

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - UFC
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

ANA CAROLINE ROCHA DE MELO LEITE

**ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NA MIGRAÇÃO CELULAR
AGUDA NA ARTRITE E PERITONITE INDUZIDAS POR ZYMOSAN OU
LIPOPOLISSACARÍDEO EM MODELOS EXPERIMENTAIS**

**FORTALEZA
2005**

ANA CAROLINE ROCHA DE MELO LEITE

**ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NA MIGRAÇÃO CELULAR
AGUDA NA ARTRITE E PERITONITE INDUZIDAS POR ZYMOSAN OU
LIPOPOLISSACARÍDEO EM MODELOS EXPERIMENTAIS**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha

**FORTALEZA
2005**

L55e Leite, Ana Caroline Rocha de Melo

Estudo da participação do óxido nítrico na migração celular aguda na artrite e peritonite induzidas por zymosan ou lipopolissacarídeo em modelos experimentais / Ana Caroline Rocha de Melo Leite. – Fortaleza, 2005.

69f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha

Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará.
Curso de Pós-graduação em Farmacologia.

1.Artrite. 2. Óxido nítrico. 3. Migração celular. 4. Zymosan. 5. Lipopolissacarídeo. I. Título

CDD 616.722

ANA CAROLINE ROCHA DE MELO LEITE

**ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NA MIGRAÇÃO CELULAR
AGUDA NA ARTRITE E PERITONITE INDUZIDAS POR ZYMOSAN OU
LIPOPOLISSACARÍDEO EM MODELOS EXPERIMENTAIS**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em 20 / 12 / 2005

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha (orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dra. Gerly Anne de Castro Brito
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dra. Gisela Costa Camarão
Universidade Federal do Ceará - UFC

A Deus, ser onipotente e onipresente que nos guia nos caminhos da vida.

A minha família, exemplo de apóio e compreensão a ser seguido.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser a força e o amparo em todos os momentos da vida e por nos mostrar as oportunidades que nos permite a conquista de nossos ideais.

Aos meus pais, Ilsimar e Melo, que sempre depositaram confiança na minha pessoa e que comigo constroem essa caminhada.

A minha irmã, Karine, pelo companheirismo, auxílio, compreensão e confiança nos inúmeros momentos da vida.

Ao meu irmão, Junior, pelo exemplo de dedicação e entusiasmo à docência no “mundo” da Informática.

A minha vovó Anazélia, pela constante torcida.

Ao meu orientador, Dr. Francisco Airton Castro da Rocha, pelo acolhimento e dedicação, por nos despertar para o “mundo” da pesquisa, pelos momentos de descontração e, especialmente, por ser um grande pesquisador.

A professora Gerly Anne de Castro Brito, sempre disposta a nos ajudar.

Ao professor Talapala Govindaswamy Naidu, pelo modelo de docente e por me ensinar os primeiros passos da pesquisa.

A minha amiga e companheira do laboratório LIO, Virgínia, por me ensinar a trilhar o caminho da experimentação científica, pela sua determinação e pela sua divertida companhia.

As amigas do laboratório, Patrícia, Isabele, Marcela e Glorinha, pelas brincadeiras, credibilidade e contribuição na realização desse trabalho.

A colega e amiga Luciana Paim, pelos momentos agradáveis no laboratório e pela sua alegria contagiante.

Aos amigos do laboratório, Rondinelle, Saraiva, Marcus e Bruno, pelo respeito e pela amizade conquistada a cada dia.

Aos amigos da pós-graduação, Palheta Júnior, Renata, Hellíada, Fernandinha, Isabele e Janaína, por compartilharmos momentos de alegria e de tensão.

Aos professores da pós-graduação, pelos conhecimentos transmitidos.

As minhas tias, especialmente a tia Conceição e a tia Verene, pelas orações, carinho e apóio.

A minha querida prima Conceiçãozinha, pela sabedoria, otimismo e pelos inúmeros conselhos.

As minhas grandes amigas e colegas de profissão, Isabelle e Zuíla, pelo constante apóio, confiança e amizade.

A Rose, Aurinha e Silvinha, pela ajuda e pelos inúmeros esclarecimentos prestados.

Ao Júnior e a Febe, pela inquestionável gentileza no fornecimento dos animais.

A Geane e ao Anaézio, pelos serviços prestados ao LIO.

Ao CNPq e a CAPES, pelo apóio financeiro.

RESUMO

O influxo celular (IC) à sinóvia participa na fisiopatologia da artrite reumatóide (AR). Há controvérsias sobre o papel do óxido nítrico (NO) na modulação do influxo de neutrófilos para sítios inflamatórios, seja reduzindo ou estimulando-o. Esse trabalho investigou o efeito de inibidores de óxido nítrico sintase (NOS) sobre o IC agudo em animais submetidos à artrite ou peritonite induzida por zymosan (AZy ou PZy) ou lipopolissacarídeo (ALPS ou PLPS), bem como a participação de leucotrieno B₄ (LTB₄) e da molécula de adesão intercelular -1 (ICAM-1). Ratos Wistar receberam 10-1000 µg de Zy ou 1-10 µg de LPS intra-articular (i.a.). Outros grupos receberam 1 mg de Zy ou 10 µg de LPS intraperitoneal (i.p.). Camundongos selvagens ou geneticamente manipulados (knock out) para ICAM-1 (ICAM-1^{-/-}) receberam 100 µg de Zy i.a. ou i.p. Esquema dos pré-tratamentos (30 minutos antes da artrite ou peritonite): na AZy, L-NAME (1-30 mg/kg; i.p. ou 0,3-1 µmol; i.a), 1400W (1 mg/kg; i.p.) ou Aminoguanidina (Amino) (50 mg/kg; i.p.) em ratos e camundongos receberam L-NAME (3-10 mg/kg; i.p.) ou N^G-nitro-L-arginia (Nitro) (50 mg/kg; i.p.). Na PZy, L-NAME (10-30 mg/kg; s.c. ou i.p.) ou 1400W (1 mg/kg; s.c.) foi administrado em ratos e camundongos receberam L-NAME (30 mg/kg; s.c.) ou Nitro (50 mg/kg; s.c.). Na ALPS, ratos receberam L-NAME (10-30 mg/kg; i.p) e, na PLPS, L-NAME (30 mg/kg; s.c.). Controles receberam veículo (grupos NT). Após o sacrifício, foram quantificados o IC e LTB₄ nos lavados articulares e peritoneais. Na AZy (10-100 µg) em ratos, L-NAME (1-3 mg) reduziu o IC (47,4 - 76,6%), quando comparado aos animais NT (p<0,05). Na AZy 1mg, L-NAME (30 mg), 1400W (1 mg) e Amino (50 mg) diminuíram o IC (57,4%, 74,8% e 76,6%) (p<0,05). L-NAME (0,3 µmol) i.a. também reduziu o IC (85,3%) (p<0,05). Semelhante aos ratos, camundongos pré-tratados com L-NAME (3-10 mg) ou Nitro (50 mg) apresentaram diminuição do IC (67,6%, 53,8% e 39,5%) (p<0,05). Contrariamente, na PZy, L-NAME (10-30 mg) e 1400W (1 mg) aumentaram o IC (566,7%, 495,1% e 470,7%) em ratos e L-NAME (30 mg), em camundongos (155,8%) (p<0,05). Nesses, Nitro aumentou o IC, mas não significativamente (p>0,05). L-NAME (10 mg) i.p. também aumentou o IC (747,6%) (p<0,05). Na ALPS, L-NAME (30 mg) diminuiu o IC nas duas doses de LPS (50,3% e 52,3%) (p<0,05). Na PLPS, L-NAME (30 mg) aumentou o IC (53,4%) (p<0,05). Os inibidores de NOS não alteraram os níveis de LTB₄. Animais ICAM-1^{-/-} artríticos pré-tratados ou não com Nitro apresentaram redução do IC (57,8% ou 32,1%)(p<0,05). Nos ICAM-1^{-/-} com peritonite pré-tratados ou não com Nitro, houve uma redução do IC (9,5% e 22,3%), mas não significativa (p>0,05). O NO, particularmente o produzido pela NOSi, reduz o IC agudo na articulação, enquanto que o incrementa no peritônio. Esse efeito é independente do estímulo, da espécie, da via de administração e da liberação de LTB₄, além de envolver células residentes e/ou migradas. ICAM-1 parece participar do IC nesses modelos, especialmente na artrite, com o NO modulando sua expressão na peritonite.

Palavras-chave: óxido nítrico (NO), neutrófilos, zymosan (Zy), lipopolissacarídeo (LPS), molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e leucotrieno B₄ (LTB₄).

