSKY,

2005;. KIM et al., 2007). Em humanos, mutações no gene *Foxp3* resultam no desenvolvimento de um distúrbio fatal análogo (IPEX – Desregulação imune, Poliendocrinopatia e Enteropatia ligados ao X) caracterizadas por linfadenopatia, esplenomegalia, e patologia grave da pele e do trato gastrointestinal, bem como inflamação autoimune de múltiplos órgãos, incluindo o pâncreas, fígado, músculos, pulmões e articulações (BRUNKOW et al, 2001;. WILDIN; FREITAS, 2005). A expressão da proteína *Foxp3* é necessária para a função supressora in vivo e in vitro (GAVIN et al., 2007; LIN et al., 2007), enquanto a eliminação da expressão do gene *Foxp3* em células Treg maduras periféricas resulta em perda da função supressora (WILLIAMS; RUDENSKY, 2007). No entanto, a supressão pode ser realizada por outras células pela secreção de citocinas inibitórias (IL-10 e TGF- β), uma vez que macrófagos cultivados com eritropoetina passam a secretar TGF- β suprimindo as respostas de células T efectoras e doença autoimune (MAUSBERG et al., 2011).

O extenso conjunto de dados obtidos de pacientes com RA e de modelos animais de artrite abriu caminho para avanços no diagnóstico de subtipos da doença, com o uso de marcadores como os CCPs. Também permitiu a identificação de alvos para terapia com anticorpos monoclonais (por exemplo, o TNF- α e células B, alvo dos anticorpos anti-CD20, revisado por FOCOSI et al., 2011). Entretanto, ainda pouco é conhecido em relação ao(s) mecanismo(s) que iniciam a quebra de tolerância associada a esta e outras doenças autoimunes. Poucos modelos experimentais permitem a abordagem da fase inicial, pré-clínica, da doença, pois os fenótipos de resistência/suscetibilidade geralmente não estão fixados nas linhagens (POTTER; WAX, 1981; THOMPSON et al., 1990; WOOLEY et al., 1998). Neste caso, a correlação entre alterações presentes na fase pré-clínica e clínica é de interpretação mais complexa. As linhagens HIII e LIII da Seleção III, por sua vez, apresentam extremos de suscetibilidade à PIA. Esta condição permite uma análise das alterações de populações celulares e mediadores que ocorrem em momentos nos quais não há sinais clínicos ou histológicos da doença, sugerindo potenciais mecanismos que possam ser correlacionados com as diferenças genéticas entre estas linhagens.

No modelo de PIA, a influência da constituição genética das linhagens LIII e HIII parece ocorrer nos primeiros dias após a primeira injeção de pristane, pois logo aos 4 dias a linhagem LIII apresentou significativamente mais células do baço produzindo IL-12, IL-1 β e TNF- α quando comparadas às da linhagem resistente HIII (JENSEN et al., 2006). No entanto, as diferenças observadas em células do baço podem refletir em eventos ocorridos no

peritônio. Portanto, a proposta deste projeto foi estudar comparativamente os animais suscetíveis e resistentes avaliando os tipos celulares e os níveis de citocinas e de expressão gênica de fatores de transcrição envolvidos neste processo em diferentes tempos, na fase inicial de indução da PIA.

2 OBJETIVO

Identificar, comparativamente nos animais H_{III} e L_{III}, as diferenças iniciais entre os mecanismos imunes relevantes na resistência/suscetibilidade à artrite induzida pelo pristane.

Para tanto, fizemos a caracterização morfológica e fenotípica das populações celulares presentes na cavidade peritoneal após tratamento com pristane. Avaliamos a produção de citocinas anti- e pró-inflamatórias (por ELISA) e ensaio de expressão do RNA mensageiro em linfonodos drenantes dos genes codificantes para os fatores de transcrição de células T CD4+ envolvidas na inflamação por pristane até 30 após indução.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho experimental

Inicialmente foi comparada a incidência de PIA nas 2 linhagens HIII e LIII utilizando as vias de inoculação i.p. e s.c e a gravidade foi avaliada com diferentes doses de pristane. Após a determinação da via i.p. para inoculação, avaliamos as características morfológicas e fenotípicas das populações celulares presentes na cavidade peritoneal após tratamento com pristane em diferentes períodos de tempos (4, 7, 17, 30 dias após). Posteriormente, escolhemos o período de sete dias devido a diferenças significativas observadas no infiltrado inflamatório. Além disso, determinamos a produção de citocinas no ambiente peritoneal por ELISA e qRT-PCR. Avaliamos em linfonodos mesentéricos, em diferentes tempos, a expressão de genes codificantes de fatores de transcrição associados com a diferenciação de subpopulações de células T CD4⁺ envolvidas na inflamação por pristane.

3.2 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos de ambos os sexos, a partir da 43^o geração de isogenia da Seleção III, entre dois e três meses de idade. Esses animais são produzidos e mantidos no Biotério do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan. Os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas da USP e pela Comissão de Ética no Uso de animais do Instituto Butantan.

3.3 Artrite induzida por pristane

Os animais foram injetados com 0,5mL de pristane (2,6,10,14-tetrametilpentadecano, Sigma Chemical Co.,EUA) pela via intraperitoneal. Nos experimentos em que analisamos a fase clínica da PIA, foi realizado o protocolo de duas injeções de pristane com intervalo de 60 dias (JENSEN et al., 2006), pelas vias subcutânea (doses de 0,1 ou 0,5mL) ou intraperitoneal (0,5mL). Os animais artríticos foram avaliados quanto à sua gravidade por avaliação visual e atribuição de escores. O escore da artrite foi determinado de 0 a 3 para cada pata (0 = normal; 1 = leve inchaço, vermelhidão; 2 = inchaço grave, vermelhidão; 3 = grave inchaço, vermelhidão e rigidez nas articulações). O escore máximo possível é 12 para cada animal.

3.4 Quantificação da inflamação induzida pelo pristane

Para a quantificação da reação inflamatória foi determinado o número de leucócitos

infiltrantes na cavidade peritoneal em câmara hemocitométrica de Malassez. A contagem diferencial de 100 células foi realizada em lâminas coradas com *Giemsa* após citocentrifugação.

3.5 Determinação da produção de citocinas no exsudato inflamatório

Os ensaios de ELISA para as citocinas IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-17, IL-18, TNF- α , e IFN- γ foram realizados com Kits da BD OptEIA™ Mouse ELISA Set (BD Biosciences, EUA); a IL-4 e IL-17 foram quantificados com os Kits Ready Set Go® (eBioscience, EUA) todos de acordo com as especificações do fabricante. Utilizamos placas de poliestireno de 96 poços NUNC® - Maxisorp (NalgeNunc International, EUA). As concentrações das amostras foram determinadas baseando-se na curva-padrão dos respectivos recombinantes. A leitura das placas foi realizada no aparelho μ Quant (Bio-Tek Instruments, EUA) utilizando-se comprimento de onda de 450nm com correção λ de 570nm.

3.6 Quantificação da liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Foram distribuídas, em octuplicata, numa placa de 96 poços (NUNC), alíquotas de 100 μ L de células totais do peritônio (2×10^6 mL⁻¹) de animais tratados ou não com pristane, ressuspensas em Solução de Vermelho Fenol (SFV). Adicionados 10 μ L (20ng) de PMA (*Phorbol Myristate Acetate* - Sigma Chemical Co.) em metade dos poços, a placa foi incubada em estufa de cultura a 37 °C, 5% de CO₂, por 60 minutos. Em seguida, a reação foi interrompida adicionando 10 μ L de NaOH (1N) por poço e a curva padrão obtida a partir de concentrações molares conhecidas de H₂O₂ (0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 nmoles de H₂O₂/100 μ L da SFV). A absorbância foi determinada em leitor de ELISA (Labsystems Multiscan EIA) utilizando-se o filtro de 620nm.

3.7 Caracterização fenotípica das células do peritônio mLN por citometria de fluxo

Após o sacrifício em câmara de CO₂, os animais tiveram seus órgãos linfóides secundários macerados com o auxílio de uma pinça em PBS pH 7,4 + 10%SFB e as células centrifugadas por 5 minutos a 300 g a 10 °C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e adicionado 1mL de PBS + 10%SFB ao pellet, o qual foi ressuspendido para contagem das células em câmara de Malassez. No caso das células peritoneais, foi realizada lavagem da cavidade peritoneal com 5 mL de meio RPMI 1640 não suplementado. Em seguida, as células foram centrifugadas a 300 g e o sobrenadante foi armazenado a -80 °C. As células foram

homogeneizadas e incubadas em 5 mL de solução de lise {0,07M NH₄Cl + 0.01M NaHCO₃ + 10mM EDTA (pH 8,0)} a 37 °C. Após 5 minutos, foram adicionados 5 mL de PBS e as células centrifugadas por 5 minutos a 4 °C / 300 g. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular ressuspendido para contagem em câmara de Malassez.

As subpopulações celulares foram caracterizadas por citometria de fluxo por meio da marcação com anticorpos monoclonais específicos: GR1 (clone RB6-8C5), CD11b (clone M1/70.15), CD11c (clone HL3) CD4 (clone GK1.5), CD8 (clone 53-6.7) e B220 (clone RA3-6B2) marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), alofocianina (APC), ou PE-Cy5, de acordo com a combinação desejada. As aquisições foram realizadas em citômetro FACScantoII (BD Biosciences, San Diego, EUA), considerando um mínimo de 10000 eventos e os dados analisados pelo programa FlowJo (Tree Star - USA). Como controles negativos das marcações, células foram incubadas com anticorpos dos mesmos isotipos dos clones utilizados nas marcações.

Paralelamente, grupos controle de animais das duas linhagens foram injetados com solução salina fisiológica.

3.8 Extração de RNA total de linfonodos e células peritoneais

Após o sacrifício em câmara de CO₂, o linfonodo mesentérico e as células peritoneais foram preservados em solução RNAlater[®] (Ambion, EUA), a -20 °C. Para a extração do RNA total, os tecidos ou células foram removidos da solução e transferidos para tubos contendo o reagente Trizol[®] (Invitrogen, EUA). A extração foi realizada de acordo com as instruções do fabricante, e a concentração e pureza do RNA total purificado foram determinadas em espectrofotômetro nas absorvâncias de 260 e 280nm. Além disso, a integridade e qualidade das preparações foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1,0%. As amostras de RNA só foram utilizadas se a razão da Abs 260/280nm fosse maior que 1,8 e não apresentassem sinais visíveis de degradação no gel de agarose.

3.9 Obtenção do DNA complementar (cDNA)

A síntese de cDNA foi feita por meio de reação de transcrição reversa a partir do RNA total purificado. Para tanto, foram adicionados 1µL de oligo(dT₁₂₋₁₈) 50µM, 2µL de água livre de RNase e e 1µl de oligonucleotídeos dNTP (10µM) a 1µg/10µl de RNA. A mistura foi homogeneizada e aquecida a 65 °C por 5 minutos e em seguida resfriadas em banho de gelo por 1 minuto. Adicionamos 1µl da enzima SuperScript III RNase H- Reverse Transcriptase –

Invitrogen (200U/ml); 1µl de DTT (100mM), 4µl de tampão 5 x concentrado, específico para a enzima (250 mM Tris-HCL pH 8,3, 375 mM KCL e 15 mM MgCl₂). Em seguida, as amostras foram aquecidas a 50 °C por 50 minutos e posteriormente inativadas a 70 °C por 15 minutos. As reações foram realizadas em aparelhos termocicladores Eppendorf – Mastercycler Gradient (Eppendorf, Alemanha) ou MJ Research (MJ Research, USA).

3.10 Sequências de oligonucleotídeos utilizados na expressão de proteínas

Para a amplificação dos cDNAs dos genes *Tbx21*, *Gata3*, *Rorc* e *Foxp3*, *Il17a*, *Il23a*, *Il21*, *Il25*, *Il27p28*, *Ebi3*, *Ido1*, *Ptgs2*, *Il4*, *Il5*, *Tgfb* e *Ahr*, utilizamos os oligonucleotídeos (*primers*) listados abaixo (**Tabela 1**). Estes *primers* foram desenhados para permitir a hibridação com éxons que flanqueiam íntrons de grande tamanho (~ 1000 pb), evitando a amplificação de DNA genômico contaminante eventualmente presente nas amostras.

Como controle positivo da expressão dessas moléculas determinamos paralelamente em todas as amostras a expressão do gene *Ppia* (Ciclofilina), que codifica uma proteína constitutivamente expressa por células de mamíferos.

Tabela 1: Sequência de *primers* utilizados na síntese de mRNA

<i>Primer</i>	Sense	anti-sense	pb
<i>Ppia</i>	AGCGTTTTGGGTCCAGGAAT	AAATGCCCGCAAGTCAAAAG	72
<i>Gata3</i>	CACCACCCATTACCACCTA	TCACACACTCCCTGCCTTCT	132
<i>Rorc</i>	CGCACCAACCTCTTTTCAC	CTCCATTGCTCCTGCTTTC	135
<i>Tbx21</i>	TTGTGGATGTGGTCTTGGTG	CCCTTGTTGTTGGTGAGCTT	171
<i>Il27p28</i>	ATTGCCAGGAGTGAACCTGGACCT	AAGTGTGGTAGCGAGGAAGCAGAG	97
<i>Ido1</i>	TCTGTCTGGCTGGAAATGC	GACTCTGGAAGATGCTGCTC	61
<i>Il17a</i>	GCGTGTCCAAACACTGAGGCCA	ATTGCGGTGGAGAGTCCAGGGT	124
<i>Il23a</i>	TCAGCCAACCTCCTCCAGCCAGA	TGCCACTGCTGACTAGAACTCAGG	34
<i>Ebi3</i>	ACACCGAGCCTGTAAGTGGCAA	GTGCAATGCCATGCTTCTCGGT	90
<i>Il25</i>	TCAACAGCAGGGCCATCTCTCC	ACAGGCATCGAGCGTGGTACA	68
<i>Il21</i>	CGCCTCCTGATTAGACTTCG	GCCCCTTTACATCTTGTGGA	90
<i>Foxp3</i>	TCCTTCCCAGAGTTCTTCCA	AAGTAGGCGAACATGCGAGT	145
<i>Il4</i>	TCGGCATTTTGAACGAGGTC	GAAAAGCCCCGAAAGAGTCTC	197
<i>Il5</i>	TCACCGAGCTCTGTTGACAA	CCACACTTCTCTTTTTGGCG	182
<i>Tgfb1</i>	ACCGCAACAACGCCATCTAT	GTAACGCCAGGAATTGTTGC	181
<i>Ptgs2</i>	ACACACTCTATCACTGGCACC	TTCAGGGAGAAGCGTTTCC	257
<i>Ahr</i>	AGAATCCCACATCCGCATGA	TGCAAGAAGCCGAAAACCTG	45

FONTE: (ROSSATO, 2011).

3.11 Quantificação da expressão gênica por PCR em Tempo-Real (qPCR)

Foi avaliada a expressão gênica no cDNA de mRNA para os genes *Tbx21*, *Gata3*, *Rorc* e *Foxp3* (linfonodos) *Il17a*, *Il23a*, *Il21*, *Il25*, *Il27p28*, *Ebi3* e *Ido1* (células peritoneais) após estímulo com pristane., por PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Ao cDNA de cada amostra, foi adicionada uma mistura contendo os *primers* (concentração final 0,2µM de cada primer), Platinum SYBR[®] Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen, EUA) 2X concentrado, e água para ajustar o volume final de reação em 25µL por tubo, de acordo com protocolo do fabricante.

As reações foram monitoradas no aparelho Chromo 4 (MJ Research, EUA) e submetidas a uma fase inicial de incubação à 50 °C por 2 minutos, seguido da fase de ativação da enzima (*hot start*) 95 °C à 5 minutos. As sequências alvo foram então amplificadas durante 40 ciclos constituídos de etapas sucessivas de desnaturação (95 °C por 20 segundos), e de anelamento (60 °C por 35 segundos). A cada amostra foi atribuído um valor de Ct (*Cycle Threshold*), que é o ciclo da reação em que a fluorescência incorporada às duplas fitas amplificadas ultrapassou a fluorescência de fundo, no início da fase logarítmica (log) de amplificação. Esta dependeu diretamente de quantas cópias das sequências alvo havia inicialmente em cada amostra. Após a amplificação, o produto da reação foi submetido a uma fase de dissociação (*Melting*) onde a temperatura variou de 55 °C a 90 °C e a fluorescência foi adquirida a cada 1

°C, registrando-se a temperatura de dissociação, ou desnaturação da dupla fita do material amplificado, o que indica o tamanho e, portanto a especificidade do produto amplificado em cada reação.. Os dados foram adquiridos pelo programa *Opticon Monitor Analysis Software* 2.03.

