UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação do metabolismo oxidativo de polimorfonucleares
mediado por receptores para IgG e para o complemento em
pacientes com artrite reumatóide em diferentes estágios da doença**

Adriana Balbina Paoliello Paschoalato

Ribeirão Preto

2007

ADRIANA BALBINA PAOLIELLO PASCHOALATO

“Avaliação do metabolismo oxidativo de polimorfonucleares
mediado por receptores para IgG e para o complemento em pacientes
com artrite reumatóide em diferentes estágios da doença.”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto,
Universidade de São Paulo, para obtenção do título
de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientadora: Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim

Ribeirão Preto
2007

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Paoliello-Paschoalato, Adriana Balbina

Avaliação do metabolismo oxidativo de polimorfonucleares mediado por receptores para IgG e para o complemento em pacientes com artrite reumatóide em diferentes estágios da doença. Ribeirão Preto, 2007.

112 p.: il.; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Orientadora: Lucisano-Valim, Yara Maria.

1.Neutrófilos. 2.Artrite reumatóide. 3.Metabolismo oxidativo. 4.Sistema complemento. 5.Receptor Fc-gamma. 6.Receptor CR.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autora: Adriana Balbina Paoliello Paschoalato

Título: Avaliação do metabolismo oxidativo de polimorfonucleares mediado por receptores para IgG e para o complemento em pacientes com artrite reumatóide em diferentes estágios da doença.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____ Assinatura: _____

Aprovado pela Comissão Julgadora em: ____/____/____.

Agradecimientos

A DEUS

*PELA MARAVILHOSA OPORTUNIDADE DESTA EXISTÊNCIA
QUE ME PERMITE OLHAR MINHAS CONQUISTAS
SIMPLESMENTE COM ALEGRIA, E MINHAS FALHAS
COM CONSCIÊNCIA DE QUE POSSO CRESCER UM POUCO MAIS,
COMPARTILHANDO ESTA CAMINHADA COM SERES QUERIDOS
E ESPECIAIS....SEMPRE!!*

*"Tua luta é teu propósito
Tua determinação é tua
principal arma
A seleção por ti imposta
é presença constante
de tua manifestação
a favor de ti mesmo.
Não percas tua linha
Tua presença em teu
próprio ser.
Não percas Deus em teu coração.*

AOS PACIENTES

*QUE GENTILMENTE ACEITARAM FAZER PARTE DESTE ESTUDO.
ESPERO, SINCERAMENTE, DE ALGUMA MANEIRA,
CONTRIBUIR PARA A ABERTURA DE UM CAMINHO QUE POSSA,
AO MENOS, ALIVIAR SUAS DORES E SOFRIMENTOS.*

AOS ANIMAIS

*QUE SERVIRAM DE INSTRUMENTO, DOANDO SUAS VIDAS
EM FAVOR DO MEU CRESCIMENTO PROFISSIONAL E DA REALIZAÇÃO
DESTE TRABALHO DENTRO DO NOSSO GRUPO DE PESQUISA.*

*"Sustento que o sentimento religioso cósmico é o mais forte
e o mais nobre incitamento à pesquisa científica."*

(Albert Einstein)

AOS MEUS PAIS, EFIGÊNIA E GERALDO (in memorian)

*DEDICO ESTE TRABALHO, COM PROFUNDA GRATIDÃO
DIANTE DA VIDA E COM INFINITO RESPEITO PELO AMOR RECEBIDO.
DESEJO TER SENSIBILIDADE E SABEDORIA O SUFICIENTE
PARA QUE EU SEJA CAPAZ DE RETRIBUIR DE TODAS AS MANEIRAS,
SUA DEDICAÇÃO POR MIM*

AOS MEUS FILHOS, CAROLINA, RÔMULO E RICARDO

O MAIOR AMOR QUE JÁ SENTI.

LUZES CONSTANTES NO MEU CAMINHO

QUE NÃO ME DEIXAM PERDER O SENTIMENTO MAIS IMPORTANTE

PARA MOTIVAR O SER HUMANO DIANTE DA VIDA:

A ESPERANÇA!

PELO AMOR E AMIZADE QUE NOS UNE

POR TODA A ETERNIDADE.

AO MEU MARIDO RICARDO,

*PELO INTENSO APRENDIZADO DURANTE TODOS OS ANOS
DA NOSSA CONVIVÊNCIA, QUE SEMPRE ME MOTIVOU,
NÃO ME DEIXANDO DESISTIR DOS MEUS OBJETIVOS.
PELO LAR E PELA FAMÍLIA QUE JUNTOS CONSTRUÍMOS,
PARA ONDE SEMPRE PODEMOS RETORNAR,
REFAZER NOSSAS ENERGIAS E SEGUIR ADIANTE.
ESPERO SER PARA VOCÊ, O AMOR, A AMIGA
E O ESTEIO DA SUA PAZ INTERIOR*

À PROFA. DRA. YARA MARIA LUCISANO VALIM

*ORIENTADORA, MESTRA E EDUCADORA,
QUE CONDUZIU ESTE TRABALHO COM COMPETÊNCIA,
ÉTICA E SENSIBILIDADE.*

*AMIGA DOS MOMENTOS DE ALEGRIA ATÉ OS DE
PROFUNDA TRISTEZA, MUITAS VEZES,
CONSEQUÊNCIAS AINDA DAS MINHAS IMPERFEIÇÕES,
QUE ELA SEMPRE RESPEITOU, NUNCA DESACREDITANDO
DO MEU CRESCIMENTO PROFISSIONAL E HUMANO.*

*À COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL
SUPERIOR (CAPES), PELO AUXÍLIO FINANCEIRO CONCEDIDO
PARA A REALIZAÇÃO DESTE TRABALHO*

*AO MEU SOGRO ORLANDO (in memorian) E MINHA SOGRA MERCEDES,
Que sempre me apoiaram, que vibram com minhas conquistas, que dividem as minhas
dores para que eu possa suportá-las. Por me acolherem como filha do coração.
Agradeço profundamente...*

*AOS MEUS PADRINHOS E PRIMOS RUBENS (in memorian) E TEREZINHA
COELHO, pela presença amorosa e constante, me ensinando a valorizar os “pequenos”
ensinamentos que a vida nos proporciona.*

*À MINHA AMIGA E “IRMÃ” CRISTINA ANTONIALLI SILVA, que a
distância e o tempo jamais irão separar! Por acompanhar minha formação profissional
desde o início com imenso carinho e atenção.*

*AOS AMIGOS ETERNOS SRA. NILVA E SR. JOSÉ, pela amizade verdadeira e,
pelo incansável apoio. Despertando em mim a necessidade de trabalhar, primeiramente,
meu crescimento espiritual que refletirá no progresso da minha existência.*

*À MINHA AMIGA LUCIENE CAMACHO, que cuidou do meu lar e da minha
família com dedicação e carinho como se fosse sua.*

*À MINHA AMIGA MARIA LUÍZA ROSA, que acreditou em mim e abriu as
“primeiras portas” para que eu pudesse aplicar meu aprendizado na formação
acadêmica e científica dos alunos do curso de Medicina da UNIFIPA, em Catanduva.*

Amigo não é aquele que diz “vá em frente”, mas aquele que diz “vou contigo”.

Aos "amigos incansáveis" e colegas do Laboratório de Bioquímica da FCFRP-USP

À Mirian R. Moreira, pela amizade, pelo carinho, pela solidariedade e pelos inúmeros momentos de aprendizado e crescimento compartilhados.

À Daiani C.O. Andrade pela amizade, pelo companheirismo "nas frentes" de trabalho e pela alegria constante que aliviou nossas dificuldades.

À Luciana Mariko Kabeya pela amizade incondicional e sincera, pelo incentivo constante e pelo respeito às minhas imperfeições.

Ao Alexandre Kanashiro pela amizade, atenção e apoio sempre presentes todos estes anos.

À Denise P.S. Leitão, pela amizade, pelas reflexões e pelos inúmeros momentos de alegria.

À Livia M.C.S. Ambrosio pela preciosa amizade e carinho sempre presentes.

À Cleni M.M.Marzocchi-Machado pela amizade, convivência e pelas valiosas contribuições ao longo deste estudo, com atenção especial no entendimento e aproveitamento dos resultados, que me permitiu valorizar este trabalho.

À Elisa M.S. Russo-Carbolante pela amizade, generosidade e companheirismo durante estes anos.

À Ana Paula L. Librandi pela amizade preciosa, pela delicadeza e apoio constante.

À Cláudia S. Bitencourt pela amizade e pela cooperação valiosas para o meu aprendizado.

À Fabiana S. Paula pela amizade e pela convivência importante para o crescimento de um grupo de pesquisa.

À Andrea S.G. Figueiredo pela bondade e amizade, transparentes no sorriso.

Ao Joel G. Souza pela alegria e pelo companheirismo.

Ao Amarildo A. Cavenaghi pela realização dos experimentos sobre o complemento, por sua alegria e bom humor constantes.

Ao Gustavo Martelli pela amizade preciosa, pelos momentos de riso compartilhados e pelo apoio constante.

À Marlene Rodrigues da Silva por seu carinho e por sempre ter acreditado em mim.

À Maria Angélica dos Santos Cunha Chellegatti por sua amizade e por sua intensa alegria de viver.

À, Anaisa F.C. Helena, Juliana da Silva Oliveira, Clayton S. Freitas, Daniel J. Dorta, Fernando A.M. Souza, Mateus F. Leite, Wagner R. Sousa, pela agradável convivência.

A todos os estagiários, pela imprescindível cooperação.

O que as grandes e puras afeições têm de bom é que, depois da felicidade de as ter sentido, há ainda a felicidade de recordá-las.

(Alexandre Dumas Filho)

Aos funcionários do Laboratório de Bioquímica da FCFRP-USP :

Maria Regina de P. Raphaloski, por todos os anos de amizade, pelo apoio constante e por todos os cuidados e atenções no desenvolvimento deste trabalho.

Ana Elisa C.S. Azzolini, pela amizade, pelo empenho e apoio na realização deste trabalho e pelos agradáveis momentos de convivência "gemelar"!

Ana Cristina M. Polizelo, pela amizade, pelo apoio e auxílio constantes, e pelos agradáveis momentos de convivência e aprendizado.

Ieda M.R. Prado, pela amizade, pelo apoio, muitas vezes transmitidos "apenas" com um olhar ou um sorriso.

Nadir Mazzucato, pela amizade e docilidade constantes, pelo trabalho responsável e valioso.

Alcides S. Pereira, pela amizade, e pela importante colaboração para a realização deste trabalho.

*Ante o bem que se faça, faze o bem quanto possas, para que o bem pequeno se faça,
junto de todos, o bem maior.*

(Chico Xavier)

Ao Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi, da Clínica Médica, Imunologia, do HCFMRP-USP, por abrir os caminhos para este estudo, permitindo o contato direto com os pacientes do HCFMRP-USP e por sua coorientação imprescindível ao aperfeiçoamento deste trabalho.

À Professora: Dra. Ana Isabel de Assis Pandochi pela realização dos estudos do sistema complemento, pela avaliação construtiva e valiosa no meu exame de qualificação e pela atenção especial com a minha formação profissional e humana.

Ao Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi, do laboratório de Glicoimunologia da FCFRP-USP, pela amizade, pela cooperação e apoio, pelos diversos esclarecimentos prestados no meu exame de qualificação e pela prontidão incansável na realização deste trabalho.

Aos Professores: Dra. Carem Gledes Vargas Recchia, Dr. Carlos Curti e Dr. Augusto César Cropanese Sapdaro, pelos ensinamentos acadêmicos e pelos momentos de agradável convivência.

Ao Prof. Dr. Sérgio A. Uyemura, do laboratório de Bioquímica Clínica da FCFRP-USP, pela valiosa contribuição e pela alegre convivência.

Ao Prof. Dr. Carlos A. Oliveira, da Universidade Federal de Uberlândia, pela amizade, e pela prontidão em ajudar e ensinar com competência e simplicidade.

Ao Prof. Dr. Bernardo Mantovani, e aos técnicos Silvana C. Silva e José Antônio da Silva, do Laboratório de Bioquímica da FMRP-USP, pela valiosa cooperação e pelas importantes discussões sobre os ensaios biológicos.

Ao Prof. Dr. Antônio Cardozo dos Santos, do Laboratório de Toxicologia da FCFRP-USP, por sua colaboração cedendo espaço no seu laboratório para realização do trabalho, enquanto a Bioquímica "se transformava".

Ao Dr. Flávio Calil Petean e à Dra. Fabíola Reis pela valiosa contribuição na seleção e atendimento dos pacientes neste estudo.

À Patrícia V. B. Palma do Centro Regional de Hemoterapia do HCFMRP-USP-Hemocentro de Ribeirão Preto, e à Fabiana Rosseto de Moraes da FCFRP-USP pela atenção e pela realização dos experimentos de citometria de fluxo.

À Sandra Silva Rodrigues dos Santos e Neifi Hassan Saloum Deghaide pela atenção, pelos ensinamentos e conhecimentos que desde já, abrem novas etapas para este trabalho.

A todos os colegas e amigos que se prontificaram como voluntários, a doar sangue para a realização dos experimentos propostos neste trabalho.

Aos médicos residentes da Clínica Médica, Imunologia, do HCFMRP-USP, especialmente Dra. Ana Paula e Dr. Felipe, pela colaboração na seleção dos pacientes.

Às Funcionárias da Seção de Pós-Graduação da FCFRP-USP Ana Lúcia T. Barbosa, Eleni A. Passos e Rosana F.L.S. Florêncio, pela paciência e pela imprescindível assistência durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos pós-graduandos do Laboratório de Bioquímica Clínica da FCFRP-USP : Flávia Martinello, Frederico M. Soriani, Sheila Maria Soares, Taisa Magnani, Valéria G. Tudella e Vicente P. Martins, pela preciosa colaboração.

Aos Funcionários das diferentes seções da FCFRP-USP, que de alguma maneira, mesmo que indiretamente, contribuíram na realização deste trabalho.

Aos Funcionários do Biotério da FCFRP-USP e do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto, pelo cuidado no tratamento dos animais.

Aos Funcionários da Biblioteca Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela simpatia, pela atenção e pela prontidão em ajudar.

*A todos aqueles que, embora não citados,
contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.*

*“Apenas os que se arriscam a ir longe,
são capazes de descobrir até onde se pode chegar”.*

Resumo

PAOLIELLO-PASCHOALATO, A.B. **Avaliação do metabolismo oxidativo de polimorfonucleares mediado por receptores para IgG e para o complemento em pacientes com artrite reumatóide em diferentes estágios da doença.** 2007. 112f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

A Artrite reumatóide (AR) é uma doença inflamatória crônica e sistêmica, de etiologia desconhecida, que pode dificultar ou impossibilitar as funções habituais das articulações devido à destruição da cartilagem, edema e dor. A patogênese da AR envolve uma complexa inter-relação de fatores imunológicos, ambientais e genéticos, dificultando assim a descoberta de terapias eficientes. Na AR, o influxo de neutrófilos para a cavidade sinovial é predominante e contínuo de tal forma que, os neutrófilos são as células mais abundantes no sítio inflamatório. Uma vez ativados, os neutrófilos são capazes de produzir espécies reativas de oxigênio que, juntamente com enzimas proteolíticas, podem estar envolvidos na lesão articular observada nos pacientes com AR.