ABSTRACT

Cell influx (CI) to synovium participates in physiopathology of rheumatoid arthritis (RA). There are controversies about the nitric oxide (NO) action in modulation of neutrophil influx to inflammatory sites, with NO decreasing or increasing it. This study investigated the effect of nitric oxide synthase (NOS) inhibitors on acute CI in animals submitted to arthritis or peritonitis induced by zymosan (ZyA or ZyP) or lipopolysaccharide (LPSA or LPSP), and the participation of leukotriene B₄ (LTB₄) and intercellular adhesion molecule - 1 (ICAM-1). Rats Wistar received Zy (10-1000 µg) or LPS (1-10 µg) intraarticular (i.a.). Other groups received Zy (1 mg) or LPS (10 µg) intraperitoneal (i.p.). Wild or ICAM-1-deficient (ICAM-1^{-/-}) mice received Zy (100 µg) i.a. or i.p. Animals were pre-treated (30 minutes before arthritis or peritonitis): in ZyA, rats received L-NAME (1-30 mg/kg; i.p. or 0.3-1 µmol; i.a.), 1400W (1 mg/kg; i.p.) or Aminoguanidine (Amino) (50 mg/kg; i.p.). Mice received L-NAME (3-10 mg/kg; i.p.) or N^G-nitro-L-arginine (Nitro) (50 mg/kg; i.p.). In ZyP, L-NAME (10-30 mg/kg; s.c. or i.p.) or 1400W (1 mg/kg; s.c.) was administrated in rats and mice received L-NAME (30 mg/kg; s.c.) or Nitro (50 mg/kg; s.c.). In LPSA, rats received L-NAME (10-30 mg/kg; i.p.) and, in LPSP, they received L-NAME (30 mg/kg; s.c.). Controls received vehicle (NT groups). After sacrifice, CI was counted and LTB₄ was measured in articular and peritoneal exudates. In ZyA (10-100 µg), L-NAME (1-3 mg) reduced CI (47.4 – 76.6%) as compared to NT animals (p<0.05). In ZyA (1mg), L-NAME (30 mg), 1400W (1mg) and Amino (50 mg) reduced CI (57.4%, 74.8% and 76.6%, respectively) (p<0.05). L-NAME (0.3 µmol) i.a. also reduced CI (85.3%) (p<0.05). Similarly, L-NAME (3-10 mg) or Nitro (50 mg) pre-treated mice showed a CI reduction (67.6%, 53.8% and 39.5%) (p<0.05). In contrast, in ZyP, L-NAME (10-30 mg) and 1400W (1 mg) increased CI (566.7%, 495.1% and 470.7%, respectively) in rats and L-NAME (30 mg) in mice (155.8%) (p<0.05). In mice, Nitro increased CI, but not significantly (p>0.05). L-NAME (10 mg) i.p. also increased CI (747.6%) (p<0.05). In LPSA, L-NAME (30 mg) decreased CI in two LPS doses (50.3% and 52.3%) (p<0.05). In LPSP, L-NAME (30 mg) increased the influx (53.4%) (p<0.05). NOS inhibitors didn't change LTB₄ levels. Arthritic pre-treated or not with Nitro ICAM-1^{-/-} animals showed a CI reduction (57.8% or 32.1%)(p<0.05). In peritonitis, pre-treated or not with Nitro ICAM-1^{-/-} showed a CI reduction (9.5% and 22.3%), but not significantly (p>0.05). NO, especially that produced by iNOS, reduces the acute CI in articulation while increases it in the peritoneum. This effect is independent of stimulus, species, route of administration and LTB₄ liberation. Beyond, it involves resident and/or migrated cells. ICAM-1 appears to participate in CI in these models, especially in arthritis. Besides, NO modulates the expression of ICAM-1 in peritonitis.

Keywords: nitric oxide (NO), neutrophils, zymosan (Zy), lipopolysaccharide (LPS), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and leukotriene B₄ (LTB₄).

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Esquema ilustrativo da síntese de NO pelas isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS), a partir do aminoácido L-arginina e de O ₂ , na presença de NADPH.	16
FIGURA 2- Desenho esquemático das etapas da migração celular numa vênula pós-capilar.	23
FIGURA 3- Efeito do pré-tratamento com L-NAME, 1400W ou Aminoguanidina (Amino) sobre o influxo celular à cavidade articular de ratos na artrite induzida por zymosan (AZy)	35
FIGURA 4- Efeito do pré-tratamento com L-NAME ou Nitro sobre o influxo celular à cavidade articular de camundongos submetidos à indução da artrite por zymosan (AZy)	36
FIGURA 5- Efeito do pré-tratamento local com L-NAME sobre o influxo celular à cavidade articular de ratos submetidos à indução da artrite por zymosan (AZy)	37
FIGURA 6- Efeito do pré-tratamento com L-NAME ou 1400W sobre o influxo celular à cavidade peritoneal de ratos submetidos à indução da peritonite por zymosan (PZy)	38
FIGURA 7- Efeito do pré-tratamento com L-NAME ou Nitro sobre o influxo celular à cavidade peritoneal de camundongos submetidos à indução da peritonite por zymosan (PZy)	39
FIGURA 8- Efeito do pré-tratamento local com L-NAME sobre o influxo celular à cavidade peritoneal de ratos submetidos à indução da peritonite por zymosan (PZy)	40
FIGURA 9- Efeito do pré-tratamento com L-NAME sobre o influxo celular à cavidade articular de ratos submetidos à indução da artrite por LPS (ALPS)	41
FIGURA 10- Efeito do pré-tratamento com L-NAME sobre o influxo celular à cavidade peritoneal de ratos submetidos à indução da peritonite por LPS (PLPS)	42
FIGURA 11- Liberação de leucotrieno B ₄ (LTB ₄) na artrite e peritonite induzidas por zymosan em ratos	43
FIGURA 12- Participação de ICAM-1 sobre o influxo celular à cavidade articular	44

de camundongos submetidos à artrite induzida por zymosan (AZy)

FIGURA 13- Participação de ICAM-1 sobre o influxo celular à cavidade peritoneal de camundongos submetidos à peritonite induzida por zymosan (PZy) 45