Os dados dos genes *Tbx21*, *Foxp3*, *Gata3* e *Rorc* foram analisados pelo programa REST2009[®] (QIAGEN, Hilden, Germany), que leva em consideração a eficiência de amplificação da reação. Esta foi calculada por meio da regressão linear de uma série de diluições de um “pool” de cDNAs dos animais experimentais. O gene da ciclofilina (*Ppia*) teve eficiência de 113%; *Tbx21*: 110%; *Foxp3*: 107%; *Gata3*: 125% e *Rorc*: 125%

Para os demais genes, não conseguimos avaliar a eficiência de amplificação da reação. Neste caso, a quantificação do gene alvo foi realizada pelo método de *Threshold Comparativo* (GIULIETTI et al., 2001 e LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Neste método fórmulas aritméticas são usadas para calcular níveis de expressão relativos a um calibrador. A quantidade do gene alvo, normalizado para um gene endógeno (gene constitutivo) e relativa ao calibrador é dada pela fórmula:

$$\text{Expressão relativa} = 2^{-[(\text{Ct alvo amostra} - \text{Ct constitutivo}) - (\text{Ct alvo calibrador} - \text{Ct constitutivo})]}$$

Assim, a equação representa a expressão normalizada do gene alvo, em uma amostra cuja quantidade é desconhecida, relativa à expressão normalizada da amostra calibradora, embora não leve em consideração a eficiência dos *primers*.

3.12 Análise histológica

Após o sacrifício, as patas traseiras dos animais foram cortadas acima da articulação tíbio-társica e após a remoção da pele foram fixadas em formalina tamponada por 24 horas. Após descalcificação em 5% de ácido fórmico, as patas foram incluídas em parafina, cortadas e coradas com hematoxilina-eosina. A avaliação foi feita em microscópio óptico (Leitz-Dioplan) e a aquisição e digitalização das imagens através do sistema de digitalização de imagens CCD-IRIS (Sony Company).

3.13 Análise Estatística

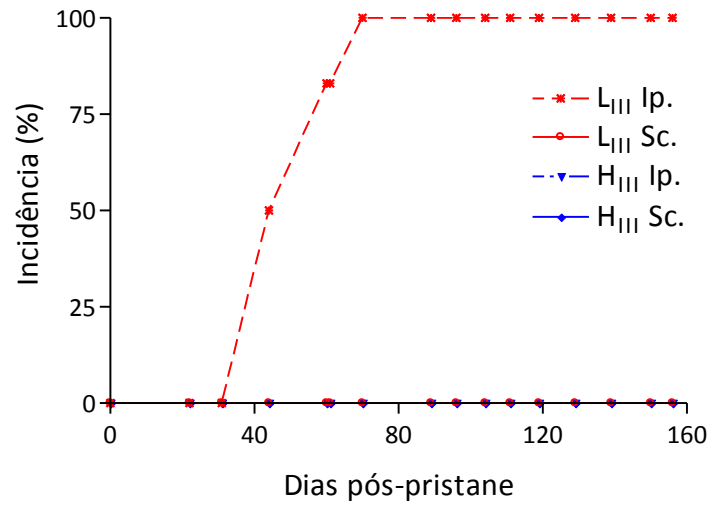
As diferenças entre as médias das linhagens estudadas nos experimentos de ELISA e qPCR foram determinadas pelo teste *t* de Student ou análise de variância (ANOVA), sendo estabelecido como nível mínimo de significância $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Influência da via de inoculação e do número de doses na PIA

Os animais H_{III} mostraram-se resistentes à artrite experimental independente da via de inoculação, enquanto que os camundongos L_{III} desenvolveram artrite somente se injetados por via intraperitoneal. Este padrão não dependeu da dose utilizada, pois os camundongos L_{III} não desenvolveram artrite tanto com a dose subcutânea de 0,1mL (**Figura 1**) quanto a de 0,5mL. Em relação ao número de inoculações de pristane, embora a progressão tenha sido mais lenta em alguns pontos no grupo injetado uma vez, a incidência e a gravidade aos 156 dias foi não diferiu entre os grupos (**Figura 2**), indicando que uma única dose de pristane no peritônio é capaz de desencadear os mecanismos envolvidos na resistência a PIA nos animais H_{III} ou na susceptibilidade nos L_{III}.

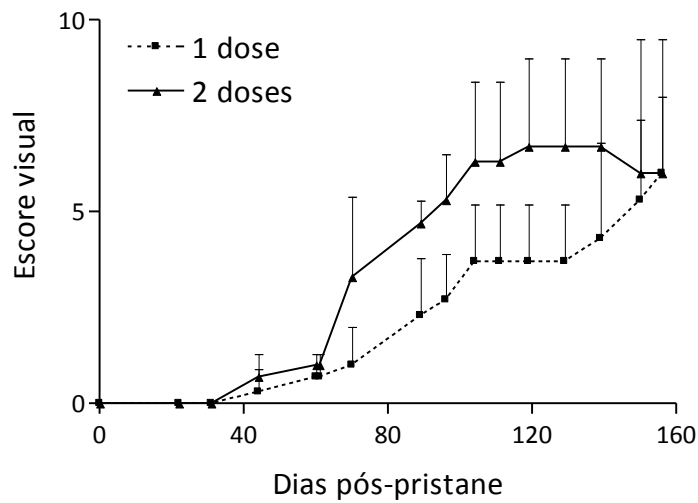
Figura 1. Suscetibilidade dos camundongos L_{III} a PIA depende da via de inoculação



Incidência de PIA nos camundongos L_{III} ou H_{III} após injeção de intraperitoneal (Ip, 0,5mL) ou subcutânea (Sc, 0,1mL ou 0,5mL) de pristane, acompanhados por 156 dias. Dados representativos de três experimentos independentes.

FONTE: (ROSSATO, 2011).

Figura 2. Gravidade da PIA é inalterada pelo número de doses



Escore visual da PIA nos camundongos L_{III} susceptíveis após uma ou duas injeções (60 dias de intervalo) intraperitoneais de pristane, acompanhados por 156 dias. Os valores representam média +DP (n=3).

FONTE: (ROSSATO, 2011).

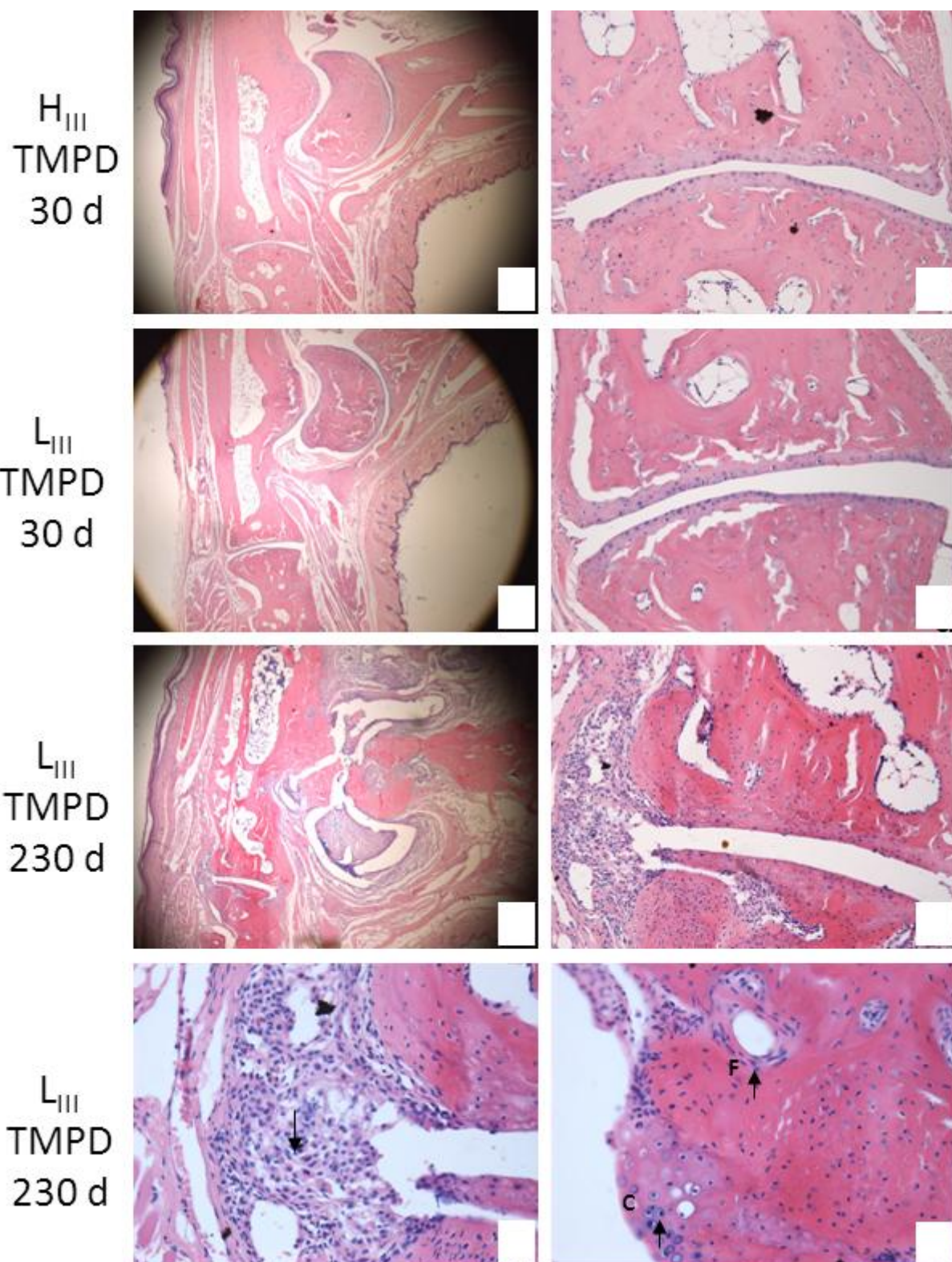
4.1 Análise histológica

O aparecimento dos sintomas de artrite observáveis macroscopicamente em nosso modelo, isto é, eritema e ou edema nas patas, ocorre aproximadamente aos 45 dias após a injeção de pristane. Buscamos identificar eventuais alterações microscópicas nas articulações dos animais tratados com pristane na fase pré-clínica, em um tempo próximo do início do aparecimento dos sintomas. O tratamento com pristane não acarretou alterações nas articulações dos animais H_{III} e L_{III} em períodos até 30 dias após a injeção de pristane (**Figura 3, a-d**). Nas articulações dos animais L_{III}, após 230 dias do tratamento com pristane, foram observados infiltrados inflamatórios, com predomínio de células mononucleares e pronunciada proliferação de fibroblastos (**Figura 3f, g e h**), com perda da organização estrutural da articulação e formação de pannus (**Figura 3g**), caracterizado por espessamento da membrana sinovial, com invasão da cavidade articular e cartilagem adjacente (**Figura 3h**). Os animais de ambas as linhagens tratados com salina não apresentaram alterações histológicas aos 230 dias (dados não mostrados).

Animais das linhagens H_{III} e L_{III} foram injetados com pristane e após 30 ou 230 dias os membros posteriores foram removidos e corados com HE. **(a-c)** articulação tibiotársica de animais H_{III} **(a/b)** e L_{III} **(c/d)** após 30 dias da injeção de pristane, com aspecto normal e ausência de infiltrado inflamatório **(a/c: aumento 40X; b/d: 200X)**; **(e/h)** Articulação de animal L_{III} 230 dias após a injeção de pristane. Há perda de organização estrutural **(e: aumento 40X)**; perda de tecido do osso subcondral **(f: aumento 200X)**; infiltrado mononuclear (seta) ocasionando espessamento da membrana sinovial e invasão do tecido articular, ou pannus (seta em **g: aumento 400X)**; proliferação das células da cartilagem (C) e fibroblastos (F) com destruição da própria cartilagem e do tecido ósseo **(h: aumento 400X)**. Os animais controles de ambas as linhagens apresentaram aspecto histológico normal em ambos os tempos.

FONTE: (ROSSATO, 2011).

Figura 3. Histologia das patas dos animais tratados com pristane

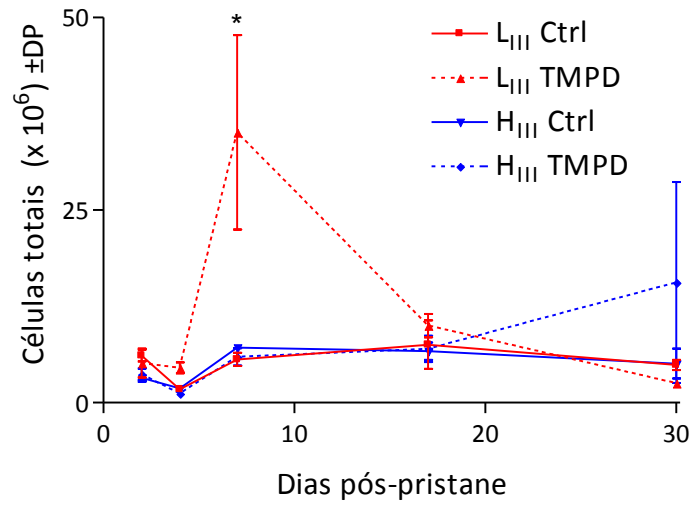


4.2 Inoculação intraperitoneal de pristane induz infiltrados celulares distintos

Considerando os resultados anteriores, nós buscamos avaliar, mediante a contagem diferencial e total do infiltrado celular, se a inflamação proporcionada pelo pristane também difere entre as linhagens. Para tanto, injetamos pristane no peritônio desses animais e depois de transcorridos 2, 4, 7, 17 e 30 dias, realizamos a lavagem peritoneal.

As contagens de células em câmara de Malassez e diferencial revelaram que as linhagens HIII e LIII são semelhantes em número total (Figura 3) e nas proporções de populações de leucócitos residentes (Figura 4b) no peritônio não estimulado por pristane. A grande maioria das células residentes é de monócitos/macrófagos, com menor proporção de linfócitos e mastócitos, e um número muito reduzido de eosinófilos e neutrófilos. O número de células totais aumentou (* $p < 0,05$) na linhagem LIII aos 7 dias, enquanto a linhagem HIII teve número de células similar ao controle (**Figuras 4 e 5a**). A contagem diferencial do citocentrifugado das células do peritônio evidenciou números elevados de neutrófilos, fagócitos mononucleares (monócitos e macrófagos) e linfócitos (* $p < 0,05$) nos animais LIII no mesmo período, ao passo que os camundongos HIII tiveram números diminuídos de linfócitos e fagócitos mononucleares (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,0001$ respectivamente), e em contrapartida, número aumentado de granulócitos (** $p < 0,01$, **Figura 5b**), embora em número menor que nos animais LIII. Esses resultados indicam que o estímulo com pristane induz um infiltrado inflamatório qualitativa e quantitativamente diferente em ambas as linhagens (LIII e HIII).