A ativação dos neutrófilos pode ser mediada por receptores para IgG (Fc γ R) e para o complemento (CR) presentes nas membranas dessas células, através da interação com complexos imunes (ICs). Esses receptores são também importantes moduladores das reações inflamatórias mediadas por ICs. Entretanto, a função do sistema complemento e dos Fc γ R, bem como a importância de cada um na manifestação da AR ainda não está clara.

Assim, neste estudo avaliou-se o metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados através de receptores Fc γ R e Fc γ R/CR em ambos os grupos de pacientes com AR, ativa e inativa, e em controles saudáveis. Esta função celular foi avaliada por quimioluminescência (QL) dependente de luminol e de lucigenina. Os resultados mostraram que não houve diferenças na produção de QL, tanto dependente de luminol quanto de lucigenina, quando mediada por Fc γ R ou pela cooperação Fc γ R/CR, em

ambos os grupos de pacientes com AR comparados entre si e comparados com neutrófilos de indivíduos saudáveis. No entanto, a comparação do padrão da resposta de QL dentro de ambos os grupos de pacientes com AR, mostrou que a resposta celular aos IC opsonizados por soro humano de pacientes com AR (IC-IgG/SHAR) não foi significativamente maior em relação à observada para os IC não opsonizados, refletindo uma ausência da cooperação Fc γ R/CR nestas células. Vale ressaltar que a atividade hemolítica do complemento sérico, tanto da via clássica/lectina quanto da alternativa, não foi diferente entre os grupos estudados.

Quanto à expressão dos CR, somente no grupo de pacientes com AR ativa observou-se diferenças, sendo que CR1 estava aumentado em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) e CR3 aumentado quando comparado ao grupo de pacientes com AR inativa ($p < 0,05$). A expressão dos Fc γ R, CD32 e CD16, não foi diferente entre os grupos estudados. Ainda, as análises de correlação da expressão dos diferentes receptores de membrana mostraram: (i) correlação positiva CD16 vs CR1 somente nos grupos com AR, ativa e inativa; (ii) correlação positiva CD16 vs CR3 no grupo com AR ativa; (iii) ausência de correlação entre a expressão de CD32 e o número de neutrófilos CD32+ no grupo com AR ativa; e (iv) correlação positiva entre a expressão de CR3 e o número de neutrófilos CR3+ no grupo com AR ativa. O conjunto de resultados sugere que estas diferenças ocorrem apenas durante a atividade da doença, reforçando a hipótese que estas alterações sejam uma característica adquirida da doença. Desta forma, este estudo pode contribuir para esclarecer mecanismos envolvidos na patogênese da AR, que possam ser alvos em potencial para o desenvolvimento de agentes terapêuticos específicos para esta doença.

Palavras chave: neutrófilos, artrite reumatóide, metabolismo oxidativo, sistema complemento, receptor Fc-gamma, receptor CR.

Abstract

PAOLIELLO-PASCHOALATO, A.B. **Evaluation of polymorphonuclear leukocyte oxidative metabolism mediated by IgG and complement receptors in rheumatoid arthritis patients at different disease stages.** 2007. 112f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic and systemic inflammatory disease of unknown etiology that can impair the usual joint functions, due to cartilage damage, edema and pain. The RA pathogenesis involves multiple interacting immunological, environmental and genetic factors, making it difficult to find effective therapies. Neutrophils are the most abundant cells at AR inflammatory sites, since they migrate continuously to the synovial cavity. The activated neutrophils generate reactive oxygen species and release a variety of proteases that seem to be involved in the joint lesions of RA patients.

Neutrophil activation can be mediated by membrane receptors for IgG (Fc γ R) and for complement (CR) through interaction with immune complexes (IC). These receptors are also very important modulators of IC-mediated inflammatory reactions. However, the role of the complement system and Fc γ R and the hierarchy of them in the manifestation of RA are still unclear.

In this study, we evaluated the neutrophil oxidative burst induced by Fc γ R and Fc γ R/CR, from RA patients at active and inactive disease stages, and from healthy controls. This cellular function was assessed by luminol- and lucigenin-enhanced chemiluminescence (CL) systems. When neutrophils were stimulated via Fc γ R or Fc γ R/CR cooperation, we found that the cellular responses of active and inactive RA patients were not significantly different when compared to each other and to the healthy controls, by using both CL systems. However, the comparison between the active and inactive RA groups revealed that the CL responses triggered by IC opsonized with RA serum were not significantly higher than those observed for

neutrophils stimulated only via Fc γ R (IC-IgG), reflecting an absence of Fc γ R/CR cooperation in these cells. In addition, the hemolytic activities of serum complement, classical/lectin and alternative pathways, were not different among the groups studied.

With regard to the CR expression, only neutrophils from the active RA group showed an increased number of CR1 and CR3 on their surfaces when compared with the control ($p<0.05$) and the inactive RA groups ($p<0.05$), respectively. The Fc γ R expressions, CD32 and CD16, were not different among the groups studied. In addition, correlation analysis of the expression among the different receptors showed: (i) a positive correlation CD16 vs CR1 in both RA groups, active and inactive; (ii) a positive correlation CD16 vs CR3 in the active RA group; (iii) an absence of correlation between the CD32/neutrophil expression and the number of this cell bearing CD32 in the active RA groups; and (iv) a positive correlation between the CR3/neutrophil expression and the number of this cell bearing CR3 in the active RA group. These results suggest that such differences could be occurring just during the activity of the RA, supporting once again an acquired characteristic of the disease. This study can contribute for the understanding of the mechanisms involved in the pathogenesis of the RA, which might become potential targets for the development of specific therapeutic agents for this disease.

Keywords: neutrophils, rheumatoid arthritis, oxidative metabolism, complement system, Fc-gamma receptor, complement receptor.

Lista de abreviaturas

Ac	anticorpo
Ag	antígeno
AR	artrite reumatóide
ATP	trifosfato de adenosina
C1	primeiro componente da via clássica
C3b, C3bi	fragmentos de ativação do sistema complemento
CD	“cluster” de diferenciação
CFD	diluyente para fixação de complemento
CR	receptor de complemento
CR1, CR3	receptor de complemento tipo 1 e 3
DEAE	dietilaminoetil
DNA	ácido desoxirribonucleico
EA	eritrócitos revestidos com o anticorpo
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
EGTA	ácido etilenoglicol-bis-amino tetracético
EROs	espécies reativas de oxigênio
Fc	fragmento cristalizável da molécula de anticorpo
Fc γ R	receptor para a porção Fc de IgG
Fc γ RIIa, Fc γ RIIIb	isoformas de receptores Fc γ R
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FR	fator reumatóide
FS	fluido sinovial
G-CSF	fator estimulador de colônias de granulócitos
GPI	glicosil fosfatidil inositol
HLA	antígeno leucocitário humano
IC	imunocomplexo ou complexo imune
IFN	interferon

Ig	Imunoglobulina
IgG, IgM	Imunoglobulinas das classes G e M
IL-8	interleucina 8
ITAM	“immunoreceptor tyrosine-based activation motif”
LLM	lectina ligante de manana
LTB ₄	leucotrieno
Luc	lucigenina
Lum	luminol
MASP-1 e MASP-2	serina-protease associada à LLM
MBL	“mannan-binding lectin-associated serine protease”
MPO	mieloperoxidase
NADPH	nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
OVA	ovalbumina
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PCR	proteína C reativa
PE	ficoeritrina
PKC	proteína quinase C
PMN	polimorfonuclear
QL	quimioluminescência
SBF	soro bovino fetal
SDS	dodecil sulfato de sódio
SHAR	soro humano de artrite reumatóide
SHN	soro humano normal
SOD	superóxido dismutase
TEA	trietanolamina
TEMED	tetrametilenodiamino
TNF-?	fator de necrose tumoral tipo alfa

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	21
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	23
3.1. Animais.....	25
3.2. Antígeno	25
3.3. Imunização dos animais	25
3.4. Obtenção do soro imune de coelhas.....	26
3.5. Preparação dos anticorpos IgG anti-OVA.....	27
3.5.1. Identificação dos anticorpos.....	28
3.5.1.1. Eletroforese	28
3.5.1.2. Immunodifusão.....	29
3.5.1.3. Determinação da zona de equivalência da reação antígeno-anticorpo	30
3.6. Preparação dos imunocomplexos (ICs).....	31
3.6.1. Opsonização dos ICs	31
3.7. Fonte de complemento.....	32
3.7.1. Soro humano normal	32
3.7.2. Soro humano de artrite reumatóide	32
3.8. Obtenção de neutrófilos humanos.....	33
3.9. Ensaio para avaliação do metabolismo oxidativo de neutrófilos	33
3.9.1. Quimioluminescência dependente de luminol	33
3.9.2. Quimioluminescência dependente de lucigenina	34
3.10. Quantificação dos receptores para complemento e para Fc γ nos neutrófilos por citometria de fluxo	35
3.11. Atividade hemolítica do Complemento sérico.....	36
3.11.1. Via clássica / lectina.....	36

3.11.1.1. Complexo eritrócito / anticorpo anti-eritrócito (EA)	36
3.11.1.2. Determinação do T $\frac{1}{2}$	37
3.11.2. Via alternativa.....	38
3.11.2.1. Suspensão de eritrócitos de coelho	38
3.11.2.2. Determinação do T $\frac{1}{2}$	39
3.12. Análise dos dados	39
4. RESULTADOS.....	40
4.1. Obtenção e caracterização da IgG anti-OVA.....	41
4.1.1. Purificação da fração IgG a partir de soro imune de coelho.....	41
4.1.2. Caracterização da IgG anti-OVA	42
4.1.2.1. Eletroforese.....	42
4.1.2.2. Imunodifusão.....	44
4.2. Determinação do ponto de equivalência da formação do imunocomplexo	
OVA - IgG anti-OVA	45
4.3. Avaliação do metabolismo oxidativo de neutrófilos por	
quimioluminescência	46
4.4. Expressão dos receptores para imunoglobulina G (Fc γ R) e para o	
complemento (CR) nos neutrófilos por citometria de fluxo	53
4.5. Atividade hemolítica do complemento sérico.....	71
4.5.1. Via clássica.....	71
4.5.2. Via alternativa.....	75
5. DISCUSSÃO	77
6. CONCLUSÕES.....	87
REFERÊNCIAS	90
ANEXOS.....	110

1. Introdução

A Artrite reumatóide do adulto (AR) é uma doença inflamatória crônica e sistêmica, evidenciada por uma sinovite poliarticular persistente, de distribuição simétrica e com grande potencial deformante. A AR, como problema de saúde pública, já atinge cerca de 1% da população mundial, com prevalência variando de acordo com os grupos étnicos estudados (McDERMOTT et al., 1988; SPECTOR et al., 1990; LEE et al., 2001). As mulheres são mais afetadas do que os homens, numa proporção de 3:1, podendo ocorrer em qualquer faixa etária (LAWRENCE et al., 1977; SKARE, 1999; COSSERMELLI, 2000). O processo inflamatório crônico induz alterações na composição celular e no perfil de expressão gênica na sinóvia, resultando em proliferação dos fibroblastos sinoviais (SALTER, 1985; CONSALTER et al., 2005). A intensa resposta inflamatória nas articulações promove a destruição da cartilagem, causando edema, dor e dificultando ou impossibilitando as funções habituais da articulação (GALLIN; SNYDERMAN, 1999; RINDFLEISCH; MÜLLER, 2005).

Diversas teorias têm sido sugeridas para determinar uma causa da AR, no entanto a presença de imunoglobulinas (Ig) alteradas e do fator reumatóide torna a disfunção auto-imune, como o agente potencializador mais evidente para a AR. Entre os achados laboratoriais, nenhum teste é específico para o diagnóstico da AR. Contudo, os fatores reumatóides (FR), auto-anticorpos reativos contra a porção Fc de IgG, descritos a partir de 1940 (TORRES; CICONELLI, 2005), (AL-BALAGHI et al., 1982), são encontrados em mais de 2/3 dos adultos com AR (ARNETT et al., 1988). A importância prognóstica do fator reumatóide pode ser avaliada nos pacientes com altos títulos de FR e que costumam ter uma doença mais agressiva. A presença dos fatores reumatóides pode ser considerada uma via para a amplificação da doença articular, por

aumentar a formação de nódulos cutâneos, a vasculite e o envolvimento poliarticular (KOOPMAN, 2001).

Um agente etiológico desconhecido (antígeno), ativaria as células T auxiliar através da célula apresentadora de antígeno e pelo Antígeno Leucocitário humano (HLA) de classe 2. Esta reação desencadearia uma resposta imunológica que, por sua vez, acarretaria uma grande produção de células T e um aumento na proliferação e diferenciação de células B, produzindo mais anticorpos (SKARE, 1999).

Na progressão da doença ocorre a formação de uma rede extensa de vasos sangüíneos na membrana sinovial induzida por macrófagos, ativados por citocinas. Esse quadro contribui para a evolução da sinovite inflamatória. Concomitante a isso, linfócitos sofrem diapedese pelas vênulas e se alojam na membrana sinovial, induzindo a neovascularização. Tudo isso contribui para o aspecto edematoso da sinóvia (O'SULLIVAN, 1993; SKARE, 1999).

Além disto, ocorre hiperplasia do revestimento sinovial, com neoangiogênese abundante, ativação de células endoteliais, que são estimuladas a produzir moléculas de adesão e quimiotaxinas que facilitam o influxo de células adicionais. Vênulas endoteliais especializadas em recrutamento de linfócitos são formadas e ocorre proliferação de fibroblastos sinoviais (CONSALTER et al., 2005).

As articulações comprometidas pela AR apresentam um infiltrado de leucócitos na sinóvia, constituindo-se de células T CD4 e CD8, células B, linfoblastos, plasmócitos, macrófagos e neutrófilos. Os plasmócitos são responsáveis pelo fator reumatóide positivo. As prostaglandinas e os leucotrienos, produzidos pelas células inflamatórias, medeiam à inflamação. Os

macrófagos ativados pelas células CD4 aumentam a destruição tecidual ao acumularem-se na sinóvia inflamada. Os neutrófilos liberam enzimas lisossômicas e outras substâncias citotóxicas no espaço sinovial, causando dano ao tecido e proliferação da sinóvia (PARHAM, 2001).

As alterações vasculares focais ou segmentares como dilatação venosa, obstrução capilar, áreas de trombose e hemorragia perivascular, são comuns na AR.

Grande progresso tem sido alcançado com a aquisição de conhecimentos sobre a patogenia da AR, entretanto, a etiologia da doença continua desconhecida.