LISTA DE ABREVIATURAS

1400W - Dihidroclorato de N-[[3- (aminoetil) fenil] metil] etanimidamida

Amino - Aminoguanidina

AR - Artrite Reumatóide

AZy - Artrite Induzida por Zymosan

Ca²⁺ - Cálcio

fMLP - N-formil-metionil-leucil-fenilalanina

FRDE - Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio

GMPc - Guanilato Monofosfato Cíclico

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio

i.a. - Via Intra-articular

IA - Incapacitação Articular

IC - Influxo Celular

ICAM - Molécula de Adesão Intercelular

i.d. - Via intradérmica

IFN- γ - Interferon γ

I κ B- α - Proteína Inibitória κ B- α

IL - Interleucina

i.p. - Via Intraperitoneal

KC - Quimioatraente Neutrófilico Induzido por Citocina

Knock out - Animais Geneticamente Manipulados

L-NAME - N^G-nitro-L-arginina-metil éster

L-NIL - N-iminoetil-L-lisina

LNMMMA - N^G-monometil-L-arginina

LPS - Lipopolissacarídeo

LTB₄ - Leucotrieno B₄

MNCF - Fator Quimiotático Neutrofílico Derivado de Macrófago

MIP-2 - Proteína Inflamatória de Macrófago-2

NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo-fosfato Reduzida

NF-κB - Fator Nuclear κB

Nitro - N^G-nitro-L-arginina

NO - Óxido Nítrico

NO₂⁻ - Nitrito

NO₃⁻ - Nitrato

NOS - Óxido Nítrico Sintase

NOSe - Óxido Nítrico Sintase Endotelial

NOSi - Óxido Nítrico Sintase Indutível

NOSn - Óxido Nítrico Sintase Neuronal

O₂ - Oxigênio Molecular

O₂⁻ - Ânion Superóxido

PAF - Fator de Ativação Plaquetária

PMNs - Polimorfonucleares

s.c. - Via Subcutânea

TGF-β - Fator de Transformação de Crescimento β

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral α

V-CAM-1 - Molécula de Adesão Celular e Vascular

Zy - Zymosan

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	09
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Óxido nítrico (NO)	15
1.1.1. Conceito	15
1.1.2. Síntese do NO	16
1.2. Artrite reumatóide	17
1.2.1. Definição	17
1.2.2. Etiopatogenia	18
1.2.3. NO nas artropatias infamatórias	18
1.2.4. NO em modelos experimentais de artrite	19
1.2.5. NO em modelo de artrite induzida por zymosan (AZy)	20
1.2.6. NO e modelos experimentais de peritonite	21
1.3. Migração celular	22
1.3.1. Moléculas de adesão intercelular	23
1.3.2. Controle da expressão de moléculas de adesão por NO	25
1.3.3. NO e neutrófilos	26
1.4. Justificativas e objetivos	28
2. MATERIAIS E MÉTODOS	30
2.1. Animais	30
2.2. Soluções, drogas e reagentes	30
2.3. Protocolo experimental	31
2.3.1 Indução da artrite por zymosan (AZy) ou lipopolissacarídeo (ALPS)	31
2.3.2. Coleta do lavado articular	31
2.3.3. Análise da celularidade do lavado articular	32
2.3.4. Indução da peritonite por zymosan (PZy) ou lipopolissacarídeo (PLPS)	32
2.3.5. Coleta do lavado peritoneal	32
2.3.6. Análise da celularidade do lavado peritoneal	33
3. Modulação farmacológica	33
3.1. Inibidores da óxido nítrico sintase	33
4. Análise estatística	34
3. RESULTADOS	35
3.1. Efeito do pré-tratamento com L-NAME, 1400W ou Aminoguanidina sobre o influxo celular à cavidade articular de ratos na artrite induzida por zymosan (AZy)	35
3.2. Efeito do pré-tratamento com L-NAME ou Nitro sobre o influxo celular à cavidade articular de camundongos submetidos à indução da artrite por zymosan (AZy)	36
3.3. Efeito do pré-tratamento local com L-NAME sobre o influxo celular à cavidade articular de ratos submetidos à indução da artrite por zymosan (AZy)	37
3.4. Efeito do pré-tratamento com L-NAME ou 1400W sobre o influxo celular à cavidade peritoneal de ratos submetidos à indução da peritonite por zymosan (PZy)	38

3.5. Efeito do pré-tratamento com L-NAME ou Nitro sobre o influxo celular à cavidade peritoneal de camundongos submetidos à indução da peritonite por zymosan (PZy)	39
3.6. Efeito do pré-tratamento local com L-NAME sobre o influxo celular à cavidade peritoneal de ratos submetidos à indução da peritonite por zymosan (PZy)	40
3.7. Efeito do pré-tratamento com L-NAME sobre o influxo celular na artrite por LPS em ratos (ALPS)	41
3.8. Efeito do pré-tratamento com L-NAME sobre o influxo celular à cavidade peritoneal de ratos submetidos à indução da peritonite por LPS (PLPS)	42
3.9. Liberação de leucotrieno B₄ (LTB₄) na artrite e peritonite induzidas por zymosan em ratos	43
4. Participação de ICAM-1 sobre o influxo celular à cavidade articular de camundongos submetidos à artrite induzida por zymosan (AZy)	44
4.1. Participação de ICAM-1 sobre o influxo celular á cavidade peritoneal de camundongos submetidos à peritonite induzida por zymosan (PZy)	45
4. DISCUSSÃO	46
5. CONCLUSÕES	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1. INTRODUÇÃO

1.1. Óxido nítrico (NO)

1.1.1. Conceito

Identificado como o fator de relaxamento derivado do endotélio (FRDE) liberado em resposta à acetilcolina (Furchgott e Zawadzki, 1980; Palmer et al., 1987; Furchgott, 1988; Ignarro et al., 1988), o óxido nítrico (NO) é um radical livre de meia-vida curta, sintetizado a partir da L-arginina pela óxido nítrico sintase (NOS) (Miyasaka e Hirata, 1997). Caracteriza-se por ser uma molécula diatômica simples, cujas propriedades físico-químicas e biológicas são determinadas pelo seu tamanho reduzido (30Da), ausência de carga e ter um elétron desemparelhado (Butler et al., 1995; Wink et al., 1996).

O NO apresenta alta afinidade pelo ferro hêmico, grupos tiol e sulfidril, ânion superóxido (O_2^-) e oxigênio molecular (O_2) (Jang e Murrell, 1998) e, dependendo da sua concentração e ambiente químico, é rapidamente oxidado a nitritos (NO_2^-) ou nitratos (NO_3^-) pelo oxigênio dos fluidos biológicos (Butler et al., 1995; Wink et al., 1996; Stamler, 1994).

Utilizado como um agente tóxico ou de sinalização entre as células, o NO é um gás sob condições atmosféricas, mas um soluto no interior das células e tecidos, sendo prontamente difusível nos fluidos e tecidos corporais, atravessando livremente as membranas celulares (Butler et al., 1995; Wink et al., 1996; Stamler, 1994; Coleman, 2001). Gerado por muitos tipos celulares em uma diversidade de tecidos, ele age como um relaxante vascular, neurotransmissor e inibidor da agregação plaquetária. Associado a essas funções fisiológicas, participa das respostas inflamatórias e imunes de forma complexa e ainda não completamente definida (Moncada et al., 1991; Coleman, 2001; Sautebin, 2000).

1.1.2. Síntese do NO

A formação de NO é tida como uma via ubíqua, na qual NO e L-citrulina são sintetizados a partir da ação da NOS sobre L-arginina e O₂, em um processo que utiliza elétrons doados pela nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato reduzida (NADPH) (Moncada e Higgs, 1995; Coleman, 2001) (Figura 1).

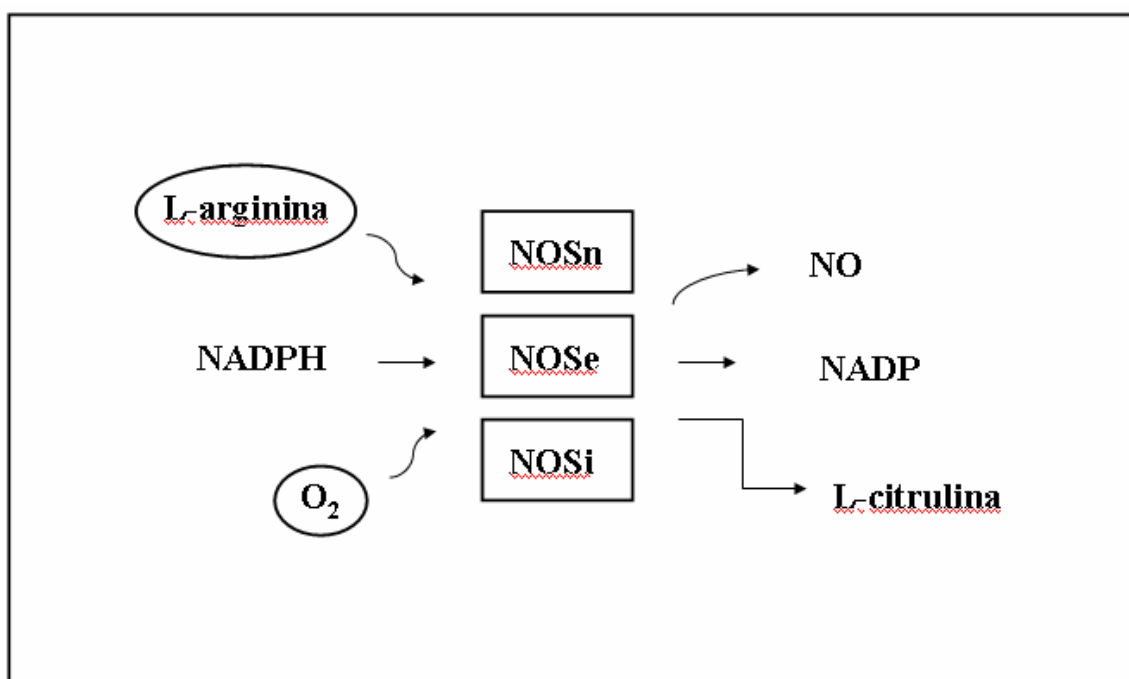


Figura 1- Esquema ilustrativo da síntese de NO pelas isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS), a partir do aminoácido L-arginina e de O₂, na presença de NADPH.

A NOS é uma enzima que se apresenta sob três isoformas: duas formas constitutivas, originalmente caracterizadas em neurônios (NOS neuronal, NOSn ou NOS-1) e em células endoteliais (NOS endotelial, NOSe ou NOS-3), estando presentes em condições fisiológicas, e uma forma induzível, conhecida como NOS induzível, NOSi ou NOS-2. Essa última caracteriza-se pela ausência de expressão em células em repouso, sendo sintetizada em células ativadas (Coleman, 2001).

As isoformas constitutivas participam na regulação da homeostase do fluxo sanguíneo, função plaquetária e transdução de sinais no sistema nervoso central e periférico. A geração de NO por essas enzimas é rápida e transitória, em pequenas quantidades (da ordem de picomoles) e dependente de Ca^{2+} -calmodulina. O NO por elas sintetizado nitrosila a enzima guanilato ciclase solúvel, estimulando a produção de guanilato monofosfato cíclico (GMPc), um efetivo vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária (Förstermann et al, 1986; Arnold et al., 1977; Ignarro, 1991; Murad, 1986; Radomski et al., 1987).