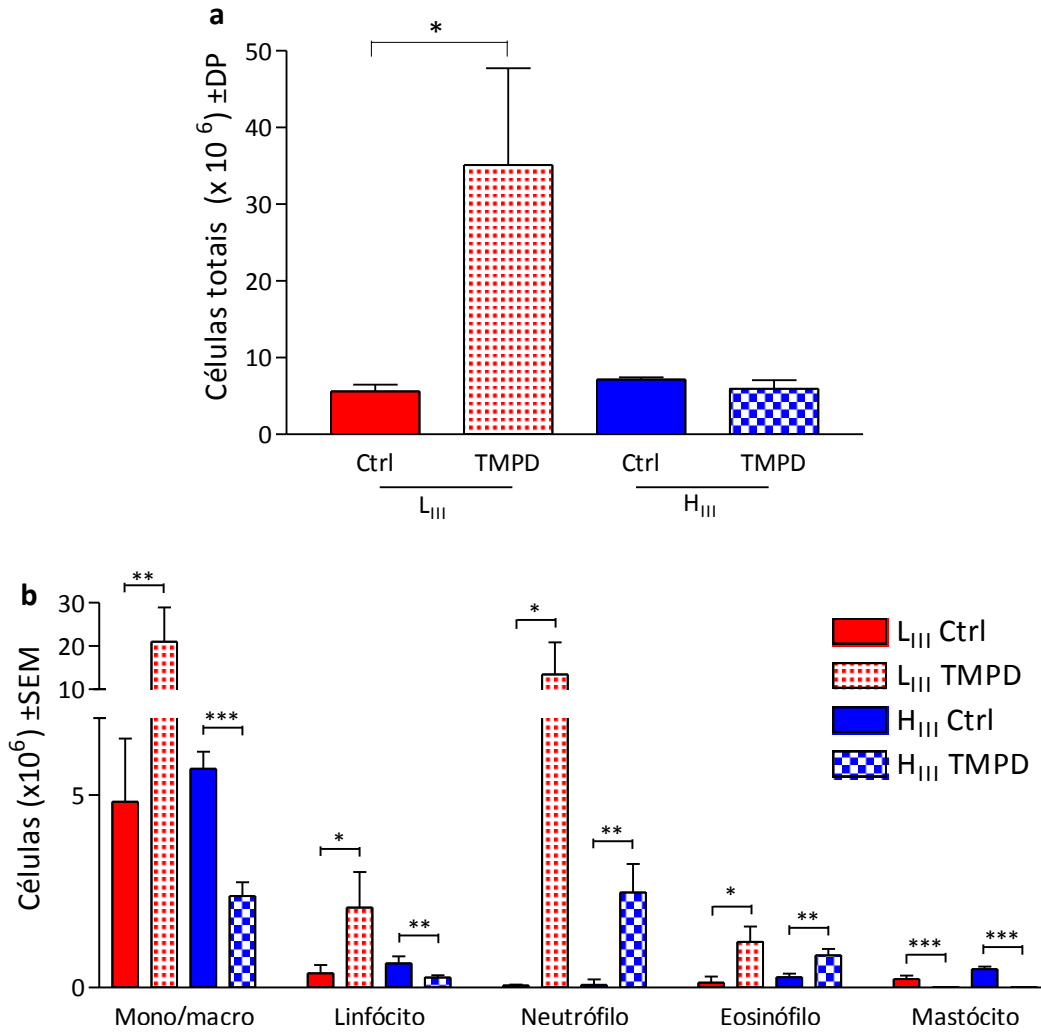
Figura 4. Cinética de inflamação na cavidade peritoneal pós-pristane



Cinética de inflamação na cavidade peritoneal pós-estímulo com pristane (TMPD) ou salina (Ctrl) nos camundongos L_{III} e H_{III} após 2, 4, 7, 17 e 32 dias. Os valores representam média \pm DP (n=5), *p<0,05 (ANOVA).

FONTE: (ROSSATO, 2011).

Figura 5. Infiltração celular aumentada no peritônio dos camundongos L_{III} aos 7 dias



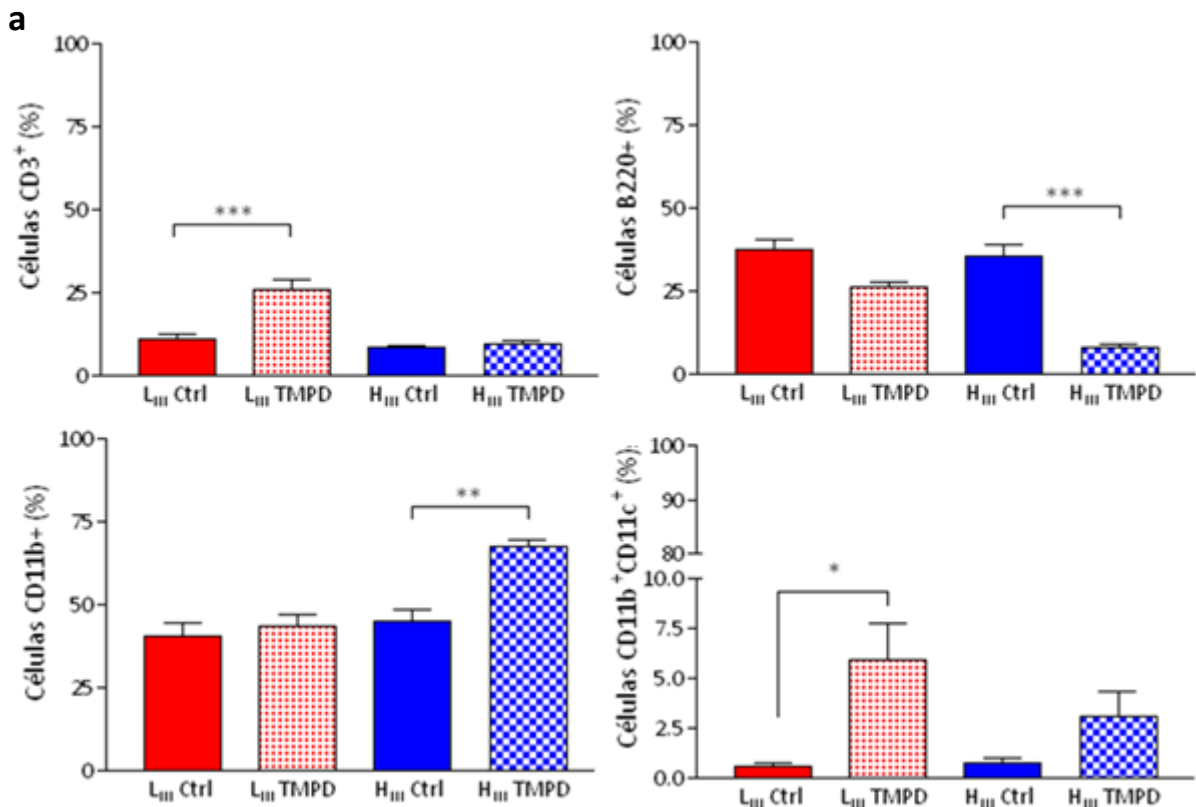
Perfil de células na cavidade peritoneal pós-estímulo com pristane (TMPD) ou salina (Ctrl) nos camundongos L_{III} e H_{III} aos 7 dias. **(a)** representa o número absoluto de células infiltradas, em **(b)** o número absoluto de tipos celulares específicos. Os valores representam média ± DP (n=5) (teste *t* de Student, **p*<0,05; ***p*< 0,01; ****p*<0,001).

FONTE: (ROSSATO, 2011).

4.3 Citometria de Fluxo de células do lavado peritoneal

A análise das populações de células do peritônio, com os marcadores CD3, B220, CD11b e CD11c, revelou diminuição na proporção de células B220⁺ em ambas as linhagens 7 dias após o tratamento com pristane, a qual foi significativa (*p<0,05) somente na linhagem H_{III} (**Figura 6a**). A população de células CD3⁺ nos animais da linhagem L_{III} aumentou em proporção após o tratamento com pristane, enquanto na linhagem H_{III} não foi observada alteração significativa (**Figura 6a**). A proporção de células CD11b⁺ aumentou nos animais H_{III} tratados com pristane (**Figura 6c**). Houve aumento de células CD11b⁺/CD11c⁺ em ambas as linhagens após o tratamento com pristane, porém nos animais L_{III} o aumento foi significativo (**Figura 6d**). Além disso, foi observada diminuição significativa na proporção de células CD80⁺ e CD86⁺ em ambas as linhagens após o tratamento com pristane; e não houve diferença na expressão de Fas e FasL entre os grupos (dados não mostrados).

Figura 6. Populações de linfócitos e células dendríticas peritoneais

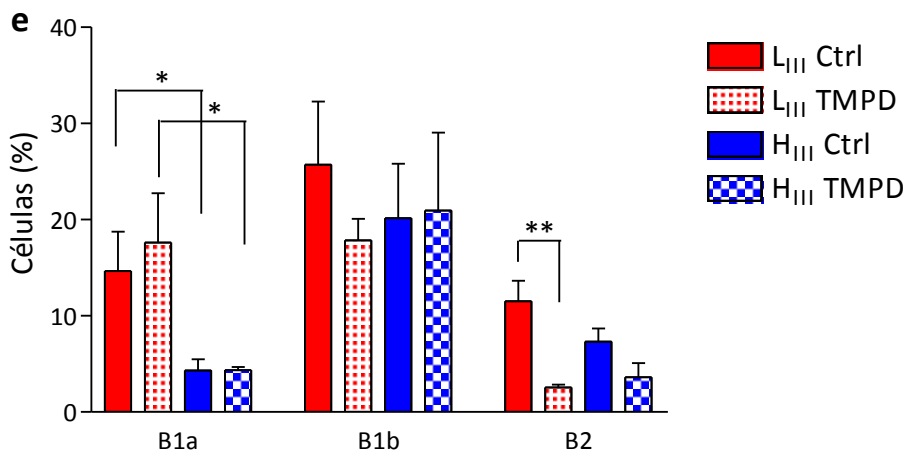
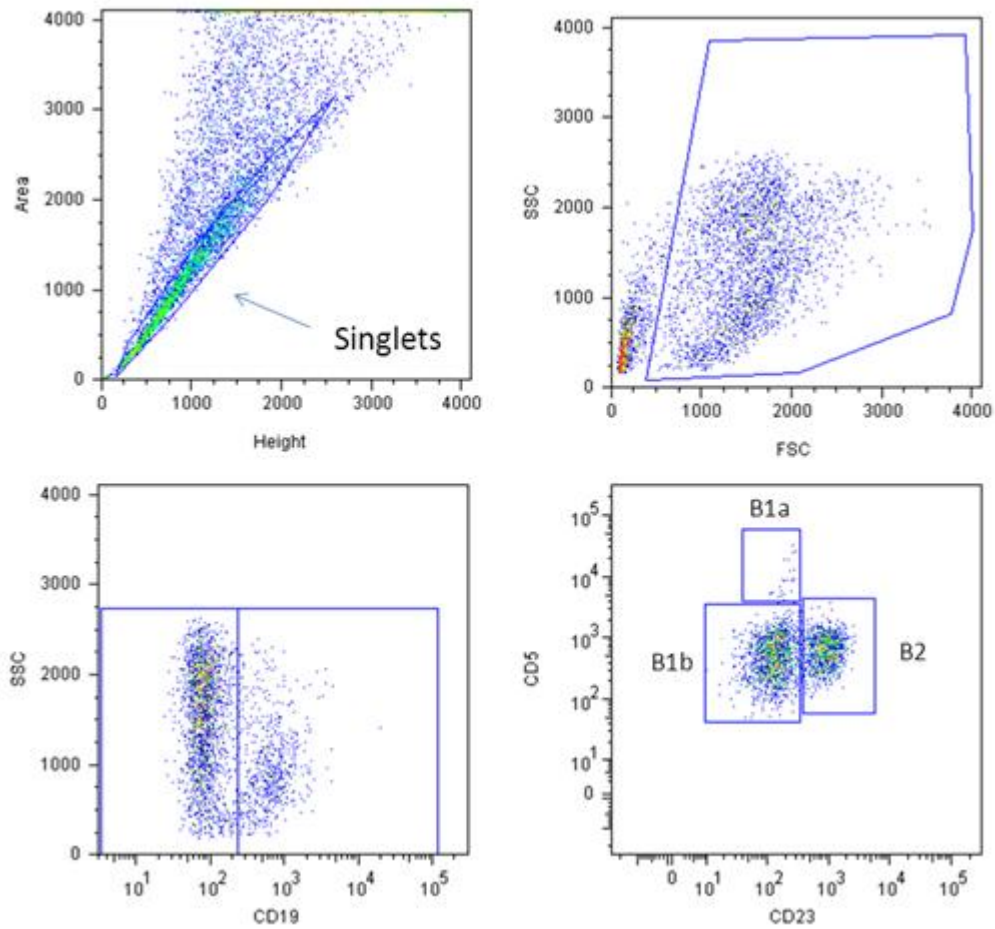


Análise dos animais H_{III} e L_{III} no dia 7 após a injeção intraperitoneal de pristane. **(a)** linfócitos T CD3⁺, **(b)** linfócitos B B220⁺, **(c)** células CD11b⁺, **(d)** células dendríticas CD11c⁺. Dados representativos de dois experimentos independentes (ANOVA, *p<0,05; **p<0,01;***p<0,001).

FONTE: (ROSSATO, 2011).

A imunofenotipagem das células B presentes no peritônio, segundo o critério de análise mostrado na **Figura 7 (a-d)**, revelou diminuição na proporção de células B2 (CD19⁺ CD23⁺ CD5⁻) em ambas as linhagens após o tratamento com pristane, porém de maneira significativa (*p<0,05) unicamente na linhagem L_{III} (**Figura 7e**), entretanto, não foi possível determinar se este efeito é direto, tóxico ou via indução de apoptose, ou se houve migração de parte destas células para fora da cavidade peritoneal. Nas subpopulações de células B1a (CD19⁺ CD23⁻ CD5⁺) e B1b (CD19⁺ CD23⁻ CD5⁻) não houve alterações após o tratamento com pristane. Um dado interessante foi verificado na condição basal entre os animais L_{III} e H_{III}, que apresentam proporções diferentes de células B1a (**Figura 7e**), sugerindo que a diferença na proporção de células B1a pode regular os padrões de citocinas no microambiente peritoneal.

Figura 7. Análise por citometria de fluxo das subpopulações de células B peritoneais



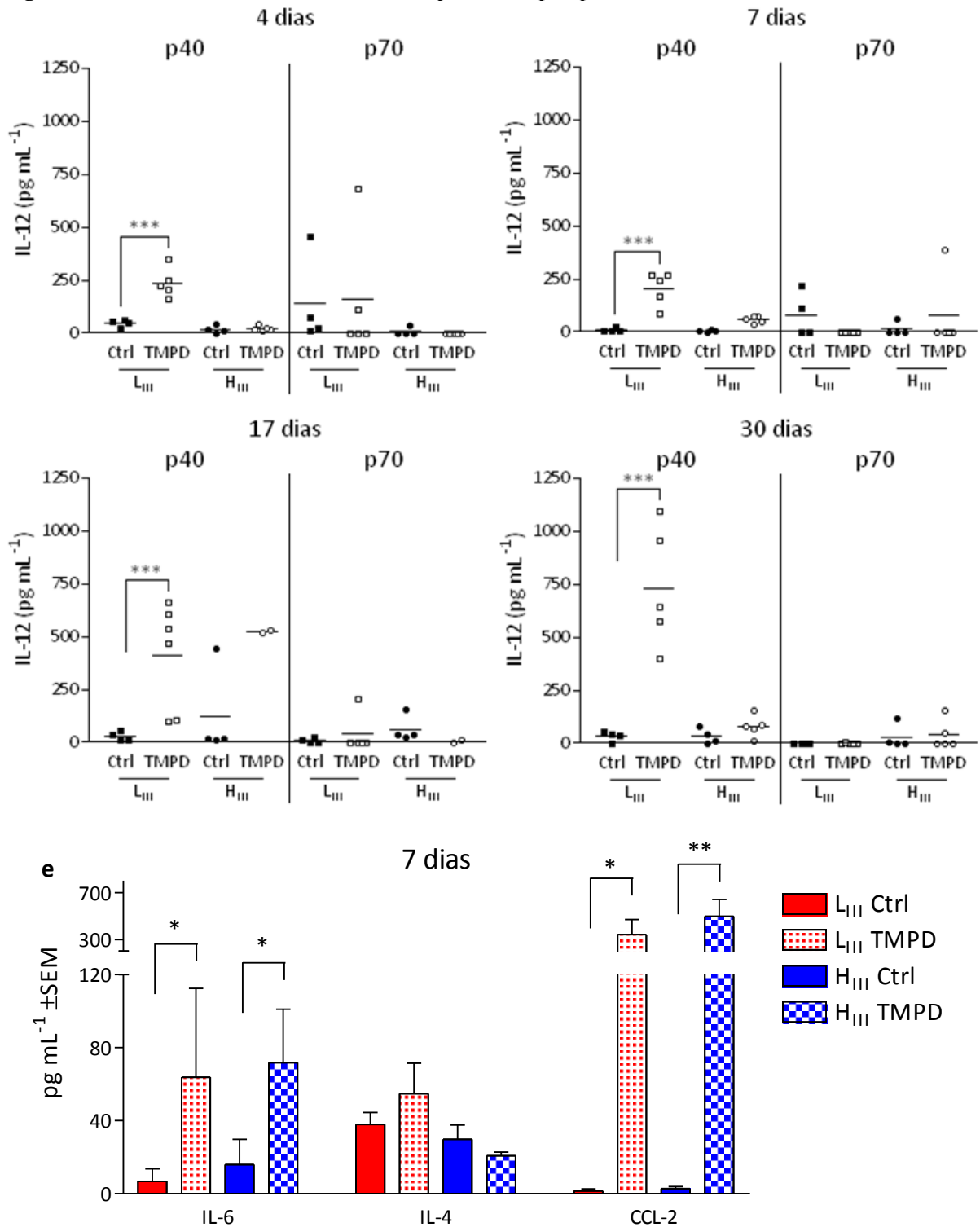
Alterações celulares nos animais H_{III} e L_{III} no dia 7 após a injeção intraperitoneal de pristane. (a-d) esquema de análise das populações de células B. (e) percentual de células B no peritônio. Dados representativos de 4 animais por grupo (ANOVA, *p<0,05, **p<0,01).