O desenvolvimento das doenças auto-imunes como a AR, depende da participação de fatores ambientais, imunológicos e genéticos (EBRINGER et al., 1989; HAJEER et al., 1994; ALBANI et al., 1995; SILMAN et al., 1993; SELDIN et al., 1999; FELDMANN et al., 1996; ABE et al., 2001). No entanto, a inter-relação desses fatores é bastante complexa.

Os mecanismos imunológicos envolvem mediadores inflamatórios, diferentes tipos celulares e cascatas de sinalização que interagem entre si na tentativa de proteger e garantir a homeostase do organismo. Na AR, observa-se a participação de citocinas e quimioquinas (POBER et al., 1990; OPPENHEIM et al., 1991; KOCH et al., 1992) capazes de recrutar variados tipos celulares da circulação para a sinóvia, como os polimorfonucleares (PMN) e células mononucleares, incluindo macrófagos, linfócitos B, linfócitos T, sendo a maioria linfócitos T CD4 (COOKE; PONDER 1927; PABER et al., 2001; HONG et al., 2002). Apesar da importância atribuída aos diferentes tipos celulares na patogenia da AR, o influxo de PMN, que migram e se acumulam na cavidade

sinovial, é predominante e contínuo (KOOPMAN, 2001).

Os polimorfonucleares foram descobertos por Paul Erlich, quando as técnicas de fixação e coloração celular possibilitaram a identificação de núcleo lobulado e da presença de grânulos citoplasmáticos (ERLICH; LAZARUS 1900 *apud* BORREGAARD; COWLAND, 1997). Posteriormente COOKE; PONDER (1927), identificaram núcleos multilobados, morfologicamente diversos e conectados por filamentos de cromatina. Os granulócitos neutrófilos, ou simplesmente neutrófilos são assim chamados pela sua tonalidade neutra nas colorações de Romanowsky.

Os neutrófilos são produzidos e armazenados na medula óssea, sendo liberados na sua forma madura para o sangue periférico, onde tem uma média de vida em circulação bastante curta, de 6 a 7 horas. O local de destruição final dos neutrófilos não é bem conhecido, mas são encontrados na saliva, no trato gastrointestinal e também podem ser removidos da circulação pelo fígado, pulmões e baço (BAINTON; ULLYOT; FARQUHAR, 1971; JOHNSON; VARANI; SMOLEN, 1992; ZAGO; FALCÃO, 2004; KABEYA, 2006).

Os polimorfonucleares são os leucócitos mais numerosos no sangue, constituindo 50 a 70% do total destas células. Entretanto, eles também podem transitar pelos tecidos por intermédio da quimiotaxia (LEY, 2002; FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003). Pelo fato de serem os primeiros componentes celulares do sistema imune que chegam aos sítios inflamatórios e de apresentarem funções altamente especializadas, os neutrófilos são considerados a primeira linha de defesa na imunidade natural contra patógenos. Estas células, juntamente com os macrófagos são as principais células fagocíticas do sistema imunológico, com participação ativa na reação

inflamatória e na fase efetora da resposta imune específica (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003). A função da fagocitose na defesa do hospedeiro foi descoberta por Elie Metchnikoff no final do século XIX, e está descrita em seu trabalho publicado em 1883 (*apud* BABIOR, 2000).

Os fagócitos são capazes de envolver e destruir uma variedade de patógenos que ocasionalmente penetram as barreiras físicas do organismo (QUINN; GAUSS, 2004). Após o reconhecimento, as partículas estranhas são englobadas pelo fagócito e internalizadas em vacúolos citoplasmáticos, chamados fagossomos. A estes vacúolos fundem-se os grânulos presentes no citoplasma do fagócito, que descarregam potentes enzimas capazes de degradar uma ampla variedade de substâncias biológicas, incluindo membranas celulares, colágeno, elastina, mucopolissacarídeos. Os grânulos intracelulares dos neutrófilos são atualmente classificados em primários (ou azurófilos), secundários (ou específicos) ou terciários (ou de gelatinase) (BAINTON et al., 1971; JOHNSON et al., 1992) e vesículas secretórias.

A ativação da fagocitose estimula nos neutrófilos o metabolismo oxidativo, referido na literatura como “burst”, surto ou explosão respiratória, metabólica ou oxidativa. Esta função celular é caracterizada pelo aumento do consumo de oxigênio e de trifosfato de adenosina (ATP), aumento da oxidação da glicose pela via da hexose monofosfato, do transporte de elétrons e da geração de espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs) (HAMPTON et al., 1998; (KABEYA, 2006). Em 1964, Rossi; Zatti *apud* ROSSI (1986), demonstraram que a ativação de uma NADPH (nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato-forma reduzida) oxidase era responsável pelo “burst” respiratório nos neutrófilos. A ausência da atividade desta oxidase foi

observada em fagócitos de pacientes com doença granulomatosa crônica, os quais apresentavam uma pré-disposição severa a infecções piogênicas (HOLMES et al., 1967; QUIE et al., 1967). Estes estudos evidenciaram a importância do metabolismo respiratório durante a fagocitose, que através da ação de potentes agentes microbicidas, como as espécies reativas de oxigênio (EROs), promove a destruição dos antígenos englobados.

O complexo enzimático NADPH oxidase está associado à membrana citoplasmática bem como à membrana dos grânulos específicos dos neutrófilos, e pode ser rapidamente ativado, quando estas células são expostas a estímulos adequados (SEGAL; ABO, 1993; ROOS; VAN BRUGGEN; MEISCHL, 2003).

As EROs produzidas pelo metabolismo respiratório são geradas por mecanismos dependentes ou independentes da mieloperoxidase (MPO) liberada dos grânulos. Na presença de MPO, o complexo NADPH oxidase catalisa a redução do oxigênio molecular (O_2) formando o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que é então convertido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por dismutação espontânea (CURNUTTE et al., 1987; WEISS, 1989-b). A MPO catalisa a reação do H_2O_2 em presença de íons haletos para formar ácido hipocloroso, que por sua vez, pode reagir e formar cloro (Cl_2), cujos derivados são altamente tóxicos. O ácido hipocloroso, por exemplo, pode reagir com aminoácidos de microrganismos para formar cloraminas, que se decompõem espontaneamente em: aldeído (RCHO), amônio (NH_4^+), dióxido de carbono (CO_2) e cloreto (Cl^-) (HALLIWELL, 1999; BABIOR, 2000).

Nos mecanismos independentes da MPO, o $O_2^{\bullet-}$ que escapa do fagossomo, é reduzido a peróxido de hidrogênio pela superóxido dismutase (SOD) no citosol e o H_2O_2 é convertido em água pela catalase.

O “burst” respiratório gera duas outras espécies de oxigênio: o radical hidroxil ($\bullet OH$) e o oxigênio singlete (1O_2). O radical hidroxil é formado pela adição de um elétron ao peróxido de hidrogênio. O oxigênio singlete pode ser formado por várias reações como, por exemplo, na dismutação do $O_2^{\bullet-}$. Este radical possui um elétron fora do seu estado fundamental, tornando-o altamente reativo. Quando este elétron volta para o estado fundamental, há liberação de fótons. Esta produção de luz, durante uma reação química, conhecida por quimioluminescência (QL), é uma das características do “burst” respiratório e pode ser um indicador da ativação do metabolismo oxidativo (MARZOCCHI-MACHADO, 2000). A QL é um dos diferentes métodos que podem ser utilizados para avaliar seja qualitativamente ou quantitativamente a produção de EROs por células fagocíticas (ALLEN et al., 1972). No método da QL, marcadores luminescentes (sondas) são utilizados para aumentar a quantidade de luz produzida durante o processo fagocítico. Estas sondas são substâncias orgânicas que servem de substrato para reações redox, que por sua vez, geram produtos eletronicamente excitados capazes de emitir fótons (ALLEN, 1986).

Para amplificar a luminescência, através de uma das sondas utilizadas na QL, o luminol (lum), este, deve ser monoeletronicamente oxidado produzindo um radical, que ao sofrer uma nova oxidação produz um endoperóxido instável. Este endoperóxido se decompõe originando o ânion aminoftalato em estado excitado. A luminescência é produzida quando o ânion

aminoftalato decai ao estado fundamental, emitindo fótons (DAHLGREN; KARLSSON, 1999). Este composto é usado para medir a produção de diversas EROs, com maior sensibilidade para aquelas produzidas pelo sistema da mieloperoxidase.

A lucigenina é outro composto utilizado no método da QL, que é capaz de medir a produção de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Este radical é a primeira espécie reativa de oxigênio formada no metabolismo oxidativo, através da redução do oxigênio molecular pelo sistema da NADPH oxidase (VAN DYKE; CASTRANOVA, 1987).

Os processos de ativação celular, fagocitose e “burst” oxidativo de PMN constituem importantes mecanismos de resistência a agentes patogênicos. No entanto, eles podem também estar envolvidos em lesões teciduais, conforme observado em doenças inflamatórias como a síndrome da angústia respiratória do adulto, infecção bacteriana e artrite reumatóide (COCHRANE et al., 1966; TILL et al., 1982; OHTSU et al., 2000; LALLY, 2005).

Wipke e Allen (2001) utilizando um modelo murino de artrite reumatóide demonstraram a importância dos neutrófilos na iniciação, progressão e manutenção da doença articular. Os autores observaram que o uso do anticorpo monoclonal, para depletar neutrófilos nos animais, bloqueou completamente a resposta inflamatória articular. O tratamento com anticorpo causou rápida e profunda reversão da doença, protegendo os animais da inflamação por períodos de no mínimo sete dias.

Estudos morfológicos têm demonstrado que os PMN do fluido sinovial exibem ativação e desgranulação, como resultado de seu encontro com leucotrieno (LTB_4), proteínas bacterianas, interleucina 8 (IL-8), complexos

imunes (IC), componentes do complemento, citocinas e outros estímulos inflamatórios (KELLER et al., 1983; HAYASHI et al., 1984; SHERRY et al., 1988; KOOPMAN, 2001).

Evidências experimentais demonstram que o ânion $O_2^{\bullet-}$ e outros produtos tóxicos são gerados por neutrófilos estimulados e estão envolvidos no dano tecidual na AR. No fluido sinovial das articulações reumatóides a presença de imunocomplexos, fatores reumatóides e citocinas pode resultar na liberação do conteúdo granular dos neutrófilos e na formação dos metabólitos tóxicos por essas células (CURNUTTE et al., 1987; WEISS, 1989).

Para desempenhar suas funções, os neutrófilos podem ser ativados por uma variedade de agentes solúveis e particulados, revestidos ou não por proteínas do hospedeiro. Durante o processo de fagocitose, os receptores CR1 e CR3 presentes nas membranas dos neutrófilos se ligam aos fragmentos do sistema complemento C3b e C3bi. A opsonização do IC por fragmentos de C3 facilita a fagocitose, a desgranulação e aumenta o “burst” oxidativo de neutrófilos (LUCISANO; MANTOVANI, 1988; VIDARSSON; WINKEL, 1998), sugerindo um sinergismo de receptores CR e $Fc\gamma R$. Além disso, disfunções mediadas por CR em cooperação ou não com $Fc\gamma R$, herdadas ou adquiridas, podem contribuir para a susceptibilidade à doenças e para mecanismos de lesão tecidual além de diminuir a fagocitose (COLTEN; ROSEN, 1992; van der POL W-LUDO; van de WINKEL, 1998; HONDA, 2006).

Os receptores Fc gama ($Fc\gamma R$) foram descritos inicialmente como glicoproteínas de membrana, sendo posteriormente identificadas formas solúveis destas moléculas em alguns fluidos biológicos (revisado por GALON et al., 1995 e DÄERON, 1997). Três classes de receptores para IgG humana-

Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) e Fc γ RIII (CD16)- têm sido descritas (revisado por RASCU et al., 1997). Estas moléculas são membros da super família do gene das imunoglobulinas e compartilham motivos (“motifs”) estruturais de dois ou três domínios imunoglobulina-semelhante (“Ig-like”) na região extracelular e diferem, principalmente, nas regiões transmembrana e citoplasmática. Fc γ RII e Fc γ RIII apresentam várias isoformas: Fc γ RIIa, Fc γ RIIb e Fc γ RIIc; Fc γ RIIIa e Fc γ RIIIb (KIMBERLY; SALMON; EDBERG, 1995).

Os neutrófilos expressam constitutivamente Fc γ RIIa e Fc γ RIIIb, mas podem ser induzidos, por interferon (IFN)- γ e fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), à expressão do Fc γ RI. A isoforma Fc γ RIIa (CD32) é uma proteína com domínio extracelular no qual liga-se a IgG, e domínios transmembrana e citoplasmático, sendo que este último apresenta um seqüência efetora para ativação celular, chamada ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*). O Fc γ RIIIb é uma proteína monomérica ligada à superfície celular por uma âncora de glicosil fosfatidil inositol (GPI) (LÖFGREN et al., 1999; RAVETCH; BOLLAND, 2001; SONDERMANN; KAISER; JACOB, 2001).

Alguns autores mostram que o Fc γ RII é responsável pela ativação do metabolismo oxidativo e desgranulação (HUIZINGA et al., 1989; CROCKETT-TORABI; FANTONI, 1990), enquanto outros sugerem que o Fc γ RIII é capaz de mediar somente a desgranulação (HUIZINGA et al., 1990) e incapaz de promover a ativação celular. No entanto, a interação de um ligante pode permitir o “cross-linking” do Fc γ RIII com o Fc γ RII e iniciar a sinalização intracitoplasmática (HUIZINGA et al., 1989; ANDERSON et al., 1990).

O metabolismo oxidativo, mediado por Fc γ RIIa, leva à ativação das principais vias bioquímicas descritas para a sinalização celular; como o aumento da concentração de Ca²⁺ intracelular, a ativação da proteína quinase C (PKC) e a ativação da via *ras*, que atinge o núcleo onde a transcrição de vários genes pode ser estimulada. A ação coordenada destes componentes inicia numerosos eventos intracelulares, levando ao rearranjo do citoesqueleto-actina, internalização das partículas e liberação de mediadores. A ativação da PKC leva à fosforilação do componente citoplasmático da NADPH oxidase, que é a primeira enzima a ser ativada no “burst” oxidativo, como já mencionado. Embora não possua a região transmembrana e a citoplasmática, a ativação de Fc γ RIIIb em neutrófilos induz a liberação intracelular de cálcio, polimerização de F-actina e a produção de EROs (RAVETCH; BOLLAND, 2001).

A importância do papel dos Fc γ Rs na patogênese da AR é demonstrada através de estudos sobre a presença de polimorfismos nos receptores Fc γ R . NIETO et al. (2000) demonstraram que variantes alélicas associadas ao Fc γ RIIIa estão relacionadas com suscetibilidade a AR. O envolvimento de Fc γ RII nas doenças auto-imunes, e particularmente, nos polimorfismos alélicos de Fc γ RIIc foram descritos como uma possível ligação com severidade da AR em humanos (van de VELDE et al., 2006; BOROSS; VERBEEK, 2006; STEWART-AKERS et al., 2004).