A NOSi é dependente da taxa de renovação enzimática, com atividade Ca^{2+} -independente devido a sua forte ligação com a calmodulina. A produção de NO por essa enzima é prolongada, em maior quantidade (na ordem de nanomoles) e após certo período pós-estímulo. Sua expressão é induzida por lipopolissacarídeo (LPS) e citocinas, particularmente fator de necrose tumoral α (TNF- α), interferon γ (IFN- γ), interleucinas 1 (IL-1) e 2 (IL-2), enquanto o fator de transformação de crescimento β (TGF- β), IL-4, IL-8, IL-10, IL-13 e glicocorticóides podem inibir sua expressão. Muitas células são capazes de expressá-la, tais como: macrófagos, neutrófilos, sinoviócitos, osteoblastos, osteoclastos, condrócitos, células musculares lisas, fibroblastos, dentre outras (Stichtenoth e Frölich, 1998; Stefanovic-Racic et al., 1993; Jang e Murrell, 1998).

1.2. Artrite reumatóide

1.2.1. Definição

A artrite reumatóide (AR) é uma doença inflamatória crônica sistêmica que afeta as articulações, constituindo a mais freqüente artropatia inflamatória crônica em reumatologia. Sua prevalência é de aproximadamente 1% da população mundial,

acometendo principalmente o sexo feminino (Hochberg e Spector, 1990; Markenson, 1991; Spector, 1990).

1.2.2. Etiopatogenia

Estudos têm sugerido a participação de fatores genéticos, ambientais e imunológicos no desenvolvimento da AR (Heliovaara et al., 1993; Karlson et al., 1999; Silman et al., 1996). Sua etiopatogenia é complexa, envolvendo a participação de uma resposta imuno-inflamatória, com a liberação de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas (TNF- α , IL-1, IL-2 e IL-6) e eicosanóides, que contribuem para a perpetuação e progressão da sinovite. De fato, estudos mostraram aumento na produção de citocinas por sinoviócitos e células mononucleares do sangue periférico de pacientes com AR, espontaneamente ou após estímulo *in vitro* (Harris, 1990; Brennan et al., 1992). Além disso, prostaglandinas foram detectadas no líquido sinovial de pacientes com AR e em modelos animais dessa doença, demonstrando sua participação em doenças articulares inflamatórias (Paya et al., 1997).

Associado a essas evidências, tem sido sugerido a participação do NO em artropatias inflamatórias (Stefanovic-Racic et al., 1993; Hobbs et al., 1999; Armour et al., 1999; Pelletier et al., 2000), com a detecção de elevada concentração de nitrito (um produto da oxidação do NO) no plasma e fluido sinovial de pacientes com AR (Farrel et al., 1992; Stichtenoth et al., 1995; Ueki et al., 1996).

1.2.3. NO nas artropatias inflamatórias

Considerando que células residentes articulares, como os sinoviócitos e condrócitos, além de osteoblastos, bem como células inflamatórias presentes em sinovites,

são capazes de liberar NO, quer de forma constitutiva, quer por estímulo de citocinas como TNF e IL-1, o envolvimento desse radical em doenças articulares tem sido sugerido (Stefanovic-Racic et al., 1994; Stichtenoth et al., 1995; Evans e Stefanovic-Racic, 1996).

1.2.4. NO em modelos experimentais de artrite

Os modelos experimentais constituem um importante meio de estudo das patologias humanas, já que dificuldades éticas e técnicas limitam estudos em humanos. Embora não se disponha de uma forma de artrite reumatóide em animais, a maioria dos modelos animais de artrite utilizados atualmente apresentam similaridades com a doença humana, incluindo a hiperplasia sinovial e a lesão da cartilagem articular. Baseado nisso e nas evidências de que o NO participa do desenvolvimento das artropatias inflamatórias, tem sido estudada a participação do NO em modelos experimentais de artrite.

Assim, no modelo de artrite por *Streptococcus*, foi mostrado um aumento na produção de NO e na síntese de NOSi nas sinóvias inflamadas de ratos, bem como uma supressão do edema e do infiltrado articular pelo bloqueio na produção de NO por N^G-monometil-L-arginina (LNMMA) (McCartney-Francis et al., 1993). Ainda, no modelo de artrite por adjuvante, houve uma diminuição no desenvolvimento da artrite nos animais submetidos a inibidores de NOS, N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) ou LNMMA, com a administração de L-arginina revertendo essa diminuição (Oyanagui, 1994; Stefanovic-Racic et al., 1994).

Associado a isso, estudos mostraram também uma diminuição na síntese de colágeno tipo II e de proteoglicanos na cartilagem articular de coelhos, assim como uma redução nessa produção de proteoglicanos em ratos, mediada pelo NO (Taskiran et al., 1994; Jarvinen et al., 1995; Evans e Stefanovic-Racic, 1996). Foi mostrado ainda um aumento na produção de NO, através do aumento da excreção urinária de nitrato e da expressão de NOSi nos tecidos sinoviais, em ratos submetidos à artrite induzida por

colágeno (Cannon et al., 1996), com a administração de inibidores seletivos de NOSi, aminoguanidina ou N-iminoetil-L-lisina (L-NIL), inibindo essa produção (Vermeire et al., 2000).

Apesar das evidências, ainda não está claro a forma de participação do NO na artrite, já que ele parece promover ações pró-inflamatórias (como o aumento da permeabilidade vascular, produção de radicais livres capazes de gerar danos teciduais, indução da ciclooxigenase e de citocinas inflamatórias, dentre outras) (Lander et al., 1993; McInnes et al., 1996), ao mesmo tempo em que parece exercer ações antiinflamatórias, como a inibição da adesão plaquetária e neutrofílica ao endotélio e a redução da migração leucocitária ao sítio inflamado (Kubes et al., 1991; Niu et al., 1994; Victor et al., 2004).

1.2.5. NO em modelo de artrite induzida por zymosan (AZy)

O zymosan (Zy) é um polissacarídeo derivado da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae*. Induz inflamação quando injetado na cavidade peritoneal, pele ou articulações, por mecanismos múltiplos, incluindo ativação da via alternativa do sistema complemento, degranulação de mastócitos e estimulação de macrófagos e neutrófilos na liberação de mediadores inflamatórios (Tadimeti et al., 1994; Ajuebor et al., 1998; Coates e McColl, 2001; Kolaczowska et al., 2001).

A fase aguda da artrite induzida por zymosan (AZy) caracteriza-se pelo aumento da permeabilidade vascular, edema e intenso influxo celular (IC) na cavidade articular, com posterior sinovite progressiva, infiltrado mononuclear e ativação de fibroblastos, assemelhando-se ao *pannus reumatóide* (Gegout et al., 1994). De fato, nosso grupo mostrou, após 21 dias de indução da AZy em ratos, um intenso infiltrado mononuclear, proliferação de fibroblastos, presença de células gigantes, neovascularização, perda de proteoglicanos da cartilagem articular e erosão do osso subcondral (Bezerra et al., 2004). Mostramos também a participação do NO nesse modelo experimental, através do aumento

dos níveis de nitrito nos exsudatos articulares, com o bloqueio dessa participação pela administração de inibidores de NOS, quer inespecíficos, quer seletivos para NOSi, administrados profilática (30 min antes do Zy) ou terapêuticamente (2 horas pós Zy), local ou sistemicamente (Rocha et al., 2002). Posteriormente, mostramos ainda a participação do NO via GMPc sobre o IC e incapacitação articular (IA) na AZy, através da redução significativa desses parâmetros inflamatórios, quando azul de metileno, um inibidor de GMPc, foi administrado localmente (Rocha et al., 2003).

Em face dos resultados obtidos, associado ao seu baixo custo e praticidade, o modelo de artrite induzida por zymosan foi utilizado nesse trabalho para o estudo da participação do NO sobre a migração celular aguda.

1.2.6. NO e modelos experimentais de peritonite

Apesar dos dados apontarem para uma modulação positiva do NO sobre o IC em modelos experimentais de artrite (Mello et al., 1997; Rocha et al., 2003), bolsa de ar (Paya et al., 1997) e asma (Koarai et al., 2000), há evidências na literatura de que o NO é capaz de reduzir a migração neutrofílica em modelos experimentais de peritonite. De fato, a administração de L-NMMA preveniu a diminuição da migração neutrofílica induzida por TNF- α , IL-8 ou fator quimiotático neutrofílico derivado de macrófago (MNCF) na peritonite por tioglicolato (Tavares-Murta et al., 1998). No modelo de sepse por ligação e perfuração do ceco, a administração de um inibidor de NOSi, aminoguanidina (Griffiths et al., 1993), promoveu uma melhora da quimiotaxia de neutrófilos ao foco inflamatório (Benjamim et al., 2000).