FONTE: (ROSSATO, 2011).

4.4 Avaliação do lavado peritoneal dos animais H_{III} e L_{III}

Comparando com seus respectivos controles, a quantificação de citocinas revelou níveis elevados de IL-12p40 (*p<0,05) no lavado peritoneal dos animais L_{III} em todos os tempos testados, enquanto os animais H_{III} não apresentaram diferença significativa (**Figura 8a-d**). Houve produção de IL-1 β após a injeção de pristane, porém com diferença estatística entre os grupos, apenas aos 7 dias. Entretanto, as diferenças não se repetiram em outros experimentos (dados não mostrados). A produção da IL-12p70 foi baixa e não diferiu entre os grupos, bem como a concentração de IL-4. A IL-6 foi produzida pelos animais tratados com pristane, enquanto que os controles a produziram próximo ao limite de detecção do ensaio (diferença não significativa). A quimiocina CCL-2 aumentou de maneira expressiva em ambas as linhagens (**Figura 8e**), porém foi significativamente diferente (p<0,01) apenas na linhagem H_{III}. Não foi detectada a presença de IL-10, IL-17 e IFN- γ em nossos experimentos (dados não mostrados). A quantificação da IL-18 e do TNF- α não foi possível devido a problemas na curva-padrão.

Figura 8. Perfil de citocinas do lavado peritoneal pós-pristane



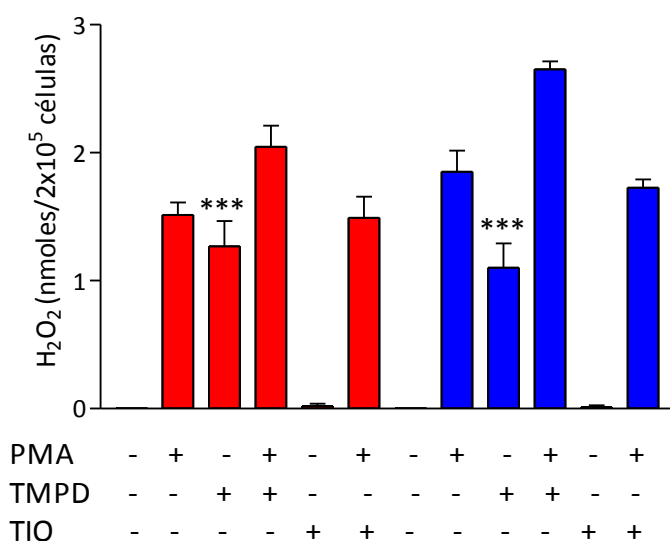
(a-d) representa o nível de IL-12p40 e IL12p70 em pg mL⁻¹ aos 4, 7, 17 e 30 dias; em (e) IL-6, IL-4 e CCL-2 (MCP-1) aos 7 dias após pristane. Em vermelho: animais L_{III}; em Azul: H_{III}. Os valores representam média ±DP (n=4 (Ctrl) ou 5 (TMPD) (two-way ANOVA, *p<0,05; **p< 0,01; ***p<0,001).

FONTE: (ROSSATO, 2011).

4.5 Produção *in vitro* de peróxido de hidrogênio por células peritoneais

Detectamos aumento na produção de peróxido de hidrogênio nas células peritoneais cultivadas por 24 horas, com ou sem PMA, nos animais L_{III} e H_{III} tratados com pristane (TMPD). As células de animais tratados com salina não produziram H₂O₂, a não ser quando cultivadas com PMA (controles positivos). As células coletadas de animais tratados com tioglicolato produziram níveis baixos, não significativos, de H₂O₂ (**Figura 9**). Aparentemente, o efeito do PMA e TMPD foi aditivo, pelo menos numericamente.

Figura 9. Peróxido de hidrogênio produzido por células peritoneais



TMPD: 7 dias ; TIO: 4 dias; animais controles (salina): 7 dias. Em vermelho: animais L_{III}; em Azul: H_{III}. Os valores representam média ±SEM (n=4 (Ctrl) ou 4 (TMPD) ou 6 (TIO) (ANOVA, ***p<0,001: TMPD em relação ao Ctrl).

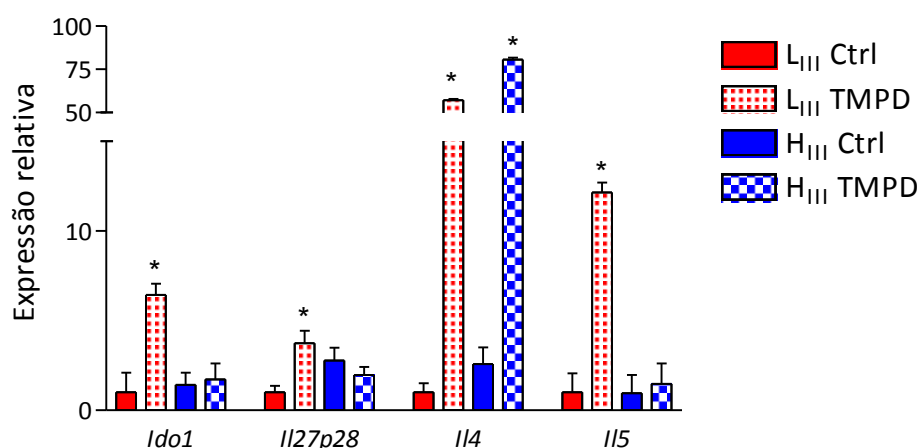
FONTE: (ROSSATO, 2011).

4.6 Expressão gênica

4.6.1 Células do lavado peritoneal

Comparando com seus respectivos controles, a expressão gênica de moléculas envolvidas na resposta imune, como *Ido1* e citocinas *Il-27p28*, *Il4* e *Il5*, revelou níveis significativamente elevados nos animais L_{III}, após o tratamento com pristane, enquanto que na linhagem H_{III} houve um aumento significativo somente para a *Il4* (**Figura 10**). Avaliamos também a expressão de *Tgfb*, *Il23p19*, *Ptgs2* (COX2) e *Ahr*, os quais não mostraram diferença significativa (dados não mostrados).

Figura 10. Expressão gênica diferencial de citocinas de células peritoneais



mRNA de células peritoneais de camundongos L_{III} e H_{III} aos 7 dias após injeção i.p. de pristane (TMPD) ou salina (Ctrl). Dados representam média \pm SEM (n=5) (Software REST[®] 2009, *p < 0,05 tratados vs controles).

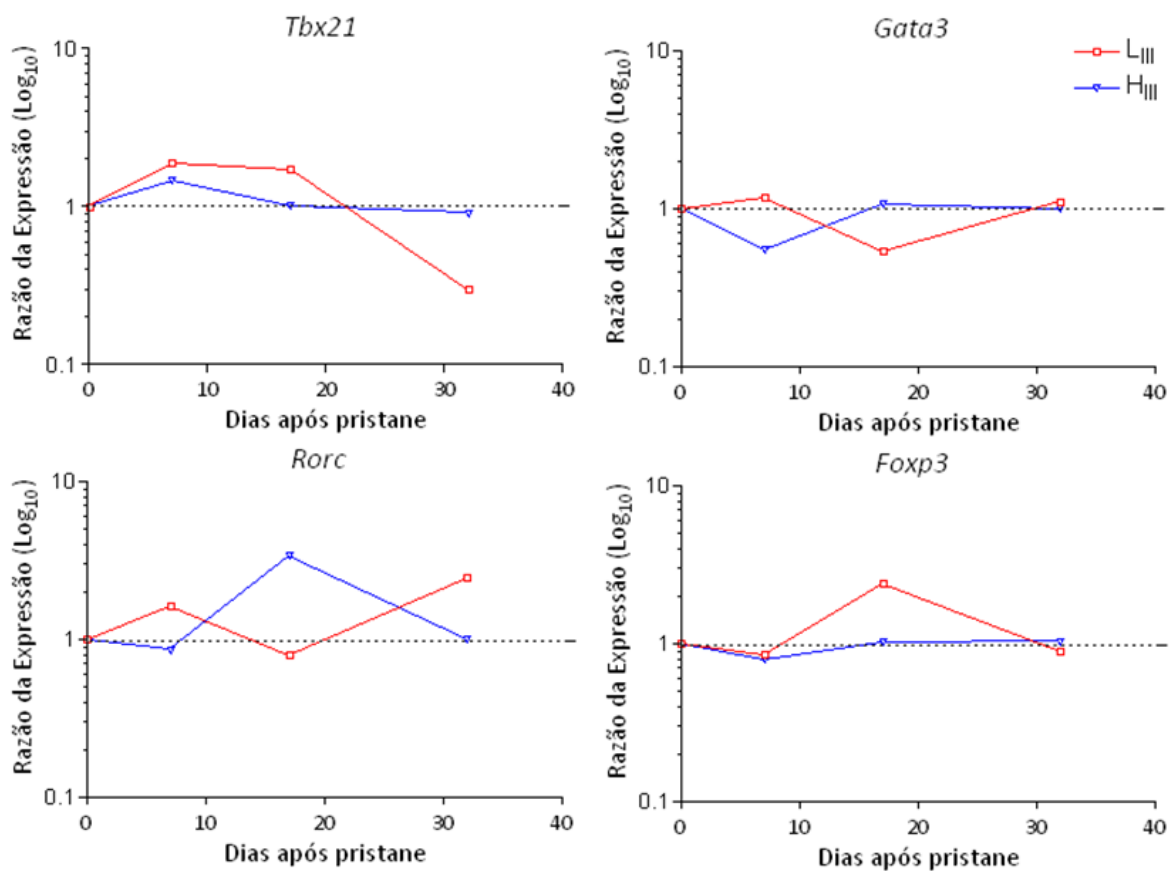
FONTE: (ROSSATO, 2011).

4.6.2 Fatores de transcrição associados à diferenciação de células T CD4 em células do linfonodo mesentérico

Avaliamos a expressão dos genes *Tbx21*, *Gata3*, *Rorc* e *Foxp3*, os quais indicariam alterações na atividade de subpopulações de células T CD4⁺ (respectivamente Th1, Th2, Th17 e Treg) no linfonodo mesentérico. Quando esta expressão foi mensurada em *pools* de cDNA dos grupos experimentais, o gene *Tbx21* apresentou aumento aos 7 e 17 dias, com redução em relação aos controles aos 32 dias (**Figura 11a**). A expressão de *Gata3* variou pouco em relação aos controles (**Figura 11b**). O gene *Rorc* foi mais expresso nos animais H_{III} aos 17 dias, enquanto que nos L_{III} a maior expressão foi aos 32 dias (**Figura 11c**). O único ponto

com aparente aumento da expressão do gene *Foxp3* foi aos 17 dias, nos animais LIII (**Figura 11d**). Nos tempos em que houve alteração de expressão maior que duas vezes comparado com seu respectivo controle o ensaio foi repetido com os cDNAs individuais. Após avaliação da expressão individual, diferenças estatísticas foram observadas entre os grupos apontados na (**Tabela 2**). O gene *Foxp3* foi mais expresso nos animais LIII controles comparados com os animais HIII controles aos 17 e 32 dias, mostrando uma diferença basal entre as linhagens, enquanto o *Tbx21* mostrou expressão nos LIII Ctrl (controle) maior que LIII TMPD (pristane) e LIII Ctrl maior que HIII Ctrl (**Tabela 2**).

Figura 11. Expressão gênica dos fatores transcrição de linfócitos T no mLN.



mRNA de linfonodos mesentéricos de camundongos LIII e HIII aos 7 dias após injeção i.p. de pristane (TMPD) ou salina (Ctrl). **(a)** fator de transcrição T_H1, *Tbx21*. **(b)** fator de transcrição T_H2, *Gata3*. **(c)** fator de transcrição T_H17, *Rorc*. **(d)** fator de transcrição Treg, *Foxp3*. Os valores representam média de pool de 5 animais \pm SEM (triplicata). A razão de expressão é relativa aos respectivos animais controle de cada linhagem.

FONTE: (ROSSATO, 2011).

Tabela 2 - Genes diferencialmente expressos em linfonodo mesentérico de animais L_{III} e H_{III} em diferentes períodos

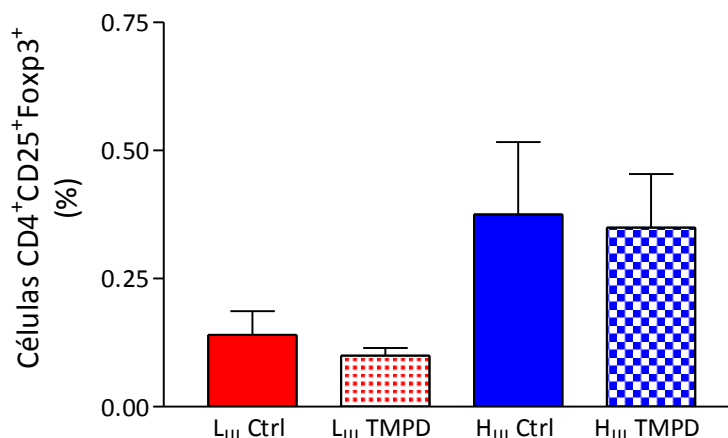
Gene	Período	Tratamento	Expressão Relativa	Valor de p
<i>Foxp3</i>	17 dias	L _{III} Ctrl > H _{III} Ctrl	1,8	0,049
	32 dias	L _{III} Ctrl > H _{III} Ctrl	4,2	0,02
<i>Tbx21</i>	32 dias	L _{III} Ctrl > H _{III} Ctrl	5,8	0,002
	32 dias	L _{III} Ctrl > L _{III} TMPD	2,6	0,027

FONTE: (ROSSATO, 2011).

4.7 Citometria de fluxo de células do mLN

A análise das células T reguladoras, presentes no linfonodo mesentérico após 7 dias da injeção i.p. de pristane, revelou uma menor proporção de células CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ nos animais L_{III} comparando com os animais H_{III}. Entretanto, o tratamento com pristane não altera significativamente as populações de células T reguladoras do linfonodo mesentérico (**Figura 12**).

Figura 12. Percentual de células Treg no mLN



Percentual de células Treg (CD25⁺ Foxp3⁺) em relação à população de células CD4⁺ do linfonodo mesentérico dos animais H_{III} e L_{III} no dia 7 após a injeção intraperitoneal de pristane. Os dados representam média (n=4 por grupo) ±SEM.

FONTE: (ROSSATO, 2011).

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho apoia a hipótese de que a resposta inicial à injeção i.p de pristane rege os mecanismos que culminam no desenvolvimento da PIA. Mostramos que o ambiente peritoneal é bastante alterado em tempos anteriores ao desenvolvimento dos primeiros sintomas de artrite clínica e essas alterações têm perfis distintos entre animais suscetíveis e resistentes.

As alterações induzidas pelo pristane no ambiente peritoneal ocorrem cedo durante a fase pré-clínica. Aos sete dias após a injeção de pristane, houve diferenças marcantes no ambiente peritoneal entre as linhagens H_{III} e L_{III}. A inflamação peritoneal nos animais L_{III} foi mais intensa e envolveu o recrutamento de diversos tipos celulares, como linfócitos, neutrófilos e fagócitos mononucleares, ao passo que nos resistentes H_{III} somente os neutrófilos estavam aumentados, enquanto que outras populações, como linfócitos e monócitos/macrófagos encontravam-se diminuídas.