A presença de polimorfismos nos Fc γ R também foi relacionada à eficiência do tratamento da AR. TUTUNCO et al. (2005), através de análise por PCR de DNA extraído do sangue periférico de pacientes com artrite, concluíram que o polimorfismo de Fc γ RIIIa pode afetar o resultado do tratamento com agentes bloqueadores de TNF- α . Recentemente, outro grupo

de estudo (KASTBOM et al., 2007), apresentou na literatura dados controversos de um estudo em 282 pacientes tratados com drogas anti-reumáticas bloqueadoras de TNF- α , onde o polimorfismo do receptor Fc γ R11a não influenciou, clinicamente, a eficácia do tratamento para AR.

BELOSTOCKI et al. (2005) observaram em culturas de PMN de pacientes com AR que Fc γ R11a, o principal receptor fagocítico expresso em neutrófilos humanos, pode ser um alvo para modular a terapia com TNF- α . Modelos animais também têm auxiliado na compreensão da participação dos receptores Fc γ (CAMPBELL et al., 2000; BRAND et al., 2003; KANNAN et al., 2005).

Assim como os receptores Fc γ para IgG, os receptores para produtos ativos do sistema complemento (CR) apresentam funções relevantes na fagocitose. A opsonização de microrganismos, partículas ou complexos imunes (IC), pela ligação de proteínas do complemento a estas superfícies, facilita a fagocitose através da ligação de receptores específicos para estas proteínas. Existem vários tipos de receptores CR expressos na membrana de neutrófilos, sendo o receptor para complemento tipo 1 (CR1/CD35) e tipo 3 (CR3/CD11b/CD18; Mac-1), os mais relevantes quando se refere às funções destas células (SENGELØV, 1995).

Os receptores CR1 presentes em neutrófilos são responsáveis pela aderência de partículas revestidas por C3b, sem iniciar a fagocitose. Por outro lado, a ativação simultânea de CR1 e Fc γ R, por partículas revestidas por C3b e IgG, leva ao aumento da liberação intracelular de cálcio e da fagocitose, quando comparada a esses eventos mediados apenas por Fc γ R (ERNST; ROSALES; ZIMMERLI, 1995).

Os receptores CR3 (CD11a/CD18) pertencem à família das β -2 integrinas, que consiste de mais 2 outros heterodímeros não-covalentemente ligados (CD11b/CD18, CD11c/CD18). Todas essas integrinas são expressas em neutrófilos, sendo CD11b/CD18 a mais abundante (LÖFGREN et al., 1999). A ativação específica de CR3 induz atividade da fosfolipase D, polimerização de actina e produção intracelular de EROs. O CR3 interage com Fc γ RIIIb, acentuando a sinalização interna mediada por esses receptores (ZHOU; BROWN, 1994; SENDELØV, 1995).

A ativação de neutrófilos através de receptores Fc γ R, em sinergismo ou não com receptores CR, promove ainda desgranulação, ativação do metabolismo do ácido araquidônico, produção de LTB₄, indução da produção e liberação de citocinas, aumento da expressão de enzimas como a cicloxigenase e óxido nítrico sintase (LUCISANO; MANTOVANI, 1984, 1988; ALONSO, 1998; MARZOCCHI-MACHADO et al., 2002; JANCAR; CRESPO, 2005).

A presença de receptores Fc γ R e CR nas membranas dos neutrófilos permite a ligação dessas células a complexos imunes ou imunocomplexos (IC), que são formados pela interação antígeno-anticorpo (ERNST; ROSALES; ZIMMERLI, 1995; LÖFGREN et al., 1999). Os antígenos presentes nesses complexos podem ser provenientes de alimentos, medicamentos e componentes endógenos (auto-antígenos) que se ligam a anticorpos específicos.

A eliminação destes antígenos é essencial para a defesa do hospedeiro, pois impede que eles sejam depositados e causem lesão nos tecidos. Em indivíduos saudáveis, são encontradas pequenas quantidades de IC no soro

que estimulam a fagocitose e eliminação do antígeno por macrófagos do fígado e baço (PASCUAL; SCHIFFERLI, 1992). O aumento da formação de IC facilita a deposição dos mesmos nos tecidos causando lesão, que é mediada pela ativação local do sistema complemento e, subsequente influxo predominante de neutrófilos (WEDMORE; WILLIAMS, 1981).

Os complexos imunes podem se ligar tanto a Fc γ R como a receptores para produtos do complemento. Ambos receptores fazem parte da defesa imune inata e ativam o sistema imune adaptativo.

A expressão de CR1 em leucócitos de pacientes com AR têm sido avaliada (YEN et al., 1990; KUMAR et al., 1994; GOODFELLOW et al., 2000). Os neutrófilos do fluido sinovial de pacientes com AR apresentaram expressão elevada de CR1 em comparação com neutrófilos do sangue periférico dos mesmos pacientes, indicando que esta diferença pode ser explicada devido a um aumento da adesão dos neutrófilos e ativação do complemento no foco inflamatório (JONES et al., 1994).

SADALLAH et al. (1997) relataram que os níveis de CR1 foram diretamente correlacionados com o número total de PMN no FS de pacientes com doenças reumáticas.

Por outro lado, CROCKARD et al. (1992) observaram que a expressão de CR3 foi duas vezes maior que a de CR1 nos neutrófilos do fluido sinovial (FS) de pacientes com artrite reumatóide, embora a expressão dos dois receptores tenha sido maior no FS do que nos neutrófilos do sangue periférico.

Um efeito contraditório de CR1 no modelo K/BxN, em camundongos nocautes para este receptor, foi observado por SOLOMON et al. (2002). Estes

autores sugeriram que a ausência de CR1 não teve nenhuma influência sobre a progressão da doença.

O receptor CR3 faz parte da família das integrinas que participa ativamente dos mecanismos de adesão celular, relacionados a processos fisiológicos e patológicos. NATHAN et al. (1989) demonstraram que a ativação por citocinas não foi capaz de estimular o “burst” oxidativo em PMN, em pacientes que apresentam uma doença genética caracterizada por deficiência da expressão de CR3. A aderência de neutrófilos a proteínas da matriz celular, em resposta a diferentes estímulos, promove a ativação do metabolismo oxidativo destas células (FUORTES et al., 1993). Neutrófilos de camundongos deficientes de CR3 não foram capazes de fagocitar partículas opsonizadas por complemento e apresentaram reduzida produção de EROs, quando comparados aos neutrófilos de animais controles (COXON et al., 1996).

Existem muitas evidências na literatura, baseadas em estudos em modelos animais, onde o uso de anticorpos anti-CR3 diminuiu os danos teciduais observados evidenciando a participação deste receptor, em diferentes patologias (JAESCHKE et al., 1991, 1993; CURTIS et al., 1993; BURCH et al., 1993; ROGERS, et al., 1998). No entanto, não existem muitos estudos em humanos e especificamente na AR, sobre o envolvimento deste receptor (McCARTHY et al., 1992; BANSAL, et al., 2003; HEPBURN et al., 2004; HEPBURN et al., 2006).

O sistema complemento participa dos principais mecanismos efetores da resposta imune humoral (MARZOCCHI-MACHADO, 2000). Este sistema é constituído por proteínas de membrana e séricas, que estão na forma inativa na circulação ou em baixos níveis de ativação espontânea. A ativação do

sistema ocorre de maneira seqüencial, como um efeito cascata, pela clivagem proteolítica de um componente inativo inicial, cujo produto contribui para a proteólise do próximo componente a ser ativado. Estas proteínas participam de diversas funções efetoras como: lise osmótica de células estranhas, fagocitose, quimiotaxia e processamento de imunocomplexos (TOMLINSON, 1993). A cascata de ativação do complemento é controlada por proteínas regulatórias que estão presentes no plasma ou associadas às membranas celulares do hospedeiro (KIRSCHFINK, 1997).

O sistema complemento pode ser ativado por três vias: a via clássica, que é estimulada por anticorpo; a via ativada pela lectina ligante de manana (LLM), que é iniciada pela ligação desta lectina ao grupo manana nos carboidratos das superfícies de bactérias e vírus; e a via alternativa, que pode ser iniciada pela ligação espontânea de um componente ativado do complemento à superfície de um patógeno. Os diferentes componentes de cada uma das vias são ativados para gerar enzimas chamadas C3 convertases. As C3 convertases clivam o C3, produzindo dois fragmentos, C3a e C3b, de tal maneira que as três vias convergem para a clivagem de C3, o componente central do sistema complemento.

A ativação da via clássica é iniciada por imunocomplexos (IC) ou agregados, contendo imunoglobulinas das classes G (IgG) ou M (IgM), ligados a múltiplos sítios em uma superfície ativadora, de um patógeno ou determinadas células. O primeiro componente da via clássica é o C1, que é um complexo molecular formado pelas subunidades C1q, C1r e C1s. A molécula de C1q é responsável pela ligação à imunoglobulina, o que leva à ativação de C1r que determina a clivagem de C1s. O C1s ativado promove a ativação dos

próximos componentes, o C4 e o C2 que uma vez clivados, formam o complexo C4b2a (fragmento ativado) (COOPER, 1985). Este complexo permanece ligado à superfície ativadora e corresponde à C3 convertase da via clássica (OGLESBY et al., 1988; DODDS et al., 1996).

A ativação do sistema complemento pela via da LLM ocorre após a ligação desta lectina à mananas na superfície de patógenos (TURNER, 1996). A LLM possui uma região tipo colágeno, que está associada à serina-proteases denominadas MASP-1 e MASP-2 [serina-protease associada à LLM ou MBL (*mannan-binding lectin*)-associated serine protease]. As MASP1 E MASP2 são similares às subunidades C1r e C1s do complexo C1 da via clássica (TAKAYAMA et al., 1994). Funcionalmente, estas MASP podem clivar C4 e C2, gerando o complexo C4b2a com atividade C3 convertase (MATSUSHITA; FUJITA, 1992).

A via alternativa não depende da presença de imunoglobulinas para ser ativada. O componente C3 é continuamente ativado no plasma, por hidrólise espontânea e gera moléculas chamadas C3(H₂O). Estas moléculas clivam C3 gerando o fragmento C3b que é rapidamente inativado por hidrólise. A ativação da via alternativa é amplificada pela ligação do C3b, gerado pela hidrólise espontânea ou pela via clássica, às proteínas ou carboidratos nas superfícies ativadoras (PANGBURN; MÜLLER-EBERHARD, 1984). As moléculas de C3b depositadas nestas superfícies ligam-se ao fator B, tornando-o suscetível à proteólise pelo fator D, ambas são proteínas da via alternativa. A clivagem do fator B produz dois fragmentos, o Ba e o Bb, que permanece ligado à superfície ativadora como parte do complexo C3bBb (KOLB et al., 1989). Este complexo é estabilizado pela properdina, formando C3bBb, a C3 convertase da via

alternativa. Uma vez formada, esta convertase leva à formação de mais moléculas de C3b, amplificando a cascata de ativação iniciada pela via clássica (MERI; PANGBURN, 1990).

As moléculas de C3b ligam-se às C3 convertases na superfície ativadora e formam um complexo com atividade C5 convertase que cliva C5 em C5a e C5b. O fragmento C5b permanece ligado à membrana ativadora e dá seqüência aos eventos terminais da cascata do complemento, que são comuns para as três vias de ativação. Ocorre a ligação seqüencial de C6, C7, C8 e C9 à superfície ativadora formando o complexo de ataque à membrana (CAM). Este complexo é capaz de formar um poro na superfície ativadora, permitindo a destruição de células ou patógenos (BHAKDI; TRANUM-JENSEN, 1991; ESSER, 1991).

Os fragmentos C3a, C4a e C5a, gerados pela ativação do sistema complemento, medeiam o recrutamento e a ativação de leucócitos nas respostas inflamatórias, sendo que C5a possui maior atividade biológica. Estas anafilatoxinas agem nas paredes dos vasos, aumentando a permeabilidade vascular e permitindo o acúmulo de fluidos e células no local da inflamação (DIAS DA SILVA; LEPOW, 1965, 1967; DIAS DA SILVA et al., 1967; HUGLI, 1986; FRANK; FRIES, 1991).

Um significativo papel para o sistema complemento na patogênese da AR têm sido demonstrado por uma variedade de estudos moleculares (NEUMANN et al., 2002; QUIGG, 2002; SMITH, 2002; LUTZ, et al., 2004). Os componentes C3 e C4 do complemento estão drasticamente reduzidos no fluido sinovial de pacientes com AR, em comparação com o total de proteínas presentes. Os níveis dos produtos pro-inflamatórios ativados do complemento,

C5a e C5b-9, estão significativamente elevados nas articulações reumatóides (SOLOMON et al., 2005). Além disto, são observadas correlações positivas entre a ativação do complemento no fluido sinovial e atividade da doença, e, entre expressão de C2 e C3 na sinóvia reumatóide e inflamação (JARVIS et al., 1993; AGGARWAL et al., 2000). Em adição, estudos têm demonstrado altos níveis de C5a no fluido sinovial (HOGASEN et al., 1995) e a correlação dos níveis de C5a com o número de neutrófilos presentes no fluido sinovial de pacientes com AR (BARRINGTON et al., 2001).

No entanto, ainda não estão bem esclarecidos os mecanismos pelos quais os PMN são ativados nas articulações sinoviais e os fatores que podem estar envolvidos nessa ativação.

Estudos que promovam este entendimento poderão contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para a artrite reumatóide, uma vez que, até o momento, os tratamentos disponíveis apresentam inúmeras reações adversas.

2. Objetivos

Diante da literatura apresentada, a proposição deste trabalho foi realizar um estudo imunoquímico e funcional dos neutrófilos de pacientes com artrite reumatóide em diferentes estágios da doença. Para tanto, estes estudos envolveram:

- a) Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio pelos neutrófilos, por quimioluminescência dependente de luminol e lucigenina. Os neutrófilos foram ativados por diferentes complexos imunes, através da ligação com receptores para IgG (Fc γ RIIa/CD32 e Fc γ RIIIb/CD16, em cooperação ou não com receptores para o Complemento (CR1/CD35 e CR3/CD11a/CD18);
- b) Análise da expressão de receptores para o Complemento (CR1 e CR3) e receptores para IgG em neutrófilos por citometria de fluxo;
- c) Avaliação da atividade lítica do Complemento através das vias clássica/lectina e alternativa, e da habilidade do complemento sérico dos pacientes com AR em promover uma ligação eficiente dos IC aos receptores CR, mediando a resposta do neutrófilo.

3 . Casuística e métodos

Este estudo foi realizado em pacientes com Artrite Reumatóide, diagnosticados conforme os critérios do Colégio Americano de Reumatologia (ARNETT et al., 1988) e provenientes do Ambulatório de Doenças Reumáticas do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto-USP.