Dessa forma, o NO parece modular positivamente a migração de neutrófilos em determinados modelos experimentais, ao mesmo tempo em que parece exercer um papel inibitório em modelos de peritonite.

1.3. Migração celular

A migração celular é um processo complexo dependente das populações celulares envolvidas e de seu estado de ativação, bem como da forma de interação celular com o endotélio, sendo essa última controlada pela expressão de moléculas de adesão e de quimiocinas na superfície endotelial. Conforme Seely et. al. (2003), a migração de células ocorre através de uma seqüência de etapas, assim denominadas: marginação, rolagem e aderência; transmigração através do endotélio (diapedese) e migração nos tecidos intersticiais em direção a um estímulo quimiotáxico (quimiotaxia) (Figura 2).

No fluxo sangüíneo normal, leucócitos encontram-se deslocados em direção ao endotélio devido à disposição dos eritrócitos numa coluna axial central (Schmid-Schonbein et al., 1980). Esse deslocamento, associado a uma redução na velocidade do fluxo sangüíneo pelo aumento da permeabilidade vascular na fase inicial da inflamação, permite que um maior número de leucócitos assumam essa posição periférica, facilitando assim a marginação leucocitária. Posteriormente, leucócitos rolam lentamente sobre o endotélio, aí aderindo transitoriamente (rolagem) e, em seguida, aderem firmemente (aderência). Os leucócitos firmemente aderidos inserem pseudópodos entre as células endoteliais, transpondo as junções interendoteliais e a membrana basal, atingindo o espaço extravascular e dirigindo-se ao foco inflamatório (Seely et al., 2003). Além dessa migração através das junções endoteliais, leucócitos podem migrar para a área inflamada através de vacúolos endoteliais, em um processo ativo que ocorre em tecidos especializados como o cérebro e o timo, com crescentes evidências desse processo em outros tecidos.

Após o extravasamento, leucócitos são atraídos para o sítio inflamatório por um processo de quimiotaxia, definido como uma locomoção orientada ao longo de um gradiente químico. Através de quimiorreceptores localizados na membrana plasmática leucocitária, essas células respondem à quimiotaxia, migrando em direção ao local de maior concentração desses agentes quimiotáxicos (Seely et al., 2003). Dentre as moléculas quimiotáxicas primárias para neutrófilos, eosinófilos e monócitos, destacam-se: produtos

bacterianos; componentes do sistema complemento (C5a e C3a); calicreína e ativador de plasminogênio; fibrinopeptídeos; produtos de degradação da fibrina; produtos da via da lipoxigenase, principalmente leucotrieno B₄ (LTB₄); fatores quimiotáticos de neutrófilo e eosinófilo liberados de mastócitos; fator quimiotático liberado de neutrófilo e, por último, citocinas, particularmente aquelas da família das quimiocinas. Embora não seja quimiotática per se, a histamina pode facilitar a quimiotaxia (McCance e Huether, 1998).

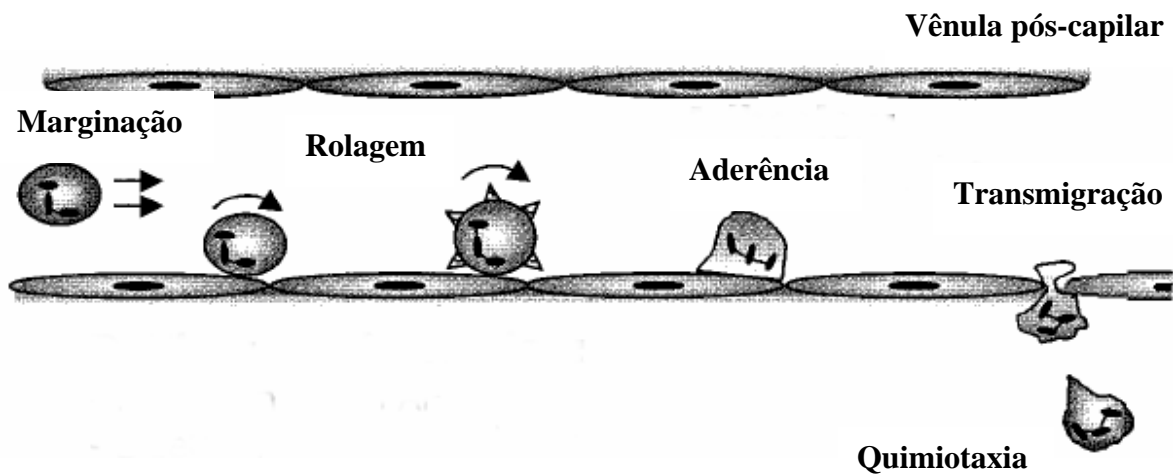


Figura 2- Desenho esquemático das etapas da migração celular numa vênula pós-capilar. Fonte: Hickey, Clinical Science, 2001.

1.3.1. Moléculas de adesão intercelular

As moléculas de adesão intercelular são proteínas de membrana que permitem a interação entre as células. Essas moléculas freqüentemente atravessam a membrana, ligam-se ao citoesqueleto, permitindo que a célula as utilize como meio de tração ou fixação em outras células ou na matriz extracelular.

A aderência e a transmigração leucocitárias, anteriormente descritas, ocorrem por meio da ligação de moléculas de adesão complementares nas superfícies endoteliais e de leucócitos. Essas moléculas permitem a interferência de mediadores químicos, que

modulam a sua expressão e avidéz (Springer, 1994), e são representadas pelas selectinas, imunoglobulinas e integrinas.

As selectinas são moléculas transmembranas que possuem propriedades semelhantes à lectina (razão de sua denominação), ligando-se a açúcares. Elas incluem a E-selectina (presente no endotélio), P-selectina (presente no endotélio e plaquetas) e L-selectina (presente em muitos tipos leucocitários). A ligação das selectinas a seus ligantes reduz a velocidade das células circulantes no interior das vênulas, permitindo que leucócitos recebam sinais de migração do endotélio. Dessa forma, essas moléculas de adesão são responsáveis pela interação inicial e de baixa afinidade entre leucócitos e endotélio, manifestada como comportamento de rolagem (Carvalho et al., 2001).

As imunoglobulinas são representadas pela molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), molécula de adesão intercelular-2 (ICAM-2), molécula de adesão celular e vascular-1 (VCAM-1), dentre outras. Todos os membros dessa família são expressos ou induzíveis no endotélio vascular. De fato, ICAM-1 e VCAM-1 são induzidas por citocinas inflamatórias, enquanto ICAM-2 é constitutivamente expressa, sendo regulada negativamente por citocinas inflamatórias. Essa família de moléculas interage com as integrinas expressas nos leucócitos (Dustin et al., 1988; Staunton et al., 1989; Pober e Cotran, 1990; Seely et al., 2003) e são responsáveis pelas etapas de adesão e transmigração leucocitárias.

As integrinas constituem o principal grupo de moléculas de adesão, presentes em muitas células, inclusive leucócitos. Cada membro dessa família consiste em dois peptídeos α e β ligados não covalentemente, ambos capazes de atravessar a membrana. Apresentam-se divididas em três famílias principais: β_1 -integrinas, envolvidas na ligação das células à matriz extracelular; β_2 -integrinas, envolvidas na adesão dos leucócitos ao endotélio ou a outras células imunes e β_3 -integrinas, envolvidas nas interações das plaquetas e neutrófilos nos sítios inflamatórios ou nos locais de dano vascular (Granger e Kubes, 1994; Seely et al., 2003). Assim como as imunoglobulinas, participam da adesão e transmigração celular.

As β_2 -integrinas consistem de três subunidades α distintas (CD11a, CD11b e CD11c) ligadas a uma subunidade β comum (CD18). Elas são importantes moléculas superficiais presentes em polimorfonucleares e linfócitos, interagindo com células endoteliais, C3bi, microrganismos e matriz extracelular. Polimorfonucleares expressam CD11a/CD18 (LFA-1), CD11b/CD18 (MAC-1 ou CR3) e CD11c/CD18 (p150/95), enquanto linfócitos expressam somente CD11a/CD18 (Arnaout, 1990).