Estes resultados estão em linha com os obtidos por Jensen et al. (2006), os quais mostraram diferença significativa no perfil de citocinas produzidas por células esplênicas nos períodos iniciais após a injeção do pristane.

Nossa hipótese, de que alterações celulares e moleculares determinantes da suscetibilidade ou resistência à artrite induzida pelo pristane ocorrem em tempos bastante anteriores ao aparecimento dos sintomas, depende da premissa que as células residentes e/ou infiltrantes na cavidade peritoneal, sítio de injeção do pristane, são necessárias para a seqüência de eventos que resultará ou não no estabelecimento da artrite. Se a PIA puder ser induzida por diferentes vias de inoculação, ou se a linhagem resistente desenvolvesse a artrite por outras vias, isto poderia indicar que o processo de indução é mais dependente do agente indutor do que dos animais.

Inicialmente realizamos experimentos visando determinar se o ambiente peritoneal é determinante para o desenvolvimento da PIA. Enquanto o modelo de camundongos utiliza a via intraperitoneal, em ratos a PIA é induzida pela via subcutânea ou intradérmica (VINGSBO et al., 1996) ao passo que se injetados pela via intraperitoneal não desenvolvem a artrite (OLOFSSON; HOLMDAHL, 2007). É possível que cada modelo reúna particularidades (ANDERSON; WAX; POTTER, 1985) que em conjunto determinam a via de inoculação, ou que o pristane possa induzir a PIA independente da via, sugerindo que os elementos cruciais para o desenvolvimento da artrite não se localizam exclusivamente no microambiente peritoneal. Para elucidar a influência desses fatores na PIA em camundongos,

injetamos pristane no espaço subcutâneo ou na cavidade peritoneal de animais L_{III} e H_{III} e examinamos os sinais de artrite. Os animais H_{III} mostraram-se resistentes à artrite experimental independente da via de inoculação, enquanto os camundongos L_{III} desenvolveram artrite somente se injetados por via intraperitoneal. Nossos experimentos corroboram os dados da literatura, sugerindo que o microambiente peritoneal exerce um papel importante na resistência / susceptibilidade à PIA (THOMPSON; ELSON, 1993) nas linhagens H_{III} e L_{III}.

A avaliação histológica das patas de animais injetados com pristane mostrou que aos 230 dias, os animais H_{III} não apresentaram alterações detectáveis, enquanto que os animais L_{III} apresentavam profundas alterações articulares, com extensa fibrose, indicativa de um processo inflamatório crônico avançado. Os camundongos L_{III} também apresentaram os sinais típicos de modelos experimentais de artrite, observados na artrite reumatóide: espessamento da membrana sinovial (pannus), hiperplasia da cartilagem articular, e invasão da cartilagem e osso sub-condral por células com aspecto de fibroblastos. Entretanto, até 30 dias após a injeção os animais L_{III}, assim como os H_{III}, apresentavam aspecto semelhante aos animais controle, injetados com salina. Os primeiros sinais de artrite aparecem a partir de 40 dias. Este resultado sugere que os eventos imunes importantes para a o desfecho da PIA ainda estariam ocorrendo no peritônio, ou nos linfonodos.

Adicionalmente, testamos a influência da segunda dose de pristane no desenvolvimento da PIA. O protocolo clássico de indução envolve a administração de duas doses de pristane (POTTER; WAX, 1981), com a doença se instalando a partir de 90-120 dias (MORGAN et al., 2004). Entretanto, como os primeiros sinais de artrite nos animais L_{III} aparecem logo aos 40-45 dias, não estava claro se a segunda dose seria ou não necessária para o estabelecimento completo da doença. No caso desta dose alterar significativamente o curso da doença, seja pela diminuição da incidência ou gravidade, ou por permitir a remissão dos sintomas, isto poderia sugerir que eventos importantes para o completo desenvolvimento da PIA nos animais L_{III} acontecem em fases mais tardias. A injeção de uma única dose de pristane induziu artrite com a mesma incidência e gravidade que a observada nos animais injetados com duas doses, e o único parâmetro alterado foi a cinética de instalação, um pouco mais lenta nos animais do grupo de uma dose. Portanto, nossos resultados indicam que a segunda dose de pristane não é necessária, pelo menos em animais extremamente suscetíveis como os L_{III}, para o completo desenvolvimento da PIA.

Após determinarmos que no período até 30 dias a resposta inflamatória ainda se processa no ambiente peritoneal, investigamos as alterações em populações de células presentes no peritônio induzidas pelo pristane neste período. Diversos trabalhos relatam aumento significativo de células infiltradas no peritônio após a injeção do pristane, mas em períodos relativamente tardios (NACIONALES et al., 2006; SHACTER; ARZADON; WILLIAMS, 1992;).

Os únicos dados disponíveis sobre alterações das populações celulares em períodos iniciais após a injeção do pristane provêm do modelo de lúpus induzido por pristane, no qual tanto animais BALB/c quanto C57BL/6 apresentam redução drástica das populações residentes no peritônio (macrófagos e células B1) aos 14 dias, e infiltrado com predominância de monócitos e granulócitos (LEE et al., 2008). No entanto, a linhagem BALB/c é moderadamente suscetível à PIA (POTTER; WAX, 1981), enquanto os animais C57BL/6 são resistentes (WOOLEY et al., 1989). Portanto, essas alterações podem ter relação com a indução de autoanticorpos associados ao lúpus, descrita para diversas linhagens de camundongos (SATO; REEVES, 1994), mas não necessariamente para a PIA. Um experimento piloto mostrou aumento nos títulos de anticorpos séricos anti-DNA dupla fita tanto na linhagem H_{III} quanto nos animais L_{III} 180 dias após a injeção de pristane, mas os soros obtidos aos 30 dias não apresentaram aumento (Eliana Blini Marengo, PhD, comunicação pessoal). Como há poucos dados disponíveis sobre os eventos que ocorrem durante a fase pré-clínica da PIA, nosso próximo passo foi investigar as populações celulares e citocinas presentes na cavidade peritoneal após a injeção de pristane.

Começamos com as contagens diferencial e total das células do microambiente peritoneal, o qual é povoado por vários tipos celulares, incluindo monócitos, macrófagos, eosinófilos, células dendríticas, linfócitos B e T (GHOSN et al., 2010). Dependendo da linhagem estudada, são observadas frequências distintas de células neste compartimento (TAYLOR et al., 2005; ZYGMUNT; GROEBE; GUZMAN, 2011). A injeção intraperitoneal de pristane alterou profundamente as populações de células peritoneais, resultando em uma redução no número de monócitos/macrófagos e linfócitos e infiltração de neutrófilos e eosinófilos na linhagem H_{III}. Por outro lado, na linhagem L_{III} observamos infiltração maciça de todos os tipos celulares no mesmo período (7 dias), principalmente de monócitos/macrófagos. Nos tempos mais tardios do período observado (17 e 32 dias), os números totais de células peritoneais dos animais L_{III} retornaram a valores próximos aos dos controles, enquanto que nos H_{III} o infiltrado aumentou gradualmente, mas sem atingir os

valores máximos atingidos pelos L_{III} aos 7 dias. Com esse experimento pudemos concluir que a resposta inflamatória induzida no peritônio pelo pristane é muito mais intensa nos animais L_{III}, com diferença marcante em relação aos animais H_{III} no dia 7, bem antes do aparecimento da artrite clínica. Este resultado sugere que neste tempo podem estar ocorrendo eventos importantes para a definição do status de resistência/suscetibilidade destas linhagens, o qual foi escolhido para as futuras análises das subpopulações celulares infiltrantes e mediadores produzidos no peritônio. Este maior número de células, produzindo citocinas inflamatórias num ambiente de estímulo persistente, ocasionado pelo pristane, criaria um ambiente mais favorável para a ativação de linfócitos autorreativos.

A caracterização mais detalhada, por citometria de fluxo (FACS), do fenótipo das populações celulares nesta fase inicial forneceria dados importantes para o entendimento da influência destas células na suscetibilidade ou resistência à artrite nas linhagens L_{III} e H_{III}, as quais refletiriam de fato as possíveis diferenças. A análise de citometria de fluxo revelou maior frequência de células GR1⁺ CD11b⁺ (marcadores expressos em neutrófilos e monócitos; dados não mostrados), CD3⁺ (linfócitos T) e aumento significativo na frequência de células CD11c⁺ (DCs) no lavado peritoneal dos animais L_{III} aos 7 dias. Um ambiente rico em linfócitos e células dendríticas poderia ser local primário de intensa interação entre esses tipos celulares, e possível ativação de linfócitos T autorreativos.

Estreitamos um pouco mais a caracterização das subpopulações de células B presentes no peritônio, uma vez que a ativação policlonal de linfócitos B se faz presente na artrite reumatóide (WOLLHEIM et al., 1984), particularmente, a subpopulação B1a presente principalmente no peritônio (revisado por BERLAND; WORTIS, 2002). Interessantemente, observamos uma frequência constitutivamente maior de células B1a na linhagem L_{III} e o tratamento com pristane não alterou significativamente a presença dessas células até o sétimo dia. Embora tenha sido descrito que as células B1a não têm a capacidade de recircular, mas apresentam vida longa (KANTOR et al., 1997), experimentos com camundongos parabióticos (unidos cirurgicamente e com troca de sangue) mostraram extensa recirculação de células B1a e B1b entre a cavidade peritoneal e o sangue (ANSEL; HARRIS; CYSTER, 2002). É possível que o pristane poderia também induzir a proliferação dessas células, dado que sua frequência não foi alterada e o número total de células foi aumentado no peritônio após o tratamento com pristane na linhagem L_{III}. Portanto, podemos sugerir que esse estímulo aumentaria a proliferação e a secreção de anticorpos autoreativos. Isso vai contra os dados de Lee et al.

(2008), que observaram uma redução drástica do número destas células no peritônio de animais BALB/c após duas semanas da injeção com pristane.

Por outro lado, os linfócitos B2 presentes na cavidade peritoneal diminuíram em frequência de maneira significativa na linhagem L_{III}, sugerindo que essas células poderiam ter deixado o peritônio em direção ao baço, linfonodos, ou pulmões, já que foi observada infiltração de células B nos pulmões de animais C57BL/6 no mesmo período após o tratamento com pristane (BARKER et al., 2011). Além disso, não se pode descartar a ocorrência de morte destas células por apoptose, porém, a frequência de células apoptóticas, avaliada por Anexina V, não apresentou alteração entre os grupos (dados não mostrados). Se houve morte destas células por apoptose, ela pode ter ocorrido em períodos anteriores aos estudados.

Dados anteriores do nosso laboratório mostraram diferenças significativas no número de células esplênicas produtoras de algumas citocinas *ex vivo*, nos primeiros 15 dias após a injeção de pristane. Enquanto na linhagem L_{III} mais células produziam IL-1 β , IL-12 e TNF- α , na linhagem H_{III} este aumento ocorria para a IL-4 (JENSEN et al., 2006). Estes resultados sugeriam que a resposta inflamatória ao pristane era mais intensa na linhagem L_{III}. Parte das células presentes no baço poderia ser proveniente de células que migraram da cavidade, ou ainda, células que sofreram influência de citocinas produzidas no peritônio. Como nossos resultados mostraram um infiltrado peritoneal marcadamente diferente entre as linhagens suscetível e resistente à PIA, nosso próximo passo foi avaliar as citocinas e outras moléculas que poderiam estar associadas a estas mudanças no microambiente peritoneal.

O aumento de monócitos/macrófagos poderia ser mediado pela produção aumentada da quimiocina CCL2 - MCP-1. Esta quimiocina pode ser induzida por IFN- γ (YOSHIMURA; TAKAHASHI, 2007), mas sua expressão, em conjunto com a de outros genes, faz parte de uma assinatura de genes induzidos por IFN- α/β (HOKENESS et al., 2005). A suscetibilidade ao lúpus induzido por pristane é associada a esta assinatura gênica, que refletiria uma elevação dos níveis de IFN- α/β (NACIONALES et al., 2006). Nossos dados mostraram aumento significativo nos níveis de CCL2 no peritônio dos animais tratados, porém, em níveis semelhantes em ambas as linhagens. Este resultado sugere, embora não tenhamos avaliado de maneira mais completa a assinatura de genes estimulados por IFN- α/β , que esta via não tem a mesma importância na PIA que no modelo de lúpus. Também podemos concluir que outros mediadores estão envolvidos nas diferenças dos infiltrados inflamatórios encontradas nos animais H_{III} e L_{III}.

A IL-12p40, complexada com as subunidades, p35 (IL-12p70), p19 (IL-23p59) ou a própria p40 apresentam funções distintas na resposta imune. A IL-12p70 bioativa induz a proliferação e diferenciação de células T_H1, a IL-23p59 induz proliferação e sobrevivência de células T_H17 quiescentes, e a IL12p80 (forma dimérica da p40) atua diretamente na quimiotaxia de monócitos, macrófagos e DCs, além de induzir migração das DCs para os linfonodos drenantes. Nossos experimentos mostraram níveis elevados de IL-12p40 em todos os tempos testados somente na linhagem L_{III} tratada com pristane. Entretanto, não foi detectada diferença nos níveis de IFN- γ , IL-12 (p70), IL-17, nem na expressão do gene *Il-23p19*, sugerindo que a participação de linfócitos T_H1 e T_H17 neste compartimento e período não é majoritária. Entretanto, mais experimentos deveriam ser realizados para dar suporte a essa hipótese.

É interessante notar que o estudo conduzido por Mizutani et al. (2005) detectou aumento significativo nos níveis de IL-12p40 e p70 em lavado peritoneal de animais BALB/c *germ-free* após 6 meses da injeção i.p de pristane, indicando que o pristane é capaz de induzir *per se* o aparecimento da IL-12p40. Entretanto, esses dados se referem a períodos mais tardios, do que os avaliados neste trabalho.

A formação de homodímeros de p40 pode acontecer espontaneamente na ausência das subunidades p35 (IL-12) ou p19 (IL-23) e o efeito de seu produto, a IL-12p80, está diretamente ligado ao recrutamento de células fagocíticas para o sítio inflamatório, o que explicaria a presença aumentada destas células na cavidade peritoneal no dia 7 na linhagem L_{III}. Para tanto, experimentos futuros que diferenciem a IL-12p40 da IL-12p80 são ainda necessários. Gately et al., (1996) e Piccotti et al., (1997), revelaram efeito diferencial sobre o desenvolvimento de células T_H1, onde a IL-12p80 acentuou o desenvolvimento de células T CD8⁺, mas inibiu a indução de células T CD4⁺.

As principais células produtoras de IL-12p40 e de homodímeros de p40 são as DCs CD11c⁺ (DAI et al., 2007; NIGG et al., 2007) e a injeção do pristane induziu aumento significativo dessas células somente nos animais L_{III}. É possível que produtos microbianos, como LPS, ácido lipoteicóico (LTA), peptidoglicano e DNA CpG tenham induzido a produção de IL-12p40 na linhagem L_{III}, uma vez que o estímulo de ligantes de receptores Toll-like induzem altos níveis de IL-12p40 (MEDZHITOV, 2001; BARTON; MEDZHITOV, 2002). No entanto, mais experimentos seriam necessários para dar suporte a esta hipótese. Outra hipótese é a de que a IL-12p40 poderia estar aumentada devido à associação com a subunidade IL-23p19, formando a IL-23. Esta citocina pode ser produzida a partir da

estimulação de receptores que reconhecem PAMPs. Entretanto, a análise de expressão gênica da subunidade IL-23p19 não mostrou diferença significativa aos 7 dias, sugerindo que a inflamação crônica pode não ser mediada pela IL-23, porém, não é possível excluir a possibilidade da participação dos PAMPs neste fenótipo.

Posteriormente, avaliamos a presença de mediadores inflamatórios envolvidos na proliferação, diferenciação e apoptose celular. É bem estabelecido que o TNF- α é uma citocina chave na cascata inflamatória, bem como a IL-18 e IL-1 β no incremento da resposta imune adquirida e na artrite reumatóide (BUCHAN et al., 1988). Houve produção de IL-1 β após a injeção de pristane, porém com diferença estatística entre os grupos apenas aos 7 dias na linhagem H_{III}. Entretanto, as diferenças não se repetiram em experimentos posteriores (dados não mostrados). As citocinas IFN- γ , IL-10, IL-4 e IL-17 foram quantificadas no lavado peritoneal por ELISA e não observamos diferenças entre os grupos no dia 7, sugerindo que estas citocinas foram consumidas. Apesar de estas citocinas estarem ausentes e serem primariamente produzidas por células T_H, não podemos excluir a possibilidade da participação dos linfócitos T, pois foi observado aumento significativo de células CD3⁺ em nossos experimentos na linhagem L_{III} aos 7 dias. Para tanto, uma análise mais detalhada das subpopulações de linfócitos T_H seria necessária.