Foram avaliados 40 pacientes, sendo que 25 deles apresentavam AR controlada ou inativa e 15 apresentavam AR ativa, segundo avaliação clínica e exames laboratoriais. Foram também avaliados 40 indivíduos saudáveis pareados aos pacientes em termos de sexo, idade e perfil imunogenético. Os pacientes recebiam doses controladas de antiinflamatórios e de imunomoduladores.

Os neutrófilos e o soro dos pacientes com AR e dos indivíduos controle, foram obtidos a partir de amostras de sangue periférico, colhidas na presença ou ausência de anticoagulante, por punção venosa, utilizando-se sistema a vácuo estéril e descartável. Foram colhidos 40 mL de sangue para a realização deste estudo. A colheita foi realizada com consentimento prévio do paciente.

Este trabalho foi submetido à análise do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, que aprovou a realização deste estudo de acordo com o processo HCRP nº 10097/2002 (Anexo A).

3.1. Animais

Nos experimentos propostos, foram utilizadas coelhas adultas jovens de linhagem Nova Zelândia com aproximadamente 3 kg de peso, para a obtenção de soro imune e de eritrócitos para estudos da via alternativa do sistema complemento.

Carneiros adultos machos da linhagem merina foram utilizados para a obtenção dos eritrócitos, utilizados para estudos da via clássica do sistema complemento.

Todos os animais foram provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, onde foram mantidos de acordo com as normas internacionais de uso de animais de laboratórios. Os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (protocolo nº 05.1.1404.53.3) (Anexo B).

3.2. Antígeno

Nos experimentos propostos, foi utilizado como antígeno a albumina de ovo de galinha - ovoalbumina (OVA, sigma A – 5503).

3.3. Imunização dos animais

Imunoglobulinas da classe G (IgG anti-OVA) foram obtidas a partir do soro de coelhas imunizadas com uma solução de antígeno (OVA) 5 mg/mL, emulsionada, volume a volume, com adjuvante completo de Freund [1 parte de

Arlacel A (Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA)] para 9 partes de óleo mineral Nujol (Shering Ploug, Brasil) contendo 1,5 mg/mL de bacilo de Calmett Güerin (Fundação Ataulfo de Paiva, RJ, Brasil). Os animais receberam no dorso 4 injeções subcutâneas de 0,5 mL da suspensão do antígeno, perfazendo um total de 5 mg de antígeno.

Decorridos 30 dias da imunização, os animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina (5 mg/Kg) e ketamina (35 mg/Kg), administrada por via intramuscular (LIPMAN et al., 1990; POPILSKIS et al., 1991; MARINI et al., 1992). O sangue foi colhido para obtenção do soro imune e, logo após o procedimento, os animais foram eutanasiados com injeção intra-cardíaca de cloreto de potássio (50 mg/Kg).

3.4. Obtenção do soro imune de coelhas

O sangue colhido das coelhas foi deixado à temperatura ambiente até a coagulação e, por 1 hora a 37°C para retração e desprendimento do coágulo. Após a retirada do coágulo, o soro foi centrifugado a 755g por 15 minutos a 4°C em centrífuga Sorvall Super Speed RC2-B (Connecticut, USA) para remover as células que não ficaram presas na rede do coágulo. A inativação das proteínas do complemento foi feita deixando o soro por 1 hora a 56°C, durante 30 minutos.

3.5. Preparação dos anticorpos IgG anti-OVA

A precipitação da fração protéica rica em IgG foi feita adicionando-se uma solução saturada de sulfato de amônio ao soro imune total previamente inativado. A concentração final de sulfato de amônio foi de 40% (p/v). Esta suspensão foi mantida a 4°C por 12 horas, e então centrifugada a 3000g por 15 minutos a 4°C. O precipitado foi lavado com uma solução de sulfato de amônio a 40% (p/v), para remover proteínas solúveis adsorvidas e, novamente submetido a 3000g por 15 minutos a 4°C.

A fração precipitada foi solubilizada em PBS pH 7,2 e dialisada contra esta mesma solução, durante 24 horas a 4°C realizando três trocas diárias. Uma última diálise foi feita contra tampão fosfato 0,02 mol/L pH 7,5.

Em seguida esta amostra foi purificada por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE (dietilaminoetil-celulose) (Whatman, Inglaterra), previamente equilibrada com o tampão de eluição (fosfato 0,02 mol/L, pH 7,2).

A eluição da proteína foi acompanhada por leitura espectrofotométrica (DU⁷ - 70 Spectrophotometer – Beckman, Fullerton, USA) em 280 nm. As frações do primeiro pico, correspondentes a IgG, foram reunidas, concentradas e dialisadas contra tampão fosfato 0,02 mol/L pH 7,5. Após as diálises a determinação da concentração protéica foi feita pelo método do microbiureto. As demais proteínas retidas na coluna foram eluídas com o tampão fosfato 0,02 mol/L pH 7,5 contendo 1 mol/L de NaCl.

3.5.1. Identificação dos anticorpos

3.5.1.1. Eletroforese

O suporte utilizado na eletroforese foi gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo LAEMMLI, (1970).

Os géis de empacotamento (4%) e de corrida (10%) foram preparados em tampão tris-HCL 0,5 mol/L pH 6,8 e em tampão tris-HCl 1,5 mol/L pH 8,8, respectivamente. Os géis foram preparados utilizando soluções de acrilamida 30% (p/v)/N-N-metileno bis acrilamida 0,8% (p/v), SDS 10% (p/v), persulfato de amônio 10% (p/v) e como catalisador tetrametilenodiamino (TEMED) 10% (p/v), todos da Pharmacia Biotech Inc. (São Francisco, CA, USA). Os reagentes foram misturados em proporções adequadas e colocados entre duas placas de vidro, de dimensões 8 x 10 cm, separadas por espaçadores de 0,75 mm de espessura.

Para aplicação das amostras nos géis, as mesmas foram diluídas v/v numa mistura de tampão Tris 0,06 mol/L, pH 6,8, SDS 4%, glicerol (20%) e azul de bromofenol e incubadas a 37°C por 30 minutos. O tampão usado na cuba de eletroforese foi o tris-glicina, pH 8,3. Cerca de 30 minutos antes da aplicação das amostras, o sistema foi ligado com uma corrente de 10 mA, para que o tampão pudesse passar por toda a extensão do gel. As amostras de proteínas, bem como os padrões de massa molecular, foram aplicados no gel e, a eletroforese foi desenvolvida sob corrente contínua de 10 mA. A corrida eletroforética foi acompanhada pela migração do corante azul de bromofenol.

O gel foi corado com a mistura Coomassie Brilliant Blue "G" 0,25% (p/v) em metanol 50% (v/v) e ácido acético 7% (v/v) por 1 hora e descorado

com lavagens sucessivas com solução descolorante [(metanol 5% v/v) e ácido acético 7% (v/v)].

O cálculo da massa molecular da amostra de IgG anti-OVA foi realizado através da curva de logaritmo da massa molecular X fator de retenção dos padrões.

3.5.1.2. Imunodifusão

A imunodifusão foi feita em lâmina de vidro revestida com solução de agarose 1,3% (p/v) em PBS, pH 7,2. Seis diluições dos anti-soros (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64), de concentração inicial 19 mg/mL, foram testadas contra uma solução de antígeno 1 mg/mL. Cinco diluições sucessivas desta solução de OVA (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) foram também testadas contra os anti-soros sem diluição. O diluente usado para antígeno e anti-soro foi PBS, pH 7,2.

A lâmina de imunodifusão permaneceu em câmara úmida a temperatura ambiente por 24 a 48 horas para formação das linhas de precipitação do complexo antígeno-anticorpo. Após este período a lâmina foi lavada várias vezes com solução de NaCl 0,15 mol/L e por último com água. A lâmina foi levada à estufa a 37°C por 24 horas e então corada por Coomassie Brilliant Blue "G".

A análise desta placa revelou as melhores diluições a serem utilizadas para preparação da curva de precipitação dos imunocomplexos, a partir da qual se determinou a zona de equivalência do complexo antígeno-anticorpo formado.

3.5.1.3. Determinação da zona de equivalência da reação antígeno-anticorpo

A curva de precipitação dos imunocomplexos preparados com IgG foi construída baseada na imunodifusão segundo OUCHTERLONY, (1958).

A curva de precipitação foi preparada com sete diluições do antígeno a partir de uma solução de OVA 1 mg/mL, incluindo a solução de concentração 1 mg/mL. Cem microlitros de cada uma das diluições do antígeno foram adicionadas a 100 μ L da preparação de anticorpo diluído 1:2. As misturas foram incubadas a 37°C por 1 hora e em seguida, foram mantidas a 4°C durante cerca de 12 horas para formação do complexo antígeno-anticorpo. Estas suspensões foram centrifugadas a 12100g por 15 minutos e lavadas duas vezes com NaCl 0,15 mol/L por centrifugação nas mesmas condições citadas anteriormente.

Os imunocomplexos precipitados foram dissolvidos em 50 μ L de NaOH 0,1 mol/L e o volume elevado para 1 mL com PBS. A dosagem de proteína de cada tubo foi realizada espectrofotometricamente a 280 nm. Os valores obtidos foram utilizados para construção da curva de precipitação dos imunocomplexos, da qual foi obtida a zona de equivalência.

O ponto de precipitação máxima para os complexos de OVA/IgG foi aquele no qual a proporção da solução do Ag/Ac era de 1:8/1:2, respectivamente.

3.6. Preparação dos imunocomplexos (ICs)

Os IC OVA/IgG anti-OVA foram preparados de acordo com a curva de precipitação para a reação antígeno-anticorpo.

Antígeno e anticorpo foram incubados por 1 hora a 37°C e, em seguida, a 4°C por 48 horas. Após este período os IC formados foram centrifugados e lavados duas vezes com PBS pH 7,2, a 12100g por 15 minutos a 4°C. O IC precipitado foi lavado e foi suspenso em NaCl 0,15 mol/L. Após repetir a centrifugação e suspender o precipitado com 1050 µL de PBS 1:10, uma alíquota de 50 µL foi retirada e centrifugada a 12100g por 15 minutos a 4°C. Ao precipitado foi adicionado 50 µL de NaOH 0,1 mol/L e 950 µL de PBS 1:10, para dosagem da proteína por leitura da absorvância em 280 nm.

3.6.1. Opsonização dos ICs

Após preparar e dosar as proteínas do IC-IgG (segundo o item 7), estes foram opsonizados com uma amostra do “pool” SHN ou com soros de pacientes com AR ou ainda, com soros controles (soros de indivíduos saudáveis).

Desta forma, os estímulos para ativação dos neutrófilos foram denominados da seguinte forma:

- ICIgG não opsonizado
- ICIgG opsonizado com “pool” de SHN
- ICIgG opsonizado com soro próprio do paciente com AR ou de seu respectivo controle (soros autólogos)

Para opsonização dos ICs adicionou-se soro diluído 1:2 em tampão diluente para fixação de complemento (CFD) pH 7,2, contendo CaCl_2 0,25 mmol/L, MgCl_2 0,83 mmol/L e gelatina 0,1%, na proporção de 1 μg de IC para 1 mL do soro (GADD; REID, 1981). A mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos, em seguida centrifugada a 12100g, a 4°C, por 10 minutos. O precipitado foi lavado em solução de NaCl 0,15 mol/L e suspenso em solução balanceada de Hank's pH 7,2.

3.7. Fonte de complemento

3.7.1. Soro humano normal

Soro humano normal (SHN) foi obtido a partir de várias amostras de sangue venoso de voluntários saudáveis, que foram reunidas para construir um “pool” de soro. Posteriormente, este “pool” foi aliquotado e as amostras foram mantidas a -70°C até no momento do uso.

3.7.2. Soro humano de artrite reumatóide

Soro humano de Artrite Reumatóide (SHAR) foi obtido a partir de sangue venoso de pacientes diagnosticados no Ambulatório de Doenças Reumáticas da Clínica Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, segundo os critérios do “American College of Rheumatology” (ARNETT et al., 1988).

Os soros de indivíduos saudáveis (controles) foram obtidos na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. Os soros de pacientes com AR e os soros de indivíduos controles foram mantidos a -70°C, até o momento do uso.

3.8. Obtenção de neutrófilos humanos

O sangue total foi centrifugado a 755g por 10 minutos a 4°C. A camada de células sobre as hemáceas, contendo mais de 90% de mononucleares, foi cuidadosamente retirada. Os PMNs foram separados pela adição de uma solução de gelatina 2,5% em NaCl 0,15 mol/L, na proporção de 2 vezes o volume de células. Após incubação a 37°C por 30 minutos, o sobrenadante contendo os granulócitos foi retirado e centrifugado para separar a gelatina. As células foram tratadas segundo a metodologia de LUCISANO; MANTOVANI (1984), para assegurar uma preparação contendo 80-90% de neutrófilos e viabilidade maior que 95%, determinada pela exclusão do corante Azul de Tripan.

3.9. Ensaios para a avaliação do metabolismo oxidativo de neutrófilos

3.9.1. Quimioluminescência dependente de luminol

O “burst” oxidativo dos neutrófilos purificados segundo a técnica descrita no item 9, foi avaliado por ensaio de quimioluminescência (QL) dependente de luminol, de acordo com a metodologia descrita por Cheung et al. (1983). Uma

suspensão de 1×10^6 neutrófilos/mL, em solução de Hank's/gelatina 0,1% pH 7,2 foi incubada com 80 μ g dos diferentes imunocomplexos (IC-IgG, IC-IgG/SHN e IC-IgG/SHAR), na presença de luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona) 10^{-4} mol/L. A produção de EROS medida por QL foi acompanhada em um luminômetro, modelo Auto Lumat LB 953 da EG&G Berthold (Bad Wildbad, Germany), a 37°C por 15 minutos. Como controle destes ensaios, foi medida a produção de QL por neutrófilos em solução de Hank's/gelatina 0,1% pH 7,2 incubados com luminol e na ausência de imunocomplexo.

O registro foi feito em c.p.m (counts per minute) e os resultados foram expressos como o valor da área sob a curva do perfil de quimioluminescência registrado.

3.9.2. Quimioluminescência dependente de lucigenina

Os ensaios de QL foram realizados segundo Cheung et al. (1983). O método consiste em incubar uma suspensão de 1×10^6 neutrófilos/mL em solução de Hank's/gelatina 0,1% pH 7,2 com 80 μ g dos diferentes imunocomplexos (IC-IgG, IC-IgG/SHN e IC-IgG/SHAR, na presença de lucigenina (bis-N-methylacridium nitrato) 10^{-3} mol/L, para uma amplificação da resposta da medida da QL.

O metabolismo oxidativo dos neutrófilos foi medido pela produção de QL dependente de lucigenina que foi acompanhada em luminômetro Auto Lumat LB 953 da EG&G Berthold (Bad Wildbad, Germany), a 37°C por 15 minutos, sendo o registro realizado em c.p.m.

Como controle destes ensaios, foi medida a produção espontânea de QL pelas células. Para isso, a medida da QL foi feita na ausência de estímulo.

Os resultados foram expressos como o valor da área sob a curva do perfil de QL registrado, que representa a quantidade total de radicais superóxido produzida em 15 minutos.