1.3.2. Controle da expressão de moléculas de adesão por NO

Conforme dados da literatura, tem sido mostrado que o NO é capaz de inibir a adesão leucocitária (Kubes et al., 1991; Tsao et al., 1994) através da redução na expressão de moléculas de adesão (CD11b/CD18, L-, P-, E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1) (Lefer e Lefer, 1996; Spiecker et al., 1998; Armstead et al., 1997; Sato et al., 1999; Pruefer et al., 1999). Associado a isso, um estudo mostrou uma diminuição da adesão leucocitária pela inibição de um fator nuclear, o NF- κ B, por NO (Peng et al., 1995). Ativado por inúmeros estímulos, o fator NF- κ B regula inúmeros genes e funções que parecem envolver a participação de espécies reativas de oxigênio (estresse oxidativo) (O'Neill e Kaltschmidt, 1997; Glezer et al., 2000). Encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória (I κ B) que impede a sua translocação para o núcleo e, a posterior, transcrição gênica. Assim, a fosforilação e a degradação do I κ B são necessárias para que ocorra a sua translocação (Baeuerle e Baltimore, 1996; Baldwin, 1996).

Muitas evidências sugerem que o NO modula o I κ B. De fato, foi mostrado que o NO, por permitir a ativação de fosfatases em células mononucleares sangüíneas periféricas, é capaz de inibir NF- κ B por promover a desfosforilação do I κ B. Associado a isso, o NO, ao reagir com o ânion superóxido, pode evitar a formação de peróxido de hidrogênio e, assim, impedir a ativação de NF- κ B (Gaboury et al., 1993; Fraticelli et al., 1996). Ainda, o NO pode em determinadas circunstâncias agir como um antioxidante, como N-acetilcisteína e

ditiocarbonato de pirrolidina, inibindo a ativação de NF- κ B por prevenir a dissociação do complexo NF- κ B/I κ B (Peng et al., 1995).

1.3.3. NO e neutrófilos

Neutrófilos são os primeiros e mais numerosos leucócitos a se dirigirem ao sítio infeccioso ou inflamatório, sendo capazes de promover a fagocitose, liberar grânulos contendo enzimas destrutivas, metabolizar ácido araquidônico e gerar produtos do metabolismo do O₂ e citocinas pró-inflamatórias (Korchak et al., 1984; Beaulieu et al., 1987; Tiku et al., 1986; McColl et al., 1992; Wipke e Allen, 2001). Dessa forma, utilizando-se desses recursos, neutrófilos são capazes de promover a destruição do agente agressor, ao mesmo tempo, em que podem provocar injúria tecidual (Seely et al., 2003). Assim, essas células podem exercer ações contraditórias na defesa do organismo. De fato, estudos têm mostrado a sua participação na patofisiologia de inúmeras doenças, dentre elas às desordens inflamatórias (Bainton, 1992; Gallin, 1992; Armstrong, 2001). Nesse sentido, foi demonstrada uma superprodução de neutrófilos imaturos, apresentando atividade de mieloperoxidase, bem como uma destruição óssea e de fibras colágenas mediada por essas células, na AR (Stavaru et. al., 1999; Nada et al., 1999; Bauerova e Bezek, 1999; Lefkowitz et al., 1999).

Tomando-se como base as evidências de que neutrófilos participam no desenvolvimento de doenças inflamatórias (artrite reumatóide, glomerulonefrite, doença intestinal inflamatória, dentre outras) (Weissmann e Korchak, 1984; Holdsworth e Bellomo, 1984; Wandall, 1985), assim como o NO (artrite reumatóide, sepse e outras) (Stichtenoth et al., 1995; Benjamim et al., 2000), e de que essas células são capazes de produzir NO (McCall et al., 1991), estudos têm investigado a participação do NO sobre a migração neutrofílica em modelos experimentais. De fato, nosso grupo mostrou uma

inibição dose-dependente da migração celular, quando inibidores de NOS (aminoguanidina e L-NAME) foram administrados em ratos submetidos à AZy (Rocha et al., 2003). Resultado semelhante foi obtido em camundongos tratados com 1400W, um inibidor seletivo de NOSi, no modelo de inflamação das vias aéreas (Koarai et al., 2000). Dessa forma, os dados obtidos sugerem uma modulação positiva do NO sobre o influxo celular em modelos experimentais.

Entretanto, conforme descrito anteriormente, no modelo de ligação e perfuração do ceco em camundongos, foi demonstrada uma redução na migração neutrofílica à cavidade peritoneal mediada pelo NO, com o aumento dessa migração quando aminoguanidina foi administrada (Benjamim et al., 2000). De forma semelhante, o NO promoveu uma inibição da migração neutrofílica no modelo de endotoxemia (Tavares-Murta et al., 2001) e sepse induzida por *Staphylococcus aureus* (Crosara-Alberto et al., 2002). Ainda, no modelo de pleurite por carragenina em ratos, foi mostrada uma redução do influxo celular mediado pelo NO (Ialenti et al., 2000). Em um estudo anterior, semelhante inibição foi observada, sendo mediada através da diminuição do ânion superóxido (O_2^-) pelo NO (Kubes et al., 1993). Tomados juntos, esses estudos sugerem uma ação inibidora do NO sobre a migração leucocitária através de mecanismos que interferem na adesão de leucócitos ao endotélio.

De fato, foi sugerido que o NO, ao interagir com o O_2^- liberado pelas células endoteliais, reduz a reação de dismutação sofrida por esse ânion e, portanto, a síntese de peróxido de hidrogênio. Esse é responsável pela adesão leucocitária ao endotélio através da formação do fator de ativação plaquetária (PAF) e aumento da expressão de moléculas de adesão (P-selectinas e ICAM-1). Além disso, o O_2^- estimula a liberação de substâncias pró-adesivas (PAF e citocinas) por mastócitos, aumentando a adesão leucócito-endotélio (Benjamim, 2001).

Associado a isso, estudos em animal “knock out” estão sendo realizados a fim de se observar a participação do NO, especialmente o produzido pela NOSi, na migração neutrofílica. Dessa forma, estudo em camundongos selvagem e “knock out” para NOSi

mostrou um recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ambos animais, com um papel regulatório bifásico da NOSi na migração celular (na 1ª hora pós-estímulo, houve um aumento do influxo celular, com diminuição desse influxo na 2ª-4ª hora em animal “knock out”) (Ajuebor et al., 1998). No entanto, a administração intraperitoneal (i.p.) de carragenina em camundongos deficientes para NOSi aumentou significativamente a migração neutrofilica (4ª hora pós-estímulo), quando comparada aos animais selvagens. (Secco et al., 2003).

Assim, os estudos têm mostrado papéis controversos do NO sobre a migração celular e sugerido que a capacidade desse radical em promover o recrutamento leucocitário, ao mesmo tempo em que reduz a síntese de moléculas de adesão, suprime a ativação celular e induz apoptose em células inflamatórias (Ross e Reske-Kunz, 2001), parece depender de sua concentração. Dessa forma, ainda não está claro o papel do NO nessa migração.

1.4. Justificativas e objetivos

Baseado na importância terapêutica de se prevenir o recrutamento leucocitário em doenças inflamatórias e no papel controverso do NO como modulador desse processo e mediador inflamatório nessas doenças, tem-se a necessidade de se compreender os mecanismos pelos quais o NO age sobre a migração celular em modelos experimentais, buscando-se contribuir com o desenvolvimento de tratamentos que alterem o curso evolutivo dessas patologias.

Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar o papel do NO na migração celular aguda em modelos experimentais de artrite e peritonite induzidas por zymosan ou LPS, em ratos e camundongos, como forma de se avaliar a influência do NO nessa migração sob diferentes tecidos, estímulos inflamatórios e espécies. Por fim, estudamos a liberação de leucotrieno B₄ (LTB₄) e a expressão da molécula de adesão

intercelular-1 (ICAM-1) como possíveis vias de atuação do NO sobre essa migração celular.

Essa participação do NO sobre a migração celular aguda nos modelos experimentais aqui estudados foi investigada através da modulação farmacológica com inibidores da óxido nítrico sintase (NOS), em animais selvagens e geneticamente modificados (knock out) para ICAM-1.

Para tanto, foram realizadas:

- Avaliação do influxo celular na articulação e cavidade peritoneal inflamadas por zymosan ou LPS, em ratos e camundongos;
- Observação do efeito de inibidores de NOS sobre a migração celular na artrite e peritonite induzidas por zymosan ou LPS;
- Investigação dos mecanismos envolvidos nos efeitos dos inibidores de NOS sobre o recrutamento celular nos modelos experimentais aqui estudados através da utilização de animais selvagem e “knock out” para ICAM-1 e dosagem de LTB₄.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Ratos Wistar machos, pesando entre 180 e 200 gramas, e camundongos Swiss machos, pesando entre 25 e 30 gramas, foram utilizados durante a execução do trabalho. Os animais foram fornecidos pelo biotério central do Campus do Pici-UFC e mantidos no biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, em condições controladas de temperatura (21°C), sob um ciclo de claro/escuro de 12/12 horas, com livre acesso à água e alimentação. Todos os procedimentos foram realizados seguindo as diretrizes preconizadas pelo Manual sobre Cuidados e Usos de Animais de Laboratório (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, 2003), com inúmeros esforços sendo feitos para minimizar o número e o sofrimento dos animais utilizados. O projeto científico desse trabalho foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Ceará, recebendo o nº 31/04.