As diferenças no perfil de citocinas e quimiocinas, detectadas por ELISA e qRT-PCR, compreenderam aumento significativo da produção de IL-12p40 no lavado peritoneal aos 4, 7, 17 e 32 dias, e aumento da expressão de transcritos de IL-27p28 e IL-5 pelas células do peritônio da linhagem L_{III} aos sete dias pós-pristane, enquanto na linhagem H_{III} foram detectados níveis de IL-12p40 e expressão de IL-27p28 semelhantes aos controles nas mesmas condições. A IL-6 aumentou significativamente nos animais injetados com pristane aos 7 dias, em níveis semelhantes em ambas as linhagens. Este resultado, referente a IL-12 e IL-6, já tinha sido observado em células peritoneais destas linhagens *in vitro* (JENSEN, J.R., dados não publicados) e células esplênicas avaliadas por ELISPOT (JENSEN et al., 2006), parece indicar um efeito inflamatório intrínseco do pristane injetado no peritônio (SHACTER; ARZADON; WILLIAMS, 1992), via elevação de PGE2 (HINSON; WILLIAMS; SHACTER, 1996), o qual não seria *per se* responsável pelas diferenças de suscetibilidade entre as linhagens.

A análise de expressão gênica indicou aumento significativo do gene *Il4*, quando comparado com seus respectivos controles, em contraste com as baixas concentrações desta citocina detectadas no lavado peritoneal. As principais células que expressam este gene são as células T_{H2}, mastócitos, eosinófilos e iNKT. Os mastócitos transcrevem constitutivamente este gene (GESSNER; MOHRS; MOHRS, 2005), porém observamos aumento significativo em células peritoneais dos animais tratados em relação ao controle. As células iNKT estão presentes em pequeno número no peritônio de camundongos C57BL/6 (OHTAKI et al., 2009) porém não detectamos quantidades significativas de citocinas produzidas por estas células, como IFN- γ e IL-4. Trabalho recente aponta um potencial regulatório das iNKTs em modelos de autoimunidade (MIELLOT-GAFSOU et al., 2010; YANG et al., 2011). Como não pesquisamos a presença destas células, não é possível especular sobre a sua influência no modelo de PIA. É possível que o gene da *Il4* tenha sido expresso por eosinófilos, os quais aumentaram em ambas as linhagens após a injeção de pristane. O número aumentado de células T no peritônio dos animais L_{III} pode incluir células T_{H2}, as quais produzem, além da IL-4, a IL-5, cujos genes foram mais expressos nos animais L_{III} injetados com pristane. Ensaio funcionais envolvendo a marcação intracelular e ensaios *in vitro* com subpopulações isoladas poderiam esclarecer estes achados.

A IL-5 é uma citocina relacionada com a proliferação de células B1a e produção de anticorpos da classe IgM. É produzida normalmente por linfócitos T_{H2} e pode ser induzida por componentes bacterianos, como ácido lipoteicoico e peptidoglicanos (MATSUI; MOTOHASHI; NISHIKAWA, 2000). Nossos dados de expressão gênica indicaram aumento significativo nos transcritos de *Il5* apenas nos animais L_{III} aos 7 dias em resposta ao pristane. Este dado é compatível com o aumento de células T CD3⁺ somente nos animais L_{III}, enquanto na linhagem H_{III} houve diminuição de linfócitos na cavidade peritoneal. O aumento no nível de IL-5 intraperitoneal poderia levar ao aumento na proliferação de linfócitos B1a e secreção de anticorpos IgM autorreativos. No entanto, a presença da IL-5 não define de maneira clara a suscetibilidade a PIA, pois animais DBA/2 resistentes a PIA apresentaram níveis elevados de IL-5 após 50 dias da injeção de pristane (MCDONALD; DEGRASSI, 1993; WOOLEY; WHALEN, 1991) e células esplênicas de camundongos protegidos contra a PIA produziam níveis elevados de IL-4, IL-5 e IL-10 (BEECH et al., 1997).

Até o momento, não encontramos trabalhos que mostrem a presença de IL-17 em lavados peritoneais de camundongos injetados com pristane, porém foi observada a liberação

de IL-17A após 6h do estímulo intraperitoneal com zymozan em camundongos C57BL/6 (PINI e FANTUZZI, 2010). Em nossos dados, não houve diferença significativa na presença de IL-17A no lavado peritoneal, comparado com seu respectivo controle, aos 7 dias após a injeção de pristane em ambas as linhagens. Contudo, não podemos excluir a possibilidade de a IL-17A desempenhar um papel importante na inflamação peritoneal induzida pelo pristane em períodos mais precoces na linhagem L_{III}, pois sua presença induz citocinas e quimiocinas, como GM-CSF, IL-8 e quimiocinas da família CXC que atuam no recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório.

Sabe-se que a IDO pode ser expressa por células estromais, células dendríticas e eosinófilos, além dos linfonodos, sendo induzida por bactérias e IFN- γ . A IDO atua no catabolismo do triptofano, aminoácido essencial. Além disso, a alta expressão de IDO foi associada à redução significativa de células T CD3⁺ infiltrantes em tumores, o que sugere um papel imunossupressor de células T (TAYLOR; FENG, 1991). Nossos experimentos revelaram alta expressão de *Ido1* por células peritoneais, com aumento significativo de células CD3⁺ infiltradas na cavidade peritoneal nos camundongos L_{III} após 7 dias da injeção de pristane. Sabe-se que alguns adjuvantes usados para vacinação aumentam a expressão de IDO e estimulam fortemente a resposta imune adaptativa, por meio da ligação de oligonucleotídeos ricos em CpG ao TLR9 induz a expressão de IDO e a ativação de DCs (MELLOR et al., 2005). Entretanto, o que teoricamente poderia suprimir, aumentou a resposta imune mediada por células T, o que está em linha com os achados de Frumento et al. (2002) que não observaram inibição da proliferação de linfócitos T, mesmo em meio completamente desprovido de triptofano. Foi descrito que os metabólitos do triptofano são tóxicos aos linfócitos e causam apoptose. É possível que a diminuição no número de células observada aos 17 dias em nossos experimentos seja devido à ação da IDO, que foi expressa em níveis mais elevados em período anterior (7 dias) nos animais L_{III}. Nossos dados não mostraram sinais claros de alteração nas frequências de apoptose aos 4 dias, porém em outros períodos poderiam ocorrer.

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é também induzido por IFN- γ , portanto pode ser usado como medida indireta de ativação por IFN- γ . O H₂O₂ atua maximizando as respostas microbicidas de fagócitos, degradando mais efetivamente bactérias fagocitadas. Nossos dados revelaram que o estímulo com pristane se mostrou potencialmente ativador das células peritoneais, o que indica que mesmo não detectando a presença de IFN- γ por ELISA, os

fagócitos de ambas as linhagens aumentaram significativamente a produção de H_2O_2 após 7 dias da injeção de pristane em relação aos controles. Não houve diferença de produção entre as linhagens, sugerindo que a diminuição de células no peritônio dos animais H_{III} , não seja decorrente de morte celular por ativação, uma vez que a análise dos marcadores Fas e FasL não foi diferente entre as linhagens no dia 4 após a injeção de pristane (dados não mostrados). Entretanto, uma análise mais detalhada, em períodos anteriores aos 4 dias devem ser realizados para dar suporte a essa hipótese.

Nosso próximo passo foi avaliar o linfonodo mesentérico que drena a cavidade peritoneal (PARUNGO et al., 2007). As alterações detectadas podem refletir o tipo de resposta que está sendo promovida após o estímulo com o pristane. Avaliamos as alterações celulares por citometria de fluxo e por expressão gênica de fatores de transcrição linhagem-específicos, os quais têm sido amplamente estudados. As células T $CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$ (Treg) são essenciais para manutenção da tolerância periférica. Camundongos neonatos ou adultos sucumbem após múltiplas complicações autoimunes quando são depletados de células T reguladoras. Por outro lado, são aumentadas as subpopulações de células T_H1 e T_H17 altamente inflamatórias e destrutivas (KORN et al., 2009). Portanto, o equilíbrio entre as células Treg e células T_H1 ou T_H17 efetoras pode indicar o estado fisiológico do patológico (WING; SAKAGUCHI, 2010). Nossos dados demonstraram que a linhagem L_{III} apresenta menor frequência de células Treg comparada com a linhagem H_{III} , e o tratamento com pristane não alterou a frequência dessas células no mLN, sugerindo que uma alteração constitutiva na frequência de células Treg poderia influenciar o fenótipo de resistência e suscetibilidade a PIA nas linhagens H_{III} e L_{III} .

Em linhas gerais, nossos resultados sugerem que fatores intrínsecos, como a frequência distinta de linfócitos B1a e T reguladores, controlam a intensidade e o tipo de resposta inflamatória na fase inicial da PIA e podem ser mecanismos envolvidos na diferença entre a resistência/ susceptibilidade nas linhagens H_{III} e L_{III} .

6 CONCLUSÕES

Podemos concluir que:

- ✓ O ambiente peritoneal é fundamental para a indução da PIA em camundongos, visto que ela só se desenvolve por esta via na linhagem suscetível L_{III};
- ✓ A injeção de uma única dose de pristane induziu artrite com a mesma incidência e gravidade que a observada nos animais injetados com duas doses, indicando que a segunda dose de pristane não é necessária, pelo menos em animais extremamente suscetíveis como os L_{III}, para o completo desenvolvimento da PIA;
- ✓ O infiltrado inflamatório induzido pelo pristane na cavidade peritoneal na linhagem suscetível L_{III} é muito mais intenso que na linhagem resistente H_{III}, com maior frequência de células T, macrófagos e DCs, e ocorre mais precocemente;
- ✓ Ocorre uma frequência constitutivamente maior de células B1a na linhagem L_{III} em relação à H_{III}. O tratamento com pristane promove expansão destas células e diminuição dos linfócitos B2 apenas nos animais L_{III};
- ✓ A inflamação crônica pelo pristane no peritônio dos animais L_{III} envolve a subunidade p40 da IL-12, sugerindo envolvimento de DCs neste processo;
- ✓ A expressão gênica diferencial sugere a participação da *Il5*, *Il-27* e *Ido1* como componentes da maior suscetibilidade dos animais L_{III}.
- ✓ Há uma frequência constitutivamente menor de células Treg na linhagem L_{III} em relação à H_{III}, que não altera com o tratamento com pristane.

REFERÊNCIAS*

AFONSO, V.; CHAMPY, R.; MITROVIC, D.; COLLIN, P.; LOMRI, A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. **Joint Bone Spine**, v. 74, p. 324-329, 2007.

AGGARWAL, S.; GURNEY, A. L. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. **J. leukoc. biol.**, v. 71, p. 1-8, 2002.

ALAMANOS, Y.; DROSOS, A. A. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. **Autoimmun. Rev.**, v. 4, n. 3, p. 130-136, 2005.

ANDERSON, A. O.; WAX, J. S.; POTTER, M. Differences in the peritoneal response to pristane in BALB/cAnPt and BALB/cJ mice. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 122, p. 242-253, 1985.

ANSEL, K. M.; HARRIS, R. B.; CYSTER, J. G. CXCL13 is required for B1 cell homing, natural antibody production, and body cavity immunity. **Immunity**, v. 16, n. 1, p. 67-76, 2002.

ARNETT, F. C.; EDWORTHY, S. M.; BLOCH, D. A.; MCSHANE, D. J.; FRIES, J. F.; COOPER, N. S.; HEALEY, L. A.; KAPLAN, S. R.; LIANG, M. H.; LUTHRA, H. S. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 31, n.3, p. 315-324, 1988.

BARKER, R. N.; WELLS, A. D.; GHORAISHIAN, M. Expression of mammalian 60-kD heat shock protein in the joints of mice with pristane-induced arthritis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 103, p. 83-88, 1996.

BARKER, T. T.; LEE, P. Y.; KELLY-SCUMPIA, K. M.; WEINSTEIN, J. S.; NACIONALES, D. C.; KUMAGAI, Y.; AKIRA, S.; CROKER, B. P.; SOBEL, E. S.; REEVES, W. H.; SATOH, M. Pathogenic role of B cells in the development of diffuse alveolar hemorrhage induced by pristane. **Lab. Invest.**, v. 91, n. 10, p. 1540-1545, 2011.

BARTON, G. M.; MEDZHITOV, R. Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 14, n. 3, p. 380-383, 2002.

BATTEN, M.; LI, J.; YI, S.; KLJAVIN, N. M.; DANILENKO, D. M.; LUCAS, S.; LEE, J.; DE SAUVAGE, F. J.; GHILARDI, N. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. **Nat. Immunol.**, v. 7, n. 9, p. 929-936, 2006.

BAUMGARTH, N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. **Nat. Rev. Immunol.**, v.11, n. 1, p. 34-46, 2011.

BEECH, J. T.; SIEW, L. K.; GHORAISHIAN, M.; STASIUK, L. M.; ELSON, C. J.; THOMPSON, S. J. CD4⁺ Th2 cells specific for mycobacterial 65-kilodalton heat shock protein protect against pristane-induced arthritis. **J. Immunol.**, v. 159, n. 8, p. 3692-3697, 1997.

*De acordo com:

BERLAND, R.; WORTIS, H. H. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p. 253–300, 2002.

BIOZZI, G.; RIBEIRO, O. G.; SARAN, A.; ARAUJO, L. M.; MARIA, D.; DE FRANCO, M.; IBÁÑEZ, O. M. Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 337–346, 1998.

BONIFACE, K.; BLOM, B.; LIU, Y. J.; DE WAAL MALEFYT, R. From interleukin-23 to T-helper 17 cells: human T-helper cell differentiation revisited. **Immunol. Rev.**, v. 226, p. 132-146, 2008.

BRUNKOW, M. E.; JEFFERY, E. W.; HJERRILD, K. A.; PAEPER, B.; CLARK, L. B.; YASAYKO, S. A.; WILKINSON, J. E.; GALAS, D.; ZIEGLER, S. F.; RAMSDELL, F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. **Nat. Genet.**, v. 27, p. 68–73, 2001.

BUCHAN, G.; BARRETT, K.; TURNER, M.; CHANTRY, D.; MAINI, R. N.; FELDMANN, M. Interleukin-1 and tumour necrosis factor mRNA expression in rheumatoid arthritis: prolonged production of IL-1. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 73, p. 449-455, 1988.

BUCHANAN, R. M.; ARULANANDAM, B. P.; METZGER, D. W. IL-12 enhances antibody responses to T-independent polysaccharide vaccines in the absence of T and NK cells. **J. Immunol.**, v. 161, n. 10, p. 5525-5533, 1998.

BUSH, K. A.; FARMER, K. M.; WALKER, J. S.; KIRKHAM, B. W. Reduction of joint inflammation and bone erosion in rat adjuvant arthritis by treatment with interleukin-17 receptor IgG1 Fc fusion protein. **Arthritis Rheum.**, v. 46, p. 802–805, 2002.

CADY S. G.; SONO, M. 1-Methyl-DL-tryptophan, beta-(3-benzofuranyl)-DL-alanine (the oxygen analog of tryptophan), and beta-[3-benzo(b)thienyl]-DL-alanine (the sulfur analog of tryptophan) are competitive inhibitors for indoleamine 2,3-dioxygenase. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 291, p. 326–333, 1991.

COLGAN, J.; ROTHMAN, P. All in the family: IL-27 suppression of TH-17 cells. **Nature Immunology**, v. 7, n. 9, p. 899-901, 2006.

COOPER, A. M.; KHADER, S. A. IL-12p40: an inherently agonistic cytokine. **Trends Immunol.**, v. 1, p. 33-38, 2007.