3.10. Quantificação dos receptores para complemento e para Fc γ nos neutrófilos por citometria de fluxo

Amostras de sangue total (100 μ L) de cada indivíduo normal saudável (controle) e de cada paciente com AR ativa e inativa foram utilizadas. Cada amostra foi incubada com anticorpo anti-receptor específico marcado com fluorocromo ou com o anticorpo isotipo controle, para descontar a fluorescência causada pela ligação inespecífica do respectivo isotipo anti-receptor à célula. Após incubação, todas as amostras receberam 2 mL de tampão de lise (Becton & Dickinson), para lisar os eritrócitos e foram mantidas à temperatura ambiente, por 10 minutos, ao abrigo da luz, e, em seguida, centrifugadas a 755g, a 4°C, por 10 minutos. As misturas foram lavadas em 2 mL de PBS/SBF (soro bovino fetal) 2% (v/v)/azida $\pm$ 0,1% pH 7,2 gelado, a 755g, a 4°C, por 10 minutos, e suspensas em 500 μ L de PBS/formol 1% (v/v), para leitura no citômetro de fluxo (MARZOCCHI-MACHADO et al., 2002).

Os anticorpos marcados com FITC (isotiocianato de fluoresceína) ou PE (ficoeritrina) usados foram: IgG1-PE humano anti-Fc γ RIII/CD16 (555407; 3G8; IgG1,k); IgG1-PE humano, isotipo controle para anti-CD16 (555749; MOCPC-21; IgG1,k); IgG2b-FITC humano anti Fc γ RII/CD32 (555448; FLI 8.26; IgG2b,k);

IgG2b-FITC humano isotipo controle para anti-CD32 (555742; 27-35; IgG2b,k); IgG1-PE humano anti-CD11b (CR3; Mac-1 - 555388; ICRF 44; IgG1,k); IgG1-FITC humano anti-CD35 (CR1 - 555452; E11; IgG1,k) e conjugado IgG1-FITC/IgG1-PE, isotipos controles para anti-CD11b e anti-CD35 (349526, Becton Dickinson; San Jose, CA, USA; IgG1,k), respectivamente. Todos os anticorpos foram obtidos da BD PharMingen (San Diego, CA, USA).

As análises foram feitas em um citômetro *FACSort*, *Becton Dickinson*, CA, USA. O citograma bidirecional permitiu distinguir e selecionar a população de neutrófilos analisada. Os resultados foram expressos como mediana da fluorescência /célula determinada em um histograma em escala logaritma e como porcentagem de células fluorescentes na população total.

3.11. Atividade hemolítica do Complemento sérico

Para avaliação da atividade lítica do sistema complemento, foi utilizado soro de voluntários saudáveis e soro de pacientes com AR que permaneceram estocados em freezer -70°C

3.11.1. Via clássica / lectina

3.11.1.1. Complexo eritrócito / anticorpo anti-eritrócito (EA)

O anticorpo anti-estroma de eritrócito de carneiro (hemolisina) foi produzido em coelho e, previamente, titulado para o ensaio da atividade hemolítica. O título deste anticorpo, correspondente à dose mínima hemolítica é 1:100.

Sangue de carneiro colhido, volume a volume, em solução de Alsever pH 6,1, como anticoagulante, foi deixado a 4°C, durante 24 horas. Após este armazenamento, os eritrócitos foram lavados em PBS pH 7,4, a 270g, por 10 minutos, 4 vezes consecutivas e preparada uma suspensão a 10% com densidade ótica de 0,7 no comprimento de onda de 700 nm, quando diluída 40 vezes.

A hemolisina diluída 1:100 em CFD/gel 0,1% (p/v) pH 7,4, foi adicionada, volume à volume, à suspensão de eritrócitos, previamente padronizada. Esta mistura foi mantida a 4°C, por 15 minutos, homogeneizada a cada 5 minutos. A suspensão de eritrócitos revestidos com o anticorpo (EA) foi acertada adequadamente para uma densidade ótica 0,75-0,8 em 700 nm, em tampão CFD/gelatina 0,1%, quando diluída 1,5 vezes.

3.11.1.2. Determinação do T $\frac{1}{2}$

O método consiste basicamente em um ensaio cinético, que permite calcular o tempo requerido para que o complemento sérico promova 50% de lise de uma suspensão de eritrócitos (POLHILL et al., 1978).

Os soros humanos normais (SHN) e soros de pacientes com AR (SHAR) foram preparados em diferentes diluições (1:40 e 1:80) em tampão CFD/gelatina 0,1%, pH 7,2, para a padronização da metodologia.

O ensaio hemolítico consistiu na mistura de 200 µL de cada diluição dos soros e 400 µL da suspensão de eritrócitos (EA), preparada como descrito acima. A mistura foi colocada em espectrofotômetro provido de banho a 37°C. A cinética da lise dos eritrócitos, pelo soro humano, foi monitorada pelo registro da absorbância a 700 nm, por 10 minutos. O tempo requerido para reduzir a

absorbância à metade, ou seja, causar 50% de lise dos eritrócitos ($T_{1/2}$), foi calculado a partir de curvas de lise.

3.11.2. Via alternativa

3.11.2.1. Suspensão de eritrócitos de coelhos

Sangue total de coelho foi colhido, volume a volume, em solução de Alsever pH 6,1, como anticoagulante, por punção venosa. Esta amostra de sangue foi filtrada em gaze estéril e ao filtrado adicionou-se igual volume de TEA (trietanolamina)-EDTA (ácido etileno diamino tetracético) 10 mmol/L, pH 7,4, contendo gelatina 0,1%. A mistura foi incubada a 37°C, por 15 minutos, e em seguida, centrifugada a 480g, por 10 minutos, a 4°C. Os eritrócitos foram acrescidos de tampão TEA-Mg²⁺ 2 mmol/L, pH 7,4 e lavados 3 vezes com este tampão, centrifugando-se a 480g, por 10 minutos, a 4°C.

Os eritrócitos foram suspensos em Alsever e armazenados em geladeira, podendo ser utilizados por até 15 dias. No momento do uso, separou-se 1 mL da suspensão armazenada, lavou-se 2 vezes em tampão TEA-EGTA (ácido etilenoglicol-bis-amino tetracético) 8 mmol/L e Mg²⁺ 2mmol/L, contendo gelatina 0,1% (p/v), a 480g, por 10 minutos, a 4°C. Os eritrócitos foram suspensos no tampão acima e a suspensão foi acertada adequadamente para uma densidade ótica 0,75-0,8 em 700 nm, quando diluída 1,5 vezes.

3.11.2.2. Determinação do $T_{1/2}$

Os soros humanos normais (SHN) e soros de pacientes com AR (SHAR) foram preparados em diferentes diluições (1:12 e 1:15) em tampão TEA-EGTA 8 mmol/L e Mg^{2+} 2 mmol/L, contendo gelatina 0,1%, para a padronização da metodologia.

O ensaio hemolítico consistiu na mistura de 200 μ L de cada diluição dos soros e 400 μ L da suspensão de eritrócitos, preparada como descrito acima. A mistura foi colocada em espectrofotômetro provido de banho a 37°C. A cinética da lise dos eritrócitos, pelo soro humano, foi monitorada pelo registro da absorbância a 700 nm, por 10 minutos. O tempo requerido para reduzir a absorbância à metade, ou seja, causar 50% de lise dos eritrócitos ($T_{1/2}$), foi calculado a partir de curvas de lise.

3.12. Análise dos dados

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando-se os testes não paramétricos de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis, e as correlações utilizando-se o teste de Spearman, sendo considerados significantes os valores de $p < 0,05$.

**AS SEÇÕES DE RESULTADOS, DISCUSSÃO E CONCLUSÕES NÃO
SERÃO DIVULGADAS NO MOMENTO, POR RAZÕES DE PUBLICAÇÃO**

Referências

ABE, T.; TAKEUCHI, T. Rheumatoid arthritis and tumor necrosis factor alpha. **Autoimmunity**, London, v.34, n.4, p.291-303, 2001.

AGGARWAL, A.; BHARDWAJ, A.; ALAM, S.; MISRA, R. Evidence for activation of the alternate complement pathway in patients with juvenile rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, Oxford, v.39, p.189-192, 2000.

AL-BALAGHI, S.; STRÖM, H.; MÖLLER, E. High incidence of spontaneous Ig-producing lymphocytes in peripheral blood and synovial fluid of patients with active seropositive rheumatoid arthritis. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v.16, p.69-76, 1982.

ALBANI, S.; KEYSTONE, E.C.; LEE NELSON, J.; OLLIER, W.E.R.; LA CAVA, A.; MONTEMAYOR, A.C.; WEBER, D.A.; MONTECUCCO, C.; MARTINI, A.; CARSON, D.A. Positive selection in autoimmunity: abnormal immune responses to a bacterial DNAJ antigenic determinant in patients with early rheumatoid arthritis. **Nature Medicine**, New York, v.1, p.448-452, 1995.

ALLEN, R.C.; STJERNHOLM, R.L.; STEELE, R.H. Evidence for the generation of an electronic excitation state(s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.47, n.4, p.679-684, 1972.

ALLEN, R.C. Phagocytic leukocyte oxygenation activities and chemiluminescence: a kinetic approach to analysis. **Methods in Enzymology**, New York, v.133, p.449-493, 1986.

ALONSO, A.; BAYÓN, Y.; MATEOS, J.J.; CRESPO, M.S. Signaling by leukocyte chemoattractant and Fc γ receptors in immune-complex tissue injury. **Laboratory Investigation**, New York, v.78, n.4, p.377-392, 1998.

ANDERSON, C.L.; SHEN, L.; EICHER, D.M.; WEWERS, M.D.; GILL, J.K. Phagocytosis mediated by three distinct Fc gamma receptor classes on human leukocytes. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.171, p.1333-1345, 1990.

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.; MEDSGER JUNIOR, T.A.; MITCHELL, D.M.; NEUSTADT, D.H.; PINALS, R.S.; SCHALLER, J.G.; SHARP, J.T.; WILDER, R.L.; HUNDER, G.G. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, Hoboken, v.31, n.3, p.315-324, 1988.

BABIOR, B.M. Phagocytes and oxidative stress. **American Journal of Medicine**, Marion, v.109, p.33-44, 2000.

BAINTON, D.F.; ULLYOT, J.L.; FARQUHAR, M.G. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.134, p.907-934, 1971.

BANSAL, V.S.; VAIDYA, S.; SOMERS, E.P.; KANUGA, M.; SHEVELL, D.; WEIKEL, R.; DETMERS, P.A. Small molecule antagonists of complement receptor type 3 block adhesion and adhesion-dependent oxidative burst in human polymorphonuclear leukocytes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v.304, n.3, p.1016-1024, 2003.

BARRINGTON, R.; ZHANG, M.; FISCHER, M.; CARROLL, M.C. The role of complement in inflammation and adaptive immunity. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v.180, p.5-15, 2001.

BELOSTOCKI, K.; PARK, M.S.; REDECHA, P.B.; MASUDA, E.; SALMON, J.E.; PRICOP, L. Fc γ RIIA is a target for modulation by TNF α in human neutrophils. **Clinical Immunology**, Orlando, v.117, p.78-86, 2005.

BHAKDI, S.; TRANUM-JENSEN, J. Complement lysis: a hole is a hole. **Immunology Today**, Cambridge, v.12, p.318-320, 1991.

BOROSS, P.; VERBEEK, J.S. The complex role of Fc γ receptors in the pathology of arthritis. **Springer Seminars in Immunopathology**, New York, v.28, p.339-350, 2006.

BORREGAARD, N.; COWLAND, J.B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. **Blood**, New York, v.89, p.3503-3521, 1997.

BRAND, D.D.; KANG, A.H.; ROSLONIEC, E.F. Immunopathogenesis of collagen arthritis. **Springer Seminars in Immunopathology**, New York, v.25, p.3-18, 2003.

BURCH, R.M.; NORONHA-BLOB, L.; BATOR, J.M.; LOWE, V.C.; SULLIVAN, J.P. Mice treated with a leumedin or antibody to Mac-1 to inhibit leukocyte sequestration survive endotoxin challenge. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.150, p.3397-3403, 1993.

CAMPBELL, I.K.; RICH, M.J.; BISCHOFF, R.J.; HAMILTON, J.A. The colony-stimulating factors and collagen-induced arthritis: exacerbation of disease by MCSF and requirement for endogenous M-CSF. **Journal of Leukocyte Biology**, Bethesda, v.68, p. 144-150, 2000.

CHEUNG, K.; ARCHIBALD, A.C.; ROBINSON, M.F. The origin of chemiluminescence produced by neutrophils stimulated by opsonized zymosan. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.130, n.5, p.2324-2329, 1983.

COCHRANE, C.G.; AIKIN, B.S. Polymorphonuclear leukocytes in immunologic reactions. The destruction of vascular basement membrane *in vivo* and *in vitro*. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.124, n.4, p.733-752, 1966.

COLTEN, H.R.; ROSEN, F.S. Complement deficiencies. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v.10, p.809-834, 1992.

CONSALTER, A.; CICONELLI, R. Epidemiologia e etiologia da artrite reumatóide. **Sinopse de Reumatologia**, São Paulo, v.2, p.34-38, 2005.

COSSERMELLI, W. **Terapêutica em reumatologia**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 1287 p.

CROCKARD, A.D.; THOMPSON, J.M.; McBRIDE, S.J.; EDGAR, J.D.; McNEILL, T.A.; BELL, A.L. Markers of Inflammatory activation: upregulation of complement receptors CR1 and CR3 on synovial fluid neutrophils from patients with inflammatory joint disease. **Clinical Immunology and Immunopathology**, Orlando, v.65, n.2, p.135-142, 1992.

CROCKETT-TORABI, E.; FANTONE, J.C. Soluble and insoluble immune complexes activate human neutrophil NADPH oxidase by distinct Fc γ receptor-specific mechanisms. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.145, n.9, p.3026-3032, 1990.

CROSS, A.; BAKSTAD, D.; ALLEN, J.C.; THOMAS, L.; MOOTS, R.J.; EDWARDS, S.W. Neutrophil gene expression in rheumatoid arthritis. **Pathophysiology**, New York, v.12, p.191-202, 2005.

COOKE, W. E.; PONDER, E. **The polynuclear count**. London: Griffin, 1927.

COOPER, N.R. The classical complement pathway. Activation and regulation of the first complement component. **Advances in Immunology**, New York, v.37, p.151-216, 1985.

COXON, A.; RIEU, P.; BARKALOW, F.J.; ASKARI, S.; von ADRIAN, U.H.; ARNAOUT, M.A.; MAYADAS, T.N. A novel role for the α 2 integrin, CD11b/CD18, in neutrophil apoptosis: a homeostatic mechanism in inflammation. **Immunity**, Cambridge, v.5, p.653-666, 1996.

CURNUTTE, J.T.; BABIOR, B.M. **Advances in human genetics**. New York: Plenum Publishing, 1987. 229 p.