Os camundongos geneticamente manipulados (knock out) para ICAM-1, pesando entre 18 a 20 gramas, foram providos e utilizados no Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto (USP-RP), tendo sido adquiridos da The Jackson Laboratory (Maine, USA).

2.2. Soluções, drogas e reagentes

Todos os reagentes utilizados apresentavam grau de pureza e propriedades analíticas adequadas e as drogas utilizadas foram: Hidrato de cloral (REAGEN - Brasil); N^G-nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME), Zymosan A, N^G-nitro-L-arginina (Nitro), Aminoguanidina (Amino) e Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS) (SIGMA St.

Louis, MO., USA); dihidroclorato de N-[[3- (aminoetil) fenil] metil] etanimidamida (1400W) e kit ELISA de leucotrieno B₄ (CAYMAN CHEMICAL Co., USA) e Heparina (Cristália- Brasil).

2.3. Protocolo experimental

2.3.1. Indução da artrite por zymosan (AZy) ou lipopolissacarídeo (ALPS)

Sob leve anestesia com éter etílico, os ratos foram submetidos à indução da AZy ou ALPS por meio da injeção intra-articular, no joelho direito, de 10-1000 µg de zymosan ou 1-10 µg de LPS, dissolvidos em 50 µL de solução salina estéril, apirogênica. Sob as mesmas condições, os camundongos foram submetidos à indução da AZy através da injeção intra-articular, no joelho direito, de 100 µg de Zy, diluído em 25 µL de solução salina estéril. O grupo controle (NAIVE) foi submetido apenas à administração de salina no joelho direito. Após 6 horas de artrite e sob anestesia com hidrato de cloral (400 mg/kg; i.p.), os animais foram sacrificados por exsangüinação.

2.3.2. Coleta do lavado articular

Os animais foram sacrificados, sob anestesia (hidrato de cloral – 400 mg/kg; i.p.), por exsangüinação, com posterior lavagem da cavidade articular. Essa foi realizada através de duas injeções intra-articulares, seguidas de aspiração, de 0,2 mL ou 50 µL de salina estéril apirogênica, contendo 5 UI/mL de heparina, em ratos ou camundongos, respectivamente. A conservação do lavado aspirado foi realizada em banho de gelo.

2.3.3. Análise da celularidade do lavado articular

Uma amostra do lavado articular foi diluída no líquido de Turk a 10% para contagem da celularidade em câmara de Neubauer. Em seguida, o lavado foi centrifugado a 3000 g, a 4°C, por 10 minutos e o sobrenadante obtido foi estocado a -20°C para posterior análise.

2.3.4. Indução da peritonite por zymosan (PZy) ou lipopolissacarídeo (PLPS)

Após leve anestesia com éter etílico, os ratos foram submetidos à indução da PZy ou PLPS por meio da injeção intraperitoneal de 1 mg de Zy ou 10µg de LPS, dissolvido em 0,5 mL de solução salina estéril. Sob as mesmas condições, os camundongos foram submetidos à indução da PZy através da injeção intraperitoneal de 100 µg de Zy, diluído em 100 µL de solução salina estéril. O grupo controle (NAIVE) foi submetido apenas à administração de salina intraperitoneal. Após 4 horas de peritonite e sob anestesia (hidrato de cloral – 400 mg/kg; i.p.), os animais foram sacrificados por exsanguinação.

2.3.5. Coleta do lavado peritoneal

Os animais foram sacrificados, sob anestesia (hidrato de cloral – 400 mg/kg; i.p.), por exsanguinação, com posterior lavagem da cavidade peritoneal. Essa foi realizada através da incisão e desbridamento da pele abdominal, seguidos da injeção de 7 mL ou 2 mL de salina estéril apirogênica, contendo 5 UI/mL de heparina, em ratos ou camundongos, respectivamente. Posteriormente, o lavado foi aspirado com pipeta Pasteur e conservado em banho de gelo.

2.3.6. Análise da celularidade do lavado peritoneal

Uma amostra do lavado peritoneal foi diluída no líquido de Turk a 10% para a contagem da celularidade em câmara de Neubauer. Em seguida, o lavado foi centrifugado a 3000 g, a 4°C, por 10 minutos e o sobrenadante obtido foi estocado a -20°C para posterior análise.

3. Modulação farmacológica

3.1. Inibidores da óxido nítrico sintase

Os grupos de animais foram tratados da seguinte forma:

L-NAME: dissolvido em solução salina estéril (0,9%). Os ratos ou camundongos receberam doses de 1-30 mg/kg (i.p. ou s.c.) ou 0,3-1 μ mol intra-articular, 30 minutos antes da indução da artrite ou peritonite por Zy ou por LPS.

1400W: dissolvido em solução salina estéril (0,9%). Os ratos receberam dose de 1 mg/kg (i.p. ou s.c.), 30 minutos antes da indução da artrite ou peritonite por Zy.

N^G-nitro-L-arginina (Nitro): dissolvido em solução salina estéril (0,9%). Os camundongos receberam dose de 50 mg/kg (i.p. ou s.c.), 30 minutos antes da indução da artrite ou peritonite por Zy.

Aminoguanidina (Amino): dissolvido em solução salina estéril (0,9%). Os ratos receberam dose de 50 mg/kg (i.p.), 30 minutos antes da indução da artrite por Zy.

4. Análise estatística

Para comparações múltiplas entre médias, foi utilizada a análise de variância univariada (ANOVA). Na presença de significância, aplicou-se o teste de Tukey, adotando-se o nível de significância de 5% (alfa = 0,05). Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m.

3. RESULTADOS

3.1. Efeito do pré-tratamento com L-NAME, 1400W ou Aminoguanidina sobre o influxo celular à cavidade articular de ratos na artrite induzida por zymosan (AZy)

A figura 3 ilustra o efeito da administração profilática do inibidor não seletivo de NOS, L-NAME (1-30 mg/kg; i.p.), sobre o influxo celular coletado após 6 horas da injeção do zymosan em diferentes concentrações (10-1000 μ g). Observa-se que, independentemente da dose de zymosan, o tratamento com L-NAME inibiu de forma significativa ($p < 0,05$) o influxo celular, quando comparado aos animais que receberam apenas o zymosan intra-articular e o veículo da diluição do L-NAME. De maneira semelhante, a administração profilática de inibidores seletivos de NOSi, o composto 1400W (1 mg/kg; i.p.) ou aminoguanidina (50 mg/kg; i.p.), reduziu de forma significativa o influxo celular na AZy.