CUA, D. J.; SHERLOCK, J.; CHEN, Y.; MURPHY, C. A.; JOYCE, B.; SEYMOUR, B.; LUCIAN, L.; TO, W.; KWAN, S.; CHURAKOVA, T.; ZURAWSKI, S.; WIEKOWSKI, M.; LIRA, S. A.; GORMAN, D.; KASTELEIN, R. A.; SEDGWICK, J.D. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. **Nature**, v. 421, p. 744–748, 2003.

DAI, J.; LIU, B.; CUA, D. J.; LI, Z. Essential roles of IL-12 and dendritic cells but not IL-23 and macrophages in lupus-like diseases initiated by cell surface HSP gp96. **Eur. J. Immunol.**, v. 37, n. 3, p. 706-715, 2007.

DE HOOGE, A. S.; VAN DE LOO, F. A.; ARNTZ, O. J.; VAN DEN BERG, W. B. Involvement of IL-6, apart from its role in immunity, in mediating a chronic response during experimental arthritis. **Am. J. Pathol.**, v. 157, p. 2081-2091, 2000.

DEIGHTON, C. M., WALKER, D. J. The familial nature of rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 50, n. 1, p. 62-65, 1991.

DEIGHTON, C. M.; WALKER, D. J.; GRIFFITHS, I. D.; ROBERTS, D. F. The contribution of HLA to rheumatoid arthritis. **Clin. Genet.**, v. 36, p. 178-182, 1989.

DE SOUZA, C. M.; MOREL, L.; CABRERA, W. H.; STAROBINAS, N.; RIBEIRO, O. G.; SIQUEIRA, M.; IBÁÑEZ, O. M.; DE FRANCO, M. Quantitative trait loci in Chromosomes 3, 8, and 9 regulate antibody production against Salmonella flagellar antigens in the mouse. **Mamm. Genome**, v. 15, n. 8, p. 630-636, 2004.

FIRESTEIN, G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. Review. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 356-361, 2003.

FOCOSI, D.; MAGGI, F.; PISTELLO, M.; BOGGI, U.; SCATENA, F. Immunosuppressive monoclonal antibodies: current and next generation. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 17, n. 12, p. 1759-1768, 2011.

FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. **Nat. Immunol.**, v. 4, p. 330-336, 2003.

FONTENOT, J. D.; RASMUSSEN, J. P.; WILLIAMS, L. M.; DOOLEY, J. L.; FARR, A. G.; RUDENSKY, A. Y. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. **Immunity**, v. 22, p. 329-341, 2005.

FONTENOT, J. D.; RUDENSKY, A. Y. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. **Nat. Immunol.**, v. 6, p. 331-337, 2005.

FRANGOULIS, B.; MOUTON, D.; SANT'ANNA, O. A.; VIDARD, L.; PLA, M. H-2 typing of mice genetically selected for high or low antibody production. **Immunogenetics**, v. 31, n. 5-6, p. 389-392, 1990.

FRUMENTO, G.; ROTONDO, R.; TONETTI, M.; DAMONTE, G.; BENATTI, U.; FERRARA, G. B. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. **J. Exp. Med.**, v. 196, n. 4, p. 459-468, 2002.

FUJIMOTO, M.; SERADA, S.; MIHARA, M.; UCHIYAMA, Y.; YOSHIDA, H.; KOIKE, N.; OHSUGI, Y.; NISHIKAWA, T.; RIPLEY, B.; KIMURA, A.; KISHIMOTO, T.; NAKA, T. IL-6 blockade suppresses autoimmune arthritis in mice by the inhibition of inflammatory Th17 responses. **Arthritis Rheum.**, v. 58, p. 3710-3719, 2008.

GATELY, M. K.; CARVAJAL, D. M.; CONNAUGHTON, S. E.; GILLESSEN, S.; WARRIER, R. R.; KOLINSKY, K. D.; WILKINSON, V. L.; DWYER, C. M.; HIGGINS, G.

F. J. R.; PODLASKI, F. J.; FAHERTY, D. A.; FAMILLETTI, P. C.; STERN, A. S. Interleukin-12 antagonist activity of mouse interleukin-12 p40 homodimer in vitro and in vivo. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 795, n. 1, p. 1-12, 1996.

GAVIN, M. A.; RASMUSSEN, J. P.; FONTENOT, J. D.; VASTA, V.; MANGANIELLO, V. C.; BEAVO, J. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. **Nature**, v. 445, p.771–775, 2007.

GESSNER A, MOHRS K, MOHRS M. Mast cells, basophils, and eosinophils acquire constitutive *Il-4* and *Il-13* transcripts during lineage differentiation that are sufficient for rapid cytokine production. **J. Immunol.**, v. 174, n. 2, p. 1063-1072, 2005.

GERARD, A. S; HENDRIK, V.; BEN, A. W.; DE JONG, F. H. J.; VAN DEN, H.; JOHANNA, M. W. H.; FERDINAND, C. B.; WALTHER J. V. V. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. **Arthritis & Rheumatism**, v. 43, n. 1, p. 155-163, 2000.

GHOSN, E. E.; CASSADO, A. A.; GOVONI, G. R.; FUKUHARA, T.; YANG, Y.; MONACK, D. M.; BORTOLUCI, K. R.; ALMEIDA, S. R.; HERZENBERG, L. A.; HERZENBERG, L. A. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 107, n. 6, p. 2568-2573, 2010.

GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An overview of Real-Time quantitative PCR Applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v.25, p.386-401, 2001.

GLANT, T. T.; MIKECZ, K.; ARZOUMANIAN, A.; POOLE, A. R. Proteoglycan-induced arthritis in BALB/c mice. Clinical features and histopathology. **Arthritis Rheum.**, v. 30, n. 2, p. 201-212, 1987.

GLIMCHER, L. H.; MURPHY, K. M. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. **Genes Dev.**, v. 14, n. 14, p. 1693-1711, 2000.

GREGERSEN, P. K.; SILVER, J.; WINCHESTER, R. J. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 30, n. 11, p. 1205-1213, 1987.

GUO, B.; CHANG, E. Y.; CHENG, G. The type I IFN induction pathway constrains Th-17-mediated autoimmune inflammation in mice. **J. Clin. Invest.**, v. 118, n. 5, p. 1680-1690, 2008.

HINSON, R. M.; WILLIAMS, J. A.; SHACTER, E. Elevated interleukin 6 is induced by prostaglandin E2 in a murine model of inflammation: possible role of cyclooxygenase-2. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 93, n. 10, p. 4885-4890, 1996.

HOKENESS, K. L.; KUZIEL, W. A.; BIRON, C. A.; SALAZAR-MATHER, T. P. Monocyte chemoattractant protein-1 and CCR2 interactions are required for IFN-alpha/beta-induced inflammatory responses and antiviral defense in liver. **J. Immunol.**, v. 174, n. 3, p. 1549-1556, 2005.

HOLLIS-MOFFATT, J. E.; MERRIMAN, M. E.; RODGER, R. A.; ROWLEY, K. A.; CHAPMAN, P. T.; DALBETH, N.; GOW, P. J.; HARRISON, A. A.; HIGHTON, J.; JONES, P. B.; O'DONNELL, J. L.; STAMP, L. K.; MERRIMAN, T. R. Evidence for association of an interleukin-23 receptor variant independent of the R381Q variant with rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 68, n. 8, p. 1340-1344, 2009.

HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science**, v.299, p. 1057–1061, 2003.

HSU, H. C.; YANG, P.; WANG, J.; WU, Q.; MYERS, R.; CHEN, J.; YI, J.; GUENTERT, T.; TOUSSON, A.; STANUS, A. L.; LE, T. V.; LORENZ, R. G.; XU, H.; KOLLS, J. K.; CARTER, R. H.; CHAPLIN, D. D.; WILLIAMS, R. W.; MOUNTZ, J. D. Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. **Nat. Immunol.**, v. 2, p. 166-175, 2008.

IBAÑEZ, O. M.; MOUTON, D.; RIBEIRO, O. G.; BOUTHILLIER, Y.; DE FRANCO, M.; CABRERA, W. H.; SIQUEIRA, M.; BIOZZI, G. Low antibody responsiveness is found to be associated with resistance to chemical skin tumorigenesis in several lines of Biozzi mice. **Cancer Lett.**, v. 136, n. 2, p. 153-158, 1999.

IVANOV, I. I.; MCKENZIE, B. S.; ZHOU, L.; TADOKORO, C. E.; LEPELLEY, A.; LAFAILLE, J. J.; CUA, D. J.; LITTMAN, D. R. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. **Cell**, v. 126, n. 6, p. 1121-1133, 2006.

JENSEN, J. R.; PETERS, L. C.; BORREGO, A.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. H.; STAROBINAS, N.; SIQUEIRA, M.; IBAÑEZ, O. C.; DE FRANCO, M. Involvement of antibody production quantitative trait loci in the susceptibility to pristane-induced arthritis in the mouse. **Genes Immun.**, v. 7, p. 44-50, 2006.

JENSEN, J. R. **Envolvimento de regiões cromossômicas reguladoras da resposta imune humoral no desenvolvimento de artrite experimental.** Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

KANTOR, A. B.; MERRILL, C. E.; HERZENBERG, L. A.; HILLSON, J. L. An unbiased analysis of V(H)-D-J(H) sequences from B-1a, B-1b, and conventional B cells. **J. Immunol.**, v. 158, n. 3, p. 1175-1186, 1997.

KAUFMANN, S. H. Heat shock proteins and the immune response. **Immunol. Today**, v. 11, n. 4, p. 129-136, 1990.

KHATTRI, R.; COX, T.; YASAYKO, S. A.; RAMSDELL, F. An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. **Nat. Immunol.**, v. 4, n. 4, p. 337-342, 2003.

KIM, J. M.; RASMUSSEN, J. P.; RUDENSKY, A. Y. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. **Nat. Immunol.**, v. 8, n. 2, p. 191-197, 2007.

- KISHIMOTO, T. INTERLEUKIN-6: From Basic Science to Medicine—40 Years in Immunology. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 23, p. 1–21, 2005.
- KOLLS, J. K.; LINDEN, A. Interleukin-17 family members and inflammation. **Immunity**, v.21, p.467-476, 2004.
- KORN, T.; BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. IL-17 and Th17 Cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 27, p. 485-517, 2009.
- LANGRISH, C. L.; CHEN, Y.; BLUMENSCHNEIN, W. M.; MATTSON, J.; BASHAM, B.; SEDGWICK, J. D.; MCCLANAHAN, T.; KASTELEIN, R. A.; CUA, D. J. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. **J. Exp. Med.**, v. 201, n. 2, p. 233-240, 2005.
- LEE, P. Y.; WEINSTEIN, J. S.; NACIONALES, D. C.; SCUMPIA, P. O.; LI, Y.; BUTFILOSKI, E.; VAN ROOIJEN, N.; MOLDAWER, L.; SATOH, M.; REEVES, W. H. A novel type I IFN-producing cell subset in murine lupus. **J. Immunol.**, v. 180, n. 7, p. 5101-5108, 2008.
- LEHMANN, J.; BELLMANN, S.; WERNER, C.; SCHRÖDER, R.; SCHÜTZE, N.; ALBER, G. IL-12p40-dependent agonistic effects on the development of protective innate and adaptive immunity against *Salmonella enteritidis*. **J. Immunol.**, v. 167, n. 9, p. 5304-5315, 2001.
- LENSCHOW, D. J., WALUNAS, T. L.; BLUESTONE, J. A. CD28/B7 system of T cell costimulation. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 14, p. 233–258, 1996.
- LIN, W.; HARIBHAI, D.; RELAND, L. M.; TRUONG, N.; CARLSON, M. R.; WILLIAMS, C. B.; CHATILA, T. A. Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. **Nat. Immunol.**, v.8, p.359–368, 2007.
- LIU, J.; GUAN, X.; MA, X. Regulation of IL-27 p28 gene expression in macrophages through MyD88- and interferongamma- mediated pathways. **J. Exp. Med.**, v. 204, p. 141, 2007.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. **Methods**, v.25, 402-408, 2001.
- MATSUI, K.; MOTOHASHI, R.; NISHIKAWA, A. Cell wall components of *Staphylococcus aureus* induce interleukin-5 production in patients with atopic dermatitis. **J. Interferon Cytokine Res.**, v. 20, n. 3, p. 321-324, 2000.
- MAURI, C.; GRAY, D.; MUSHTAQ, N.; LONDEI, M. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. **J. Exp. Med.**, v. 197, n. 4, p. 489-501, 2003.
- MAUSBERG, A. K.; MEYER ZU HÖRSTE, G.; DEHMEL, T.; STETTNER, M.; LEHMANN, H. C.; SHEIKH, K. A.; KIESEIER, B. C. Erythropoietin ameliorates rat experimental autoimmune neuritis by inducing transforming growth factor-beta in macrophages. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e26280, 2011.

- MCDONALD, A. H.; DEGRASSI, A. Pristane induces an indomethacin inhibitable inflammatory influx of CD4+ T cells and IFN-gamma production in plasmacytomatous-susceptible BALB/cAnPt mice. **Cell Immunol.**, v. 146 p. 157-170, 1993.
- MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v.1, n. 2, p. 135–145, 2001.
- MELLANBY, R. J.; THOMAS, D. C.; LAMB, J. Role of regulatory T-cells in autoimmunity. **Clin. Sci.**, v. 116, n. 8, p. 639-649, 2009.
- MELLOR, A. L.; BABAN, B.; CHANDLER, P. R.; MANLAPAT, A.; KAHLER, D. J.; MUNN, D. H. Cutting edge: CpG oligonucleotides induce splenic CD19+ dendritic cells to acquire potent indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent T cell regulatory functions via IFN type 1 signaling. **J. Immunol.**, v. 175, n. 9, p. 5601-5605, 2005.
- MELLOR, A. L.; SIVAKUMAR, J.; CHANDLER, P.; SMITH, K.; MOLINA, H.; MAO, D.; MUNN, D. H. Prevention of T cell-driven complement activation and inflammation by tryptophan catabolism during pregnancy. **Nat. Immunol.**, v. 2, n. 1, p. 64-68, 2001.
- MIELLOT-GAFSOU, A.; BITON, J.; BOURGEOIS, E.; HERBELIN, A.; BOISSIER, M. C.; BESSIS, N. Early activation of invariant natural killer T cells in a rheumatoid arthritis model and application to disease treatment. **Immunology**, v. 130, n. 2, p. 296-306, 2010.
- MIYARA, M.; SAKAGUCHI, S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. **Trends Mol. Med.**, v. 13, p.108–116, 2007.
- MIZUTANI, A.; SHAHEEN, V. M.; YOSHIDA, H.; AKAOGI, J.; KURODA, Y.; NACIONALES, D. C.; YAMASAKI, Y.; HIRAKATA, M.; ONO, N.; REEVES, W. H.; SATOH, M. Pristane-induced autoimmunity in germ-free mice. **Clin. Immunol.**, v. 114, n. 2, p. 110-118, 2005.
- MORGAN, R.; WU, B.; SONG, Z.; WOOLEY, P. H. Immune reactivity to connective tissue antigens in pristane induced arthritis. **J. Rheumatol.**, v. 31, n. 8, p. 1497-1505, 2004.
- MOSELEY, T. A.; HAUDENSCHILD, D. R.; ROSE, L.; REDDI, A. H. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 14, p. 155–174, 2003.
- MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 7, p. 145–173, 1989.
- MOUNTZ, J. D.; YANG, P.; WU, Q.; ZHOU, J.; TOUSSON, A.; FITZGERALD, A.; ALLEN, J.; WANG, X.; CARTNER, S.; GRIZZLE, W.E.; YI, N.; LU, L.; WILLIAMS, R. W.; HSU, H. C. Genetic segregation of spontaneous erosive arthritis and generalized autoimmune disease in the BXD2 recombinant inbred strain of mice. **Scand. J. Immunol.**, v. 61, p. 128–138, 2005.
- MULLER, A. J.; SCHERLE, P. A. Targeting the mechanisms of tumoral immune tolerance with small-molecule inhibitors. **Nat. Rev. Cancer**, v. 6, n. 8, p. 613-625, 2006.