CURTIS, W. E.; GILLINOV, A. N.; WILSON, I. C.; BATOR, J. N.; CAMERON, D. E.; GARDNER, T. J. Inhibition of neutrophil adhesion reduces myocardial infarct size. **Annals of Thoracic Surgery**, Worcester, v.56, p.1069-1072, 1993.

DAËRON, M. Fc receptor biology. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v.15, p.203-234, 1997.

DAHLGREN, C.; KARLSSON, A. Respiratory burst in human neutrophils. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v.232, n.1/2, p.3-14, 1999.

DE CLERCK, L.S.; DE GENDT, C.M.; VAN OSSELAER, N.; STEVENS, W.J. Expression of neutrophil activation markers and neutrophil adhesion to chondrocytes in rheumatoid arthritis patients: relationship with disease activity. **Research in Immunology**, Amsterdam, v.146, n.2, p.81-87, 1995.

DIAS DA SILVA, W.; LEPOW, I.H. Anaphylatoxin formation by purified human C'1 esterase. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.95, p.1080-1089, 1965.

DIAS DA SILVA, W.; LEPOW, I.H. Complement as a mediator of inflammation. II. Biological properties of anaphylatoxin prepared with purified components of human complement. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.125, p.921-946, 1967.

DIAS DA SILVA, W.; EISELE, J.W.; LEPOW, I.H. Complement as a mediator of inflammation. III. Purification of the activity with anaphylatoxin properties generated by induction of the first four components of complement and its identification as a cleavage product of C'3. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.126, p.1027-1048, 1967.

DODDS, A.W.; XIANG-DONG, R.; WILLIS, A.C.; LAW, S.K.A. The reaction mechanism of the internal thioester in the human complement component C4. **Nature**, London, v. 379, p. 177-179, 1996.

DREJA, H.; ANNENKOV, A.; CHERNAJOVSKY, Y. Soluble complement receptor 1 (CD35) delivered by retrovirally infected syngeneic cells or by naked DNA injection prevents the progression of collagen-induced arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, Hoboken, v.43, n.8, p.1698-709, 2000.

EBRINGER, A; KHALAFPOUR, S.; WILSON, C. Rheumatoid arthritis and *Proteus*: a possible aetiological association. **Rheumatology International**, Berlin, v.9, n.3-5, p. 223-228, 1989.

EDWARDS, C.J.; COOPER, C. Early environmental factors and rheumatoid arthritis. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v.143, p.1-5, 2005.

ERNST, J.D.; ROSALES, J.L.; ZIMMERLI, S. Calcium signaling initiated by CR1 (CD35) cross linking is mediated by phagocyte Fc gamma receptors in cis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.209, n.3, p.1032-1038, 1995.

ESSER, A.F. Big MAC attack: complement proteins cause leaky patches. **Immunology Today**, Cambridge, v.12, p.316-318, 1991.

- FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes and Infection**, Paris, 5, 1317-1327, 2003.
- FELDMANN, M.; BRENNAN, F.M.; MAINIET, R.N. Rheumatoid arthritis. **Cell**, Cambridge, v.85, n.3, p.307-310, 1996.
- FELZMANN, T.; GADD, S.; MAJDIC, O.; MAURER, D.; PETERA, P.; SMOLEN, J.; KNAPP, W. Analysis of function-associated receptor molecules on peripheral blood and synovial fluid granulocytes from patients with rheumatoid and reactive arthritis. **Journal of Clinical Immunology**, New York, v.11, n.4, p.205-12, 1991.
- FRANK, M.M.; FRIES, L.F. The role of complement in inflammation and phagocytosis. **Immunology Today**, Cambridge, v.12, p. 322-326, 1991.
- FUORTES, M.; JIN, W.W.; NATHAN, C. Adhesion-dependent protein tyrosine phosphorylation in neutrophils treated with tumor necrosis factor. **Journal of Cell Biology**, New York, v.120, p.777-784, 1993.
- GADD, K. J.; REID, K.B.M. The binding of complement component C3 to antigen-antibody aggregates after activation of the alternative pathway in human serum. **The Biochem. J. Molec. Asp.**, London, v. 195, p. 471-480, 1981.
- GALLIN, J.I.; SNYDERMAN, R. **Inflammation**: basic principles and clinical correlates. 3.ed. Philadelphia/Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. 1335 p.
- GALON, J.; BOUCHARD, C.; FRIDMAN, W.H.; SAUTÈS, C. Ligands and biological activities of soluble Fc γ receptors. **Immunology Letters**, Amsterdam, v.44, p.175-181, 1995.
- GLOCKER, M.O.; GUTHKE, R.; KEKOW, J.; THIESEN, H.-J. Rheumatoid arthritis, a complex multifactorial disease: on the way toward individualized medicine. **Medicinal Research Reviews**, New York, v.26, n1, p.63-87, 2006.
- GOODFELLOW, R.M.; WILLIAMS, A.S.; LEVIN, J.L.; WILLIAMS, B.D.; MORGAN, B.P. Soluble complement receptor one (sCR1) inhibits the development and progression of rat collagen-induced arthritis. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v.119, p.210-216, 2000.

HAJEER, A.H.; MacGREGOR, A.J.; RIGBY, A.S.; OLLIER, W.E.; CARTHY, D.; SILMAN, A.J. Influence of previous exposure to human parvovirus B19 in explaining susceptibility to rheumatoid arthritis: an analysis of disease discordant twin pairs. **Annals of the Rheumatic Diseases**, London, v.53, n.2, p.137-139, 1994.

HALLIWELL, B. **Free radicals in biology and medicine**. 3.ed. Oxford, Clarendon Press, 1999. 936 p.

HAMPTON, M.B.; KETTLE, A.J.; WINTERBOURN, C.C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood**, New York, v.92, n.9, p.3007-30017, 1998.

HAYASHI, H; HONDA, M.; SHIMOKAWA, Y.; HIRASHIMA, M. Chemotactic factors associated with leukocyte emigration in immune tissue injury: their separation, characterization and functional specificity. **International Review of Cytology**, New York, v.89, p.170-250, 1984.

HEPBURN, A.L.; MASON, J.C.; DAVIES, K.A. Expression of Fc γ and complement receptors on peripheral blood monocytes in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, Oxford, v.43, p.547-554, 2004.

HEPBURN, A.L.; MASON, J.C.; WANG, S.; SHEPHERD, C.J.; FLOREY, O.; HASKARD, D.O.; DAVIES, K.A. Both Fc-gamma and complement receptors mediate transfer of immune complexes from erythrocytes to human macrophages under physiological flow conditions in vitro. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v.146, n.1, p.133-145, 2006.

HOGASEN, K.; MOLLNES, T.E.; HARBOE, M.; GOTZE O.; HAMMER, H.B.; OPPERMANN, M. Terminal complement pathway activation and low lysis inhibitors in rheumatoid arthritis synovial fluid. **Journal of Rheumatology**, Toronto, v.22, p.24-28, 1995.

HOLMES, B.; PAGE, A.R.; GOOD, R.A. Studies of metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocyte function. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 46, p.1422-1432, 1967.

HONDA, Z. Fc γ -and Fc γ -receptor signaling in diseases. **Springer Seminars in Immunopathology**, New York, v.28, p.365-375, 2006.

HONG, J.; OHMURA, K.; MAHMOOD, U.; LEE, D.M.; HOFHUIS, M.F.M.A.; BOACKLE, S.A.; TAKAHASHI, K.; HOLERS, V.; WALPORT, M.; GERARD, C.; EZEKOWITZ, A.; CARROLL, M.C.; BRENNER, M.; WEISSLEDER, R.; VERBEEK, J.S.; DUCHATELLE, V.; DEGOTT, C.; BENOIST, C.; MATHIS, D. Arthritis critically dependent on innate immune system players. **Immunity**, Cambridge, v.16, p.157-168, 2002.

HUGLI, T.E. Biochemistry and biology of anaphylatoxins. **Complement: Laboratory and Clinical Research**, Basel, v.3, p.111-127, 1986.

HUIZINGA, T.W.J.; VAN KEMENADE, F.; KOENDERMAN, L. The 40-kDa Fc γ receptor (Fc γ RII) on human neutrophils is essential for the IgG-induced respiratory burst and IgG-induced phagocytosis. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.142, p.2365-2369, 1989.

HUIZINGA T.W.J.; DOLMAN, K.M.; VAN DER LINDEN, N.J.M. Phosphatidylinositol-linked Fc γ RIII mediates exocytosis of neutrophil granule proteins, but does not mediate initiation of respiratory burst. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.144, p.1432-1437, 1990.

JAESCHKE, H.; FARHOOD, A.; SMITH, C.W. Neutrophil-induced liver cell injury in endotoxin shock is a CD11b/CD18-dependent mechanism. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v.261, p.G1051-G1056, 1991.

JAESCHKE, H.; FARHOOD, A.; BAUTISTA, A.P.; SPOLARICS, Z.; SPITZER, J.J.; SMITH, C.W. Functional inactivation of neutrophils with a Mac-1 (CD11b/CD18) monoclonal antibody protects against ischemia-reperfusion injury in rat liver. **Hepatology**, Baltimore, v.17, p.915-923, 1993.

JANCAR, S.; CRESPO, M.S. Immune complex-mediated tissue injury: a multistep paradigm. **Trends in Immunology**, Oxford, v.26, n.1, p.48-55, 2005.

JARVIS, J.M.; POUSAK, T.; KRENZ, M.; LOBIDZE, M.; TAYLOR, H. Complement activation and immune complexes in juvenile rheumatoid arthritis. **Journal of Rheumatology**, Toronto, v.20, p.114-117, 1993.

JOHNSON, K.J.; VARANI, J.; SMOLEN, J.E. Neutrophil activation and function in health and disease. **Immunology Series**, New York, v.57, p.1-46, 1992.

JONES, J.; LAFFAFIAN, I.; COOPER, A.M.; WILLIAMS, B.D.; MORGAN, B.P. Expression of complement regulatory molecules and other surface markers on neutrophils from synovial fluid and blood of patients with rheumatoid arthritis. **British Journal of Rheumatology**, Oxford, v.33, n.8, p.707-712, 1994.

KABEYA, L.M. **Estudo do efeito modulatório de derivados de 3-fenilcumarina nas funções de neutrófilos estimulados por imunocomplexos e análise da relação estrutura-atividade**. 2006. 192f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

KANNAN, K.; ORTMANN, R.A.; KIMPEL, D. Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. **Pathophysiology**, Amsterdam, v.12, p.167-181, 2005.

KASHTAN, C.E. Diagnosis of Alport syndrome. **Kidney International**, New York, v.66, n.3, p.1290-1, 2004.

KASTBOM, A.; BRATT, J.; ERNESTAM, S.; LAMPA, J.; PADYUKOV, L.; SÖDERKVIST, P.; SKOGH, T. Fc γ receptor type IIIA genotype and response to tumor necrosis factor γ -blocking agents in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, Hoboken, v.56, n.2, p.448-452, 2007.

KELLER, H.U.; TILL, G.O. **Leukocyte locomotion and chemotaxis**. Basel: Birkhauser, 1983.

KIMBERLY, R.P.; SALMON, J.E.; EDBERG, J.C. Receptors for immunoglobulin G: molecular diversity and implications for disease. **Arthritis and Rheumatism**, New York, v.38, p.306-314, 1995.

KIRSCHFINK, M. Controlling the complement system in inflammation. **Immunopharmacology**, Amsterdam, v.38, p.51-62, 1997.

KLARESKOG, L.; PADYUKOV, L.; RÖNNELID, J.; ALFREDSSON, L. Genes, environment and immunity in the development of rheumatoid arthritis. **Current Opinion in Immunology**, London, v.18, p.650-655, 2006.

KOCH, A.E.; KUNKEL, S.L.; HARLOW, L.A.; JOHNSON, B.; EVANOFF, H.L.; HAINES, G.K.; BURDICK, M.D.; POPE, R.M.; STRIETER, R.M. Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v.90, p.722-729, 1992.

KOLB, W.P.; MORROW, P.R.; TAMERIUS, J.D. Ba and Bb fragments of factor B activation: fragment production, biological activities, neoepitope expression and quantification in clinical samples. **Complement and Inflammation**, Basel, v.6, p.175-204, 1989.

KOOPMAN, W.J. **Arthritis and allied conditions**: a textbook of rheumatology. 14.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. 1132 p.

KUMAR, A.; MALAVIYA, A.N.; SRIVASTAVA, L.M. Lowered expression of C3b receptor (CR1) on erythrocytes from rheumatoid arthritis patients. **Immunobiology**, Stuttgart, v.191, p.9-20, 1994.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LALLY, F.; SMITH, E.; FILER, A.; STONE, M.A.; SHAW, J.S.; NASH, G.B.; BUCKLEY, C.D.; RAINGER, G.E. A novel mechanism of neutrophil recruitment in a coculture model of the rheumatoid synovium. **Arthritis and Rheumatism**, Hoboken, v.52, n.11, p.3460-3469, 2005.

LAWRENCE, J.S. **Rheumatism in populations**. London: Heinemann, 1977.

LEE, D. M. Rheumatoid arthritis. **The Lancet**, London, v.358, n.9285, p.903-911, 2001.

LEY, K. Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v.186, p.8-18, 2002.

LIPMAN, N.S.; PHILLIPS, P.A.; NEWCOMER, C.E. A comparison of ketamine/zylazine and ketamine/zylazine/acepromazine anesthesia in the rabbit. **Laboratory Animal Science**, Cordova, v.40, n.4, p.395-398, 1990.

LÖFGREN, R.; SERRANDER, L.; FORSBERG, M.; WILSSON, A.; WASTESON, A.; STENDAHL, O. CR3, Fc γ RIIA and Fc γ RIIIB induce activation of the respiratory burst in human neutrophils: the role of intracellular Ca²⁺, phospholipase D and tyrosine phosphorylation. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1452, n.1, p.46-59, 1999.

LOUZADA JUNIOR, P. **Caracterização dos alelos de histocompatibilidade de classe em indivíduos normais e em pacientes com artrite reumatóide do adulto**. 1997. 168f. Tese (Doutorado em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1997.

LUCISANO, Y.M.; MANTOVANI, B.B. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and IgG. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.132, p.2015-2020, 1984.

LUCISANO, Y.M.; MANTOVANI, B. The role of complement in the stimulation of lysosomal enzyme release by polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgG and IgM. **Immunology**, Oxford, v.65, p.171-175, 1988.

LUTZ, H.U.; STAMMLER, P.; BIANCHI, V.; TRÜEB, R.M.; HUNZIKER, T.; BURGER, R.; JELEZAROVA, E.; SPÄTH, P. Intravenously applied IgG stimulates complement attenuation in a complement-dependent autoimmune disease at the amplifying C3 convertase level. **Blood**, New York, v.103, n.2, p.465-472, 2004.

McCARTHY, D; TAYLOR, M.J.; BERNHAGEN, J.; PERRY, J.D.; HAMBLIN, A.S. Leukocyte integrin and CR1 expression on peripheral blood leukocytes of patients with rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, London, v.51, p.307-312, 1992.

MARINI, R.P.; AVISON, D.L.; CORNING, B.F.; LIPMAN, N.S. Ketamine/zylazine/butorphanol: a new anesthetic combination for rabbits. **Laboratory Animal Science**, Cordova, v.42, n.1, p.57-62, 1992.

MARZOCCHI-MACAHDO, C.M. **Caracterização do Sistema Complemento nas funções efetoras envolvidas no clearance de imunocomplexos, BSA/IgG anti-BSA, no lúpus eritematoso sistêmico**. 2000. Tese (Doutorado em Imunologia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.

MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; ALVES, C.M.O.S.; AZZOLINI, A.E.C.S.; POLIZELLO, A.C.M.; CARVALHO, I.F.; LUCISANO-VALIM, Y.M. Fc γ and complement receptors: expression, role and co-operation in mediating the oxidative burst and degranulation of neutrophils of Brazilian systemic lupus erythematosus patients. **Lupus**, London, v. 11, p. 240-248, 2002.

MATSUSHITA, M.; FUJITA, T. Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in an association with a novel C1s-like serine protease. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.176, p.1497-1502, 1992.

McDERMOTT, M.F.; McDEVITT, H. The immunogenetics of rheumatic diseases. **Bulletin of the Rheumatic Diseases**, New York, v.38, n.1, p.1-9, 1988.

MERI, S.; PANGBURN, M.K. Discrimination between activators and nonactivators of the alternative pathway of complement: regulation via a sialic acid/polyanion binding site on factor H. **Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.87, p.3982-3986, 1990.

MORGAN, B.P.; MARCHBANK, K.J.; LONGHI, M.P.; HARRIS, C.L.; GALLIMORE, A.M. Complement: central to innate immunity and bridging to adaptive responses. **Immunology Letters**, Amsterdam, v.97, p.171-179, 2005.

MULLER-HILKE, B.; MITCHISON, N.A. The role of HLA promoters in autoimmunity. **Current Pharmaceutical Design**, Schiphol, v.12, n.29, p.3743-3752, 2006.

NAGARAJAN, S.; FIFADARA, N.H.; SELVARAJ, P. Signal-specific activation and regulation of human neutrophil Fc γ receptors. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.174, p.5423-5432, 2005.

NATHAN, C.; SRIMAL, S.; FARBER, C.; SANCHES, E.; KABBAAH, L.; ASCH, A.; GAILIT, J.; WRIGHT, S.D. Cytokine-induced respiratory burst of human neutrophils:

dependence on extracellular matrix proteins and CD11/CD18 integrins. **Journal of Cell Biology**, New York, v.109, p.1341-1349, 1989.

NEUMANN, E.; BARNUM, S.R.; TARNER, I.H.; ECHOLS, J.; FLECK, M.; JUDEX, M.; KULLMANN, F.; MOUNTZ, J.D.; SCHÖLMERICH, J.; GAY, S.; LADNER-MÜLLER, U. Local production of complement proteins in rheumatoid arthritis synovia. **Arthritis and Rheumatism**, Hoboken, v.46, n.4, p.934-945, 2002.

NIETO, A.; CALIZ, R.; PASCUAL, M.; MATARAN, L.; GARCIA, S.; MARTIN, J. Involvement of Fc γ receptor IIIA genotypes in susceptibility to rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, Hoboken, v.43, p.735-739, 2000.

OGLESBY, T.J.; ACCAVITTI, M.A.; VOLANAKIS, J.E. Evidence for a C4b binding site on the C2b domain of C2. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.141, p.926-931, 1988.

OHTSU, S.; YAGI, H.; NAKAMURA, M.; ISHII, T.; KABAYA, S.; SOGA, H.; GOTOH, T.; RIKIMARU, A.; KOKUBUN, S.; ITOH, T. Enhanced neutrophilic granulopoiesis in rheumatoid arthritis. Involvement of neutrophils in disease progression. **Journal of Rheumatology**, Toronto, v.27, n.6, p.1341-1351, 2000.

OLIVER, J.E.; SILMAN, A.J. Risk factors for the development of rheumatoid arthritis. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, Stockholm, v.35, p.169-174, 2006.

OPPENHEIM, J. J.; ZACHARIAE, C.O.C.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v.9, p.617-48, 1991.

O'SULLIVAN, S.B.; SCHMITZ, T.J. **Fisioterapia: avaliação e tratamento**. 2.ed., São Paulo: Manole, 1993. 775 p.

OUCHTERLONY, O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. **Progress in Allergy**, Basel, v.15, p.1-78, 1958.

PABER, D.D.; HAYNES, B.F. Leukocyte homing to synovium. **Current Directions in Autoimmunity**, Basel, v.3, p.133-67, 2001.

PANGBURN, M.K.; MÜLLER-EBERHARD, H.J. The alternative pathway of complement. **Spinger Seminars in Immunopathology**, New York, v.7, p.163-192, 1984.

PARHAM, P. **O sistema imune**. Porto Alegre: Artes Médicas, 2001. 372 p.

PASCUAL, M.; SCHIFFERLI, J.A. The binding of immune complexes by the erythrocyte complement receptor 1 (CR1). **Immunopharmacology**, Amsterdam, v.24, n.2, p.101-106, 1992.

POBER, J.S.; COTRAN, R.S. Cytokines and endothelial cell biology. **Physiological Reviews**, Bethesda, v.70, n.2, p.427-52, 1990.

POLHILL JUNIOR, R.B.; PRUITT, K.M.; JOHNSTON JUNIOR, R.B. Kinetic assessment of alternative complement pathway in a hemolytic system. I. Experimental and mathematical analysis. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.121, n.1, p.363-370, 1978.

POPILSKIS, S.J.; OZ, M.C.; GORMAN, P.; FLORESTAL, A.; KOHN, D.F. Comparison of xylazine with tiletamine-zolazepam (Telazol) and zylazine-ketamine anesthesia in rabbits. **Laboratory Animal Science**, Cordova, v.41, n.1, p.51-53, 1991.

QUIE, P.G.; WHITE, J.G.; HOLMES, B.; GOOD, R.A. In vitro bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes: diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v.46, n.4, p.668-679, 1967.

QUIGG, R.J. Use of complement inhibitors in tissue injury. **Trends in Molecular Medicine**, Oxford, v.8, n.9, p.430-436, 2002.

QUINN, M.T.; GAUSS, K.A. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocytose oxidases. **Journal of Leukocyte Biology**, Bethesda, v.76, p.760-781, 2004.

RASCU, A.; REPP, R.; WESTERDAAL, N.A.C.; KALDEN, J.R.; VAN DE WINKEL, J.G.J. Clinical relevance of Fc γ receptor polymorfisms. **Annals of The New York Academy of Sciences**, New York, v.815, p.282-295, 1997.

- RAVETCH, J.V.; BOLLAND, S. IgG Fc receptors. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v.1, p.275-290, 2001.
- RINDFLEISCH, J.A.; MULLER, D. Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis. **American Family Physician**, Kansas City, v.72, n.6, p.1037-1047, 2005.
- ROGERS, C.; EDELMAN, E.R.; SIMON, D.I. A monoclonal antibody to the α 2-leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) reduces intimal thickening after angioplasty or stent. Implantation in rabbits. **Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.95, p.10134-10139, 1998.
- ROOS, D.; VAN BRUGGEN, R.; MEISCHL, C. Oxidative killing of microbes by neutrophils. **Microbes and Infection**, Paris, v.5, p.1307-1315, 2003.
- ROSSI, F. The O_2^- forming NADPH oxidase of the phagocytes: nature, mechanisms of activating and function. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.853, p.65-89, 1986.
- SADALLAH, S.; LACH, E.; LUTZ, H.U.; SCHWARZ, S.; GUERNE, P.A.; SCHIFFERLI, J.A. CR1, CD35 in synovial fluid from patients with inflammatory joint diseases. **Arthritis and Rheumatism**, Hoboken, v.40, n.3, p. 520-526, 1997.
- SALTER, R.B. **Distúrbios e lesões do sistema músculo-esquelético**. 2.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1985. 556 p.
- SEGAL, A.W.; ABO, A. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 18, p.43-47, 1993.
- SEGAL, A.W. How neutrophils kill microbes. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v.23, p.197-223, 2005.
- SELDIN, M.F. et al. The genetics revolution and the assault on rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, Hoboken, v.42, p.1071-1079, 1999.
- SENGELØV, H. Complement receptors in neutrophils. **Critical Reviews in Immunology**, Boca Raton., v.15, n.2, p.107-131, 1995.

SHEPPARD, F.R.; KELHER, M.R.; MOORE, E.E.; McLAUGHLIN, N.J.D.; BANERJEE, A.; SILLIMAN, C.C. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. **Journal of Leukocyte Biology**, Bethesda, v.78, p.1025-1042, 2005.

SHERRY, B.; CERAMI, A. Cachectin/tumor necrosis factor exerts endocrine, paracrine and autocrine control of inflammatory responses. **Journal of Cell Biology**, New York, v.107, n.4, p.1269-1277, 1988.

SHIINA, T.; INOKO, H.; HULSKI, J.K. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v.64, n.6, p.631-649, 2004.

SMITH, R.A.G. Targeting anticomplement agents. **Biochemical Society Transactions**, Essex, v.30, p.1037-1041, 2002.

STEWART-AKERS, A.M.; CUNNINGHAM, A.; WASKO, M.C.; MOREL, P.A. Fc gamma R expression on NK cells influences disease severity in rheumatoid arthritis. **Genes and Immunity**, Houndmills, v.5, p.521-529, 2004.

SILMAN, A.J.; MacGREGOR, A.J.; THOMSON, W.; HOLLIGAN, S.; CARTHY, D.; FARHAN, A.; OLLIER, W.E. Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. **British Journal of Rheumatology**, Oxford, v.32, n.10, p.903-907, 1993.

SKARE, T. L. **Reumatologia: princípios e prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 341 p.

SOLOMON, S.; KOLB, C.; MOHANTY, S.; JEISY-WALDER, E.; PREYER, R.; SCHOLLHORN, V.; IIIGES, H. Transmission of antibody-induced arthritis is independent of complement component 4 (C4) and the complement receptors 1 and 2 (cd21/35). **European Journal of Immunology**, Weinheim, v.32 p.644-651, 2002.

SOLOMON, S.; KASSAHN, D.; IIIGES, H. The role of the complement and the Fc γ R in the pathogenesis of arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, London, v.7, n.4, p.129-135, 2005.

SONDERMANN, P.; KAISER, J.; JACOB, U. Molecular basis of immune complex recognition: a comparison of Fc-receptor structures. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 309, p. 737-749, 2001.

SPECTOR, T. D. Rheumatoid arthritis. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v.16, p.513-37, 1990.

TAK, P.P.; ZVAIFLER, N.J.; GREEN, D.R.; FIRESTEIN, G.S. Rheumatoid arthritis and p53: how oxidative stress might alter the course of inflammatory diseases. **Immunology Today**, Cambridge, v.21, p.78-82, 2000.

TAKAYAMA, Y.; TAKATA, F.; TAKAHASHI, A.; KAWAKAMI, M. A 100-kDa protein in the C4-activating component of Ra-reactive factor is a new serine protease having module organization similar to C1r and C1s. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.152, p.2308-2316, 1994.

TILL, G.O.; JOHNSON, K.J.; KUNKEL, R.; WARD, P.A. Intravascular activation of complement and acute lung injury: dependency on neutrophils and toxic oxygen metabolites. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v.69, n.5, p.1126-35, 1982.

TOMLINSON, S. Complement defense mechanisms. **Current Opinion in Immunology**, London, v.5, p.83-89, 1993.

TORRES, T.M.; CICONELLI, R. Medidas de avaliação em artrite reumatóide. **Sinopse de Reumatologia**, São Paulo, v.2, p.49-53, 2005.

TORSTEINDOTTIR, I.; ARVIDSON, N.G.; HALLGREN, R.; HAKANSSON, L. Enhanced expression of integrins and CD66b on peripheral blood neutrophils and eosinophils in patients with rheumatoid arthritis, and the effect of glucocorticoids. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v.50, n.4, p.433-439, 1999.

TURNER, M.W. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. **Immunology Today**, Cambridge, v. 532, p. 532-540, 1996.

TUTUNCO, Z.; KAVANAUG, A.; ZVAIFLER, N.; CORR, M.; DEUTSCH, R.; BOYLE, D. Fc γ receptor type IIIA polymorphisms influence treatment outcomes in patients with inflammatory arthritis treated with tumor necrosis factor γ -blocking agents. **Arthritis and Rheumatism**, Hoboken, v.52, n.9, p.2693-2696, 2005.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Tarrytown, v.39, p.44-84, 2007.

VAN DER POL, W.; VAN DE WINKEL, J.G. IgG receptor polymorphisms: risk factor for disease. **Immunogenetics**, Berlin, v.48, n.3, p.222-232, 1998.

VAN DE VELDE, N. C.; MOTTRAM, P. L.; HOGARTH, P. M. Fc γ RII and multi-system autoimmune disease. **Springer Seminars in Immunopathology**, New York, v.28, p.329-338, 2006.

VAN DYKE, K.; CASTRANOVA, V. **Cellular chemiluminescence**. Boca Raton, CRC Press, 1987. v.1.

VIDARSSON, G.; VAN DE WINKEL, J.G. Receptor Fc γ and complement receptor-mediated phagocytosis in host defence. **Current Opinion in Infectious Diseases**, Philadelphia, v.11, n.3, p.271, 1998.

WATSON, F.; ROBINSON, J.J.; PHELAN, M.; BUCKNALL, R.C.; EDWARDS, S.W. Receptor expression in synovial fluid neutrophils from patients with rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, London, v.52, p.354-359, 1993.

WEDMORE, C.V.; WILLIAMS, T.J. Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. **Nature**, London, v.289, p.646-650, 1981.

WEISS, S.J. Tissue destruction by neutrophils. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 320, p. 365-76, 1989-b.

WEISMANN, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Bulletin of the New York University Hospital for Joint Disease**, New York, v.64, n.1-2, p.12-15, 2006.

WIPKE, B.T.; ALLEN, P.M. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of murine model of rheumatoid arthritis. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.167, n.3, p.1601-8, 2001.

YEN, J. H.; LIU, H. W.; LIN, S. F.; CHEN, T. P. Erythrocyte complement receptor type 1 in non-SLE rheumatic diseases. **Rheumatology International**, Berlin, v.10, p.71-73, 1990.

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia**: fundamentos e prática. São Paulo: Atheneu, 2004. 1081p.

ZHOU, M.J.; BROWN, E.J. CR3 (Mac-1, alpha M beta 2, CD11b/CD18) and Fc gamma RIII cooperate in generation of a neutrophil respiratory burst: requirement for Fc gamma RIII and tyrosine phosphorylation. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 125, p. 1407-1416, 1994.