- MUNN, D. H.; SHAFIZADEH, E.; ATTWOOD, J. T.; BONDAREV, I.; PASHINE, A.; MELLOR, A. L. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. **J. Exp. Med.**, v. 189, n. 9, p. 1363-1372, 1999.
- MURPHY, C. A.; LANGRISH, C. L.; CHEN, Y.; BLUMENSCHNEIN, W.; MCCLANAHAN, T.; KASTELEIN, R. A.; SEDGWICK, J. D.; CUA, D. J. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. **J. Exp. Med.**, v. 198, n. 12, p. 1951-1957, 2003
- NACIONALES, D. C.; KELLY, K. M.; LEE, P. Y.; ZHUANG, H.; LI, Y.; WEINSTEIN, J. S.; SOBEL, E.; KURODA, Y.; AKAOGI, J.; SATOH, M.; REEVES, W. H. Type I interferon production by tertiary lymphoid tissue developing in response to 2,6,10,14-tetramethylpentadecane (pristane). **Am. J. Pathol.**, v. 168, n. 4, p. 1227-1240, 2006.
- NAKAE, S.; NAMBU, A.; SUDO, K.; IWAKURA, Y. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. **J. Immunol.**, v. 171, p. 6173-6177, 2003.
- NIGG, A. P.; ZAHN, S.; RÜCKERL, D.; HÖLSCHER, C.; YOSHIMOTO, T.; EHRCHEN, J.M.; WÖLBING, F.; UDEY, M.C.; VON STEBUT, E. Dendritic cell-derived IL-12p40 homodimer contributes to susceptibility in cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. **J. Immunol.**, v. 178, n. 11, p. 7251-7258, 2007.
- OHTAKI, H.; ITO, H.; ANDO, K.; ISHIKAWA, T.; SAITO, K.; IMAWARI, M.; YOKOCHI, T.; MORIWAKI, H.; SEISHIMA, M. Valpha14 NKT cells activated by alpha-galactosylceramide augment lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in mouse intra-hepatic lymphocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 378, n. 3, p. 579-583, 2009.
- OLOFSSON, P.; HOLMDAHL, R. Pristane-induced arthritis in the rat. **Methods Mol. Med.**, v. 136, p. 255-268, 2007.
- PARK, H.; LI, Z.; YANG, X. O.; CHANG, S. H.; NURIEVA, R.; WANG, Y. H.; WANG, Y.; HOOD, L.; ZHU, Z.; TIAN, Q.; DONG, C. A. distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nat. Immunol.**, v. 6, n. 11, p. 1133-1141, 2005.
- PARUNGO, C. P.; SOYBEL, D. I.; COLSON, Y. L.; KIM, S. W.; OHNISHI, S.; DEGRAND, A. M.; LAURENCE, R. G.; SOLTESZ, E. G.; CHEN, F. Y.; COHN, L. H.; BAWENDI, M. G.; FRANGIONI, J. V. Lymphatic drainage of the peritoneal space: a pattern dependent on bowel lymphatics. **Ann. Surg. Oncol.**, v. 14, n. 2, p. 286-298, 2007.
- PFLANZ, S.; TIMANS, J. C.; CHEUNG, J.; ROSALES, R.; KANZLER, H.; GILBERT, J.; HIBBERT, L.; CHURAKOVA, T.; TRAVIS, M.; VAISBERG, E.; BLUMENSCHNEIN, W. M.; MATTSON, J. D.; WAGNER, J. L.; TO, W.; ZURAWSKI, S.; MCCLANAHAN, T. K.; GORMAN, D. M.; BAZAN, J. F.; DE WAAL MALEFYT, R.; RENNICK, D.; KASTELEIN, R. A. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. **Immunity**, v. 16, p. 779, 2002.

PICCOTTI, J. R.; CHAN, S. Y.; LI, K.; EICHWALD, E. J.; BISHOP, D. K. Differential effects of IL-12 receptor blockade with IL-12 p40 homodimer on the induction of CD4+ and CD8+ IFN-gamma-producing cells. **J. Immunol.**, v. 158, n. 2, p. 643-648, 1997.

PINI, M.; FANTUZZI, G. Enhanced production of IL-17A during zymosan-induced peritonitis in obese mice. **J. Leukoc. Biol.**, v. 87, p. 51-58, 2010.

POTTER, M.; WAX, J. S. Genetics of susceptibility to pristane-induced plasmacytomas in BALB/cAn: reduced susceptibility in BALB/cJ with a brief description of pristane-induced arthritis. **J. Immunol.**, v. 127, p. 1591-1595, 1981.

ROSSATO, C. **Caracterização da fase inicial da artrite induzida pelo pristane em camundongos selecionados para alta ou baixa produção de anticorpos: envolvimento celular e molecular.** (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SANTOS, L. L.; MILENKOVSKI, G. P.; HALL, P. H.; LEECH, M.; SHARMA, L.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; KITCHING, A. R.; MORAND, E. F. IL-18 is redundant in T-cell responses and in joint inflammation in antigen-induced arthritis. **Immunol. Cell Biol.**, v. 84, n. 2, p. 166-173, 2006.

SATOH, M.; REEVES, W. H. Induction of lupus-associated autoantibodies in BALB/c mice by intraperitoneal injection of pristane. **J. Exp. Med.**, v. 180, n. 6, p. 2341-2346, 1994.

SCHELLEKENS, G. A.; VISSER, H.; DE JONG, B. A.; VAN DEN HOOGEN, F. H.; HAZES, J. M.; BREEDVELD, F. C.; VAN VENROOIJ, W. J. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. **Arthritis Rheum.**, v. 43, p. 155-163, 2000.

SHACTER, E.; ARZADON, G. K.; WILLIAMS, J. Elevation of interleukin-6 in response to a chronic inflammatory stimulus in mice: inhibition by indomethacin. **Blood**, v. 80, n. 1, p. 194-202, 1992.

SHEVACH, E. M.; MCHUGH, R. S.; PICCIRILLO, C. A.; THORNTON, A. M. Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. **Immunol. Rev.**, v. 182, p. 58-67, 2001.

SCHNURR, M.; TOY, T.; SHIN, A.; WAGNER, M.; CEBON, J.; MARASKOVSKY, E. Extracellular nucleotide signaling by P2 receptors inhibits IL-12 and enhances IL-23 expression in human dendritic cells: a novel role for the cAMP pathway. **Blood**, v. 105, p.1582, 2005.

SCOTT, G. N.; DUHADAWAY, J.; PIGOTT, E.; RIDGE, N.; PRENDERGAST, G. C.; MULLER, A. J.; MANDIK-NAYAK, L. The immunoregulatory enzyme IDO paradoxically drives B cell-mediated autoimmunity. **J. Immunol.**, v. 182, n. 12, p. 7509-7517, 2009.

SHACTER, E.; ARZADON, G. K.; WILLIAMS, J. Elevation of interleukin-6 in response to a chronic inflammatory stimulus in mice: inhibition by indomethacin. **Blood**, v. 80, n. 1, p. 194-202, 1992.

- SHIMIZU, T.; NOMIYAMA, S.; HIRATA, F.; HAYAISHI, O. Indoleamine 2,3-dioxygenase. Purification and some properties. **J. Biol. Chem.**, v. 253, n. 13, p. 4700-4706, 1978.
- SIDMAN, C. L.; SHULTZ, L. D.; HARDY, R. R.; HAYAKAWA, K.; HERZENBERG, L. A. Production of immunoglobulin isotypes by Ly-1+ B cells in viable motheaten and normal mice. **Science**, v. 232, n. 4756, p. 1423-1425, 1986.
- SIQUEIRA, M.; BANDIERI, A.; REIS, M. H.; SANT'ANNA, O. A.; BIOZZI, G. Selective breeding of mice for antibody responsiveness to flagellar and somatic antigens of Salmonellae. **Eur. J. Immunol.**, v. 6, p. 241-249, 1976.
- STOJANOVICH, L.; MARISAVLJEVICH, D. Stress as a trigger of autoimmune disease. **Autoimmun. Rev.**, v. 7, n. 3, p. 209-213, 2008.
- SUURMOND, J.; DORJEE, A. L.; BOON, M. R.; KNOL, E. F.; HUIZINGA, T. W.; TOES, R. E.; SCHUERWEGH, A. J. Mast cells are the main interleukin-17-positive cells in anti-citrullinated protein antibody-positive and -negative rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovium. **Arthritis Res. Ther.**, v. 13, n. 5, p. 150, 2011.
- SZÁNTÓ, S.; KORENY, T.; MIKECZ, K.; GLANT, T. T.; SZEKANECZ, Z.; VARGA J. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan catabolism accelerates collagen-induced arthritis in mice. **Arthritis Res. Ther.**, v. 9, n. 3, p. 50, 2007.
- TAYLOR, M. W.; FENG, G. S. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. **The FASEB Journal**, v. 5, p. 2516-2522, 1991.
- TAYLOR, P. C.; SIVAKUMAR, B. Hypoxia and angiogenesis in rheumatoid arthritis. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 17, n. 3 p. 2549-2556, 2003.
- TAYLOR, P. R.; MARTINEZ-POMARES, L.; STACEY, M.; LIN, H. H.; BROWN, G D.; GORDON, S. Macrophage receptors and immune recognition. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 23, p. 901-944, 2005.
- THOMPSON, S. J.; ELSON C. J. Susceptibility to pristane-induced arthritis is altered with changes in bowel flora. **Immunol. Lett.**, v. 36, n. 2, p. 227-231, 1993.
- THOMPSON, S. J.; ROOK, G. A.; BREALEY, R. J.; VAN DER ZEE, R.; ELSON, C. J. Autoimmune reactions to heat-shock proteins in pristane-induced arthritis. **Eur. J. Immunol.**, v. 20, p. 2479-2484, 1990.
- TOMINAGA, A.; TAKAKI, S.; KOYAMA, N.; KATOH, S.; MATSUMOTO, R.; MIGITA M. et al. Transgenic mice expressing a B cell growth and differentiation factor gene (interleukin 5) develop eosinophilia and autoantibody production. **J. Exp. Med.**, v. 173, p. 429, 1991.
- TRENTHAM, D. E.; TOWNES, A. S.; KANG, A. H. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. **J. Exp. Med.**, v. 146, n. 3, p. 857-868, 1977.

TREZENA, A. G.; SOUZA, C. M.; BORREGO, A.; MASSA, S.; SIQUEIRA, M.; DE FRANCO, M.; et al. Co-localization of Quantitative trait loci regulating resistance to *Salmonella Typhimurium* infection and specific antibody production phenotypes. **Microbes Infect.**, v.4, p. 1409-1415, 2002.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 13, p. 251-276, 1995.

TRINCHIERI, G. Type I interferon: friend or foe? **J. Exp. Med.**, v. 207, n. 10, p. 2053–2063, 2010.

VALLVÉ, J. C.; PAREDES, S.; GIRONA, J.; ULIAQUE, K.; RIBALTA, J.; HURT-CAMEJO, E.; MASANA, L. Tumor necrosis factor-alpha -1031 t/c polymorphism is associated with smaller and more proatherogenic low density lipoprotein particles in patients with rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol.**, v. 35, n. 9, p. 1697-1703, 2008.

VAN DE VELDE, N. C.; MOTTRAM, P. L.; POWELL, M. S.; LIM, B.; HOLMDAHL, R.; HOGARTH, P. M. Transgenic mice expressing human FcγRIIIa have enhanced sensitivity to induced autoimmune arthritis as well as elevated Th17 cells. **Immunol. Lett.**, v. 130, n. 1-2, p. 82-88, 2010.

VIGAR, N. D.; CABRERA, W. H.; ARAUJO, L. M.; RIBEIRO, O. G.; OGATA, T. R.; SIQUEIRA, M.; IBAÑEZ, O. M.; DE FRANCO, M. Pristane-induced arthritis in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory reaction. **Eur. J. Immunol.**, v. 30, n. 2, p. 431-437, 2000.

VINGSBO, C.; SAHLSTRAND, P.; BRUN, J. G.; JONSSON, R.; SAXNE, T.; HOLMDAHL, R. Pristane-induced arthritis in rats: a new model for rheumatoid arthritis with a chronic disease course influenced by both major histocompatibility complex and non-major histocompatibility complex genes. **Am. J. Pathol.**, v. 149, n. 5, p. 1675-1683, 1996.

VOGEL, L. A.; SHOWE, L. C.; LESTER, T. L.; MCNUTT, R. M.; VAN CLEAVE, V. H.; METZGER, D. W. Direct binding of IL-12 to human and murine B lymphocytes. **Int. Immunol.**, v. 12, p. 1955-1962, 1996.

WILDIN, R. S.; FREITAS, A. IPEX and FOXP3: Clinical and research perspectives. **J. Autoimmun.**, Suppl. 25, p. 56–62, 2005.

WILLIAMS, L. M.; RUDENSKY, A. Y. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. **Nat. Immunol.**, v.8, p. 277–284, 2007.

WILLIAMS, R. O. Collagen-induced arthritis as a model for rheumatoid arthritis. **Methods Mol. Med.**, v. 98, p. 207-216, 2004.

WING, K.; SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. **Nat. Immunol.**, v. 11, n. 1, p. 7-13, 2010.

- WIRTZ, S.; BECKER, C.; FANTINI, M. C.; NIEUWENHUIS, E. E.; TUBBE, I.; GALLE, P. R.; SCHILD, H. J.; BIRKENBACH, M.; BLUMBERG, R. S.; NEURATH, M. F. EBV-induced gene 3 transcription is induced by TLR signaling in primary dendritic cells via NF-kappa B activation. **J. Immunol.**, v. 174, p. 2814, 2005.
- WOJNO, E. D.; HOSKEN, N.; STUMHOFER, J. S.; O'HARA, A. C.; MAULDIN, E.; FANG, Q.; TURKA, L. A.; LEVIN, S. D.; HUNTER, C. A. A role for IL-27 in limiting T regulatory cell populations. **J. Immunol.**, v. 187n .1, p. 266-273, 2011.
- WOLLHEIM, F. A.; CARLSSON, J.; FORSGREN, A.; PETTERSSON, H.; Rapidly progressing rheumatoid arthritis: an example of polyclonal B-cell activation? **Clin. Rheumatol.**, v. 3, n. 1, p. 75-79, 1984.
- WOOLEY, P. H.; SEIBOLD, J. R.; WHALEN, J. D.; CHAPDELAIN, J. M. Pristane-induced arthritis. The immunologic and genetic features of an experimental murine model of autoimmune disease. **Arthritis Rheum.**, v. 32, p. 1022-1030, 1989.
- WOOLEY, P. H.; WHALEN, J. D. Pristane-induced arthritis in mice. III. Lymphocyte phenotypic and functional abnormalities precede the development of pristane-induced arthritis. **Cell Immunol.**, v. 138, n. 1, p. 251-259, 1991.
- WOOLEY, P. H.; SUD, S.; WHALEN, J. D.; NASSER, S. Pristane-induced arthritis in mice. V. Susceptibility to pristane-induced arthritis is determined by the genetic regulation of the T cell repertoire. **Arthritis Rheum.**, v. 41, n. 11, p. 2022-2031, 1998.
- YANG, J. Q.; WEN, X.; KIM, P. J.; SINGH, R. R. Invariant NKT cells inhibit autoreactive B cells in a contact- and CD1d-dependent manner. **J. Immunol.**, v. 186, n. 3, p. 1512-1520, 2011.
- YASUDA, Y.; KALETA, J.; BROMME, D. The role of cathepsins in osteoporosis and arthritis: rationale for design of new therapeutics. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 57, n. 7, p. 973-993, 2005.
- YOSHIDA, R.; HAYAISHI, O. Induction of pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase by intraperitoneal injection of bacterial lipopolysaccharide. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 75, n. 8, p. 3998-4000, 1978.
- YOSHIMURA, T.; TAKAHASHI, M. IFN-gamma-mediated survival enables human neutrophils to produce MCP-1/CCL2 in response to activation by TLR ligands. **J Immunol.**, v. 179, n. 3, p. 1942-1949, 2007.
- ZHENG, S. G.; WANG, J.; HORWITZ, D. A. Cutting edge: Foxp3+CD4+CD25+ regulatory T cells induced by IL-2 and TGF-beta are resistant to Th17 conversion by IL-6. **J. Immunol.**, v. 180, n. 11, p. 7112-7116, 2008.
- ZVAIFLER, N. J. The immunopathology of joint inflammation in rheumatoid arthritis. **Adv. Immunol.**, v. 16, p. 265-336, 1973.

ZYGMUNT, B. M.; GROEBE, L.; GUZMAN, C. A. Peritoneal cavity is dominated by IFN γ -secreting CXCR3⁺ Th1 cells. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e18032, 2011.