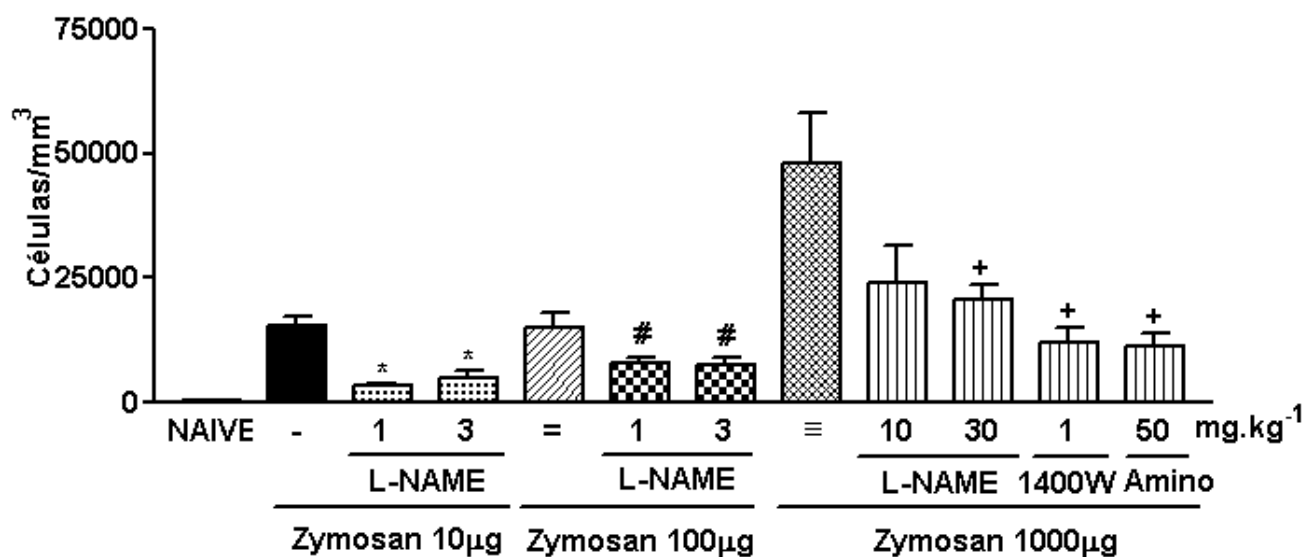


Figura 3- Efeito do pré-tratamento com L-NAME, 1400W ou Aminoguanidina (Amino) sobre o influxo celular à cavidade articular de ratos na artrite induzida por zymosan (AZy). Ratos Wistar receberam uma injeção intra-articular de zymosan (10-1000 μ g) no joelho direito, sendo sacrificados, sob anestesia, após 6h da indução da AZy. L-NAME (1-30 mg/kg; i.p.), 1400W (1 mg/kg; i.p.) ou Aminoguanidina (50 mg/kg; i.p.) foi administrado 30 minutos antes da AZy. A contagem total de células foi realizada no lavado articular. O grupo NAIVE representa animais que receberam salina intra-articular. Grupos não tratados (-, = e ≡) representam animais artríticos que não receberam qualquer tratamento farmacológico. Os dados representam a média \pm EPM do número de células/mm³ de 6 animais por grupo. * $p < 0,001$ quando comparado ao grupo não tratado (-); # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo não tratado (=) e + $p < 0,01$ quando comparado ao grupo não tratado (≡) (ANOVA univariada seguida de teste de Tukey).

3.2. Efeito do pré-tratamento com L-NAME ou Nitro sobre o influxo celular à cavidade articular de camundongos submetidos à indução da artrite por zymosan (AZy)

De maneira semelhante ao obtido em ratos, a administração profilática dos inibidores não seletivos de NOS, L-NAME (3-10 mg/kg; i.p.) ou Nitro (50 mg/kg, i.p.), 30 minutos antes da indução da AZy (Zy 100 μ g) em camundongos, reduziu de forma significativa ($1120 \pm 326,2$; $1600 \pm 392,4$ e $2095,5 \pm 567,4$ células/ mm^3 para L-NAME 3, 10 e Nitro, respectivamente) ($p < 0,05$) o influxo de leucócitos à cavidade articular desses animais, quando comparado ao grupo que recebeu apenas o zymosan intra-articular e salina intraperitoneal (-) ($3460 \pm 429,6$ células/ mm^3) (fig. 4).

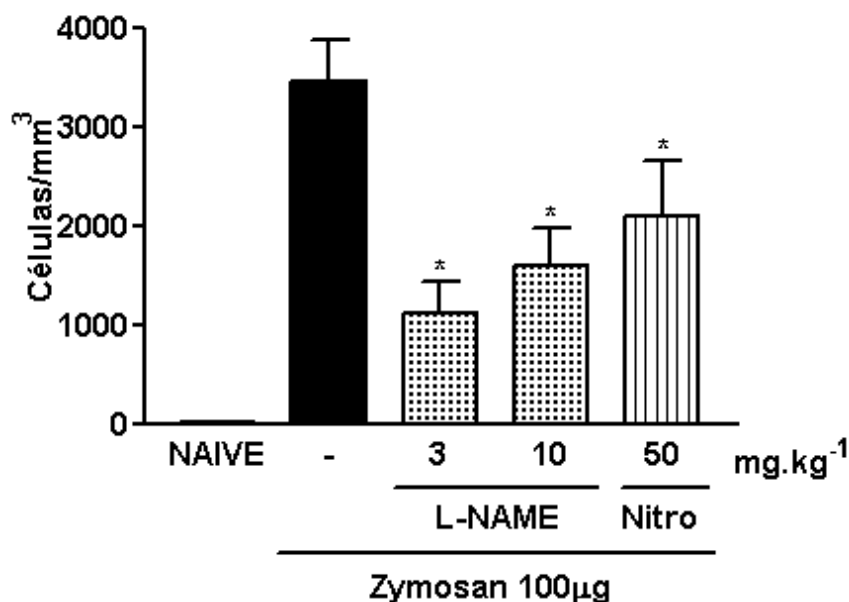


Figura 4- Efeito do pré-tratamento com L-NAME ou Nitro sobre o influxo celular à cavidade articular de camundongos submetidos à indução da artrite por zymosan (AZy). Camundongos Swiss receberam uma injeção intra-articular de zymosan (100 μ g) no joelho direito, sendo sacrificados, sob anestesia, após 6h da indução da AZy. L-NAME (3-10 mg/kg; i.p.) ou Nitro (50 mg/kg; i.p.) foi administrado 30 minutos antes da AZy. A contagem total de células foi realizada no lavado articular. O grupo NAIVE representa animais que receberam salina intra-articular. Grupo não tratado (-) representa animais artríticos que não receberam qualquer tratamento farmacológico. Os dados representam a média \pm EPM do número de células/ mm^3 de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo não tratado (ANOVA univariada seguida de teste de Tukey).

3.3. Efeito do pré-tratamento local com L-NAME sobre o influxo celular à cavidade articular de ratos submetidos à indução da artrite por zymosan (AZy)

A administração local (intra-articular) do L-NAME (0,3 $\mu\text{mol}/\text{animal}$) promoveu uma inibição significativa ($p < 0,05$) do influxo celular à cavidade articular na artrite por zymosan em ratos ($7100 \pm 1625,4$ células/ mm^3), quando comparado ao grupo que recebeu zymosan e salina intra-articular (-) ($48200 \pm 10013,3$ células/ mm^3) (fig. 5).

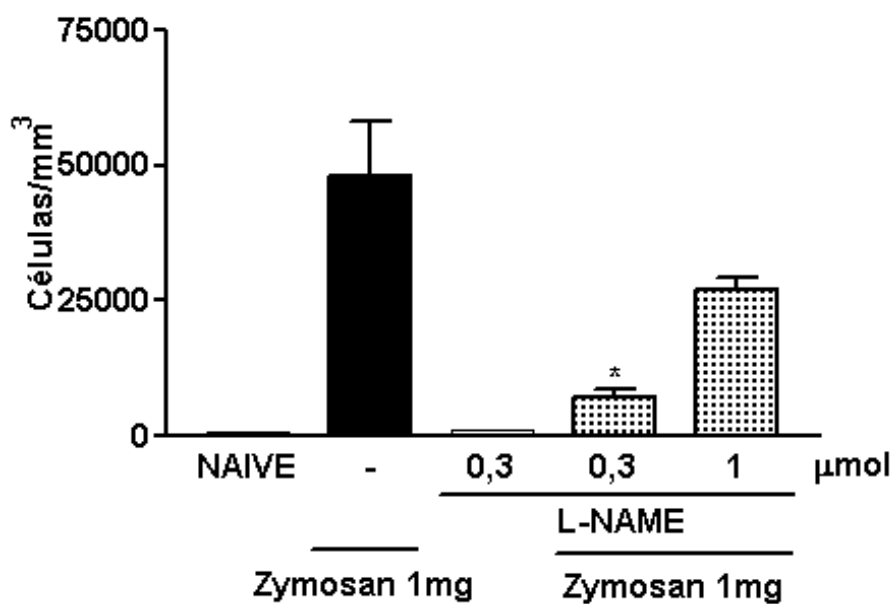


Figura 5- Efeito do pré-tratamento local com L-NAME sobre o influxo celular à cavidade articular de ratos submetidos à indução da artrite por zymosan (AZy). Ratos Wistar receberam uma injeção intra-articular de zymosan (1mg) no joelho direito, sendo sacrificados, sob anestesia, após 6h da indução da AZy. L-NAME (0,3-1 μmol ; i.a.) foi administrado 30 minutos antes da AZy. A contagem total de células foi realizada no lavado articular. O grupo NAIVE representa animais que receberam salina intra-articular. Grupo não tratado (-) representa animais artríticos que não receberam qualquer tratamento farmacológico. Os dados representam a média \pm EPM do número de células/ mm^3 de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo não tratado (ANOVA univariada seguida de teste de Tukey).

3.4. Efeito do pré-tratamento com L-NAME ou 1400W sobre o influxo celular à cavidade peritoneal de ratos submetidos à indução da peritonite por zymosan (PZy)

De maneira oposta ao que ocorreu na artrite por zymosan, a administração profilática de L-NAME (10-30 mg/kg; s.c.) ou 1400W (1 mg/kg; s.c.) aumentou significativamente (566,7%; 495,1% e 470,7% para L-NAME 10, 30 e 1400W, respectivamente) ($p < 0,05$) a migração de leucócitos à cavidade peritoneal desses animais, quando comparado ao grupo que recebeu apenas zymosan intra-peritoneal e salina subcutânea (-) (fig. 6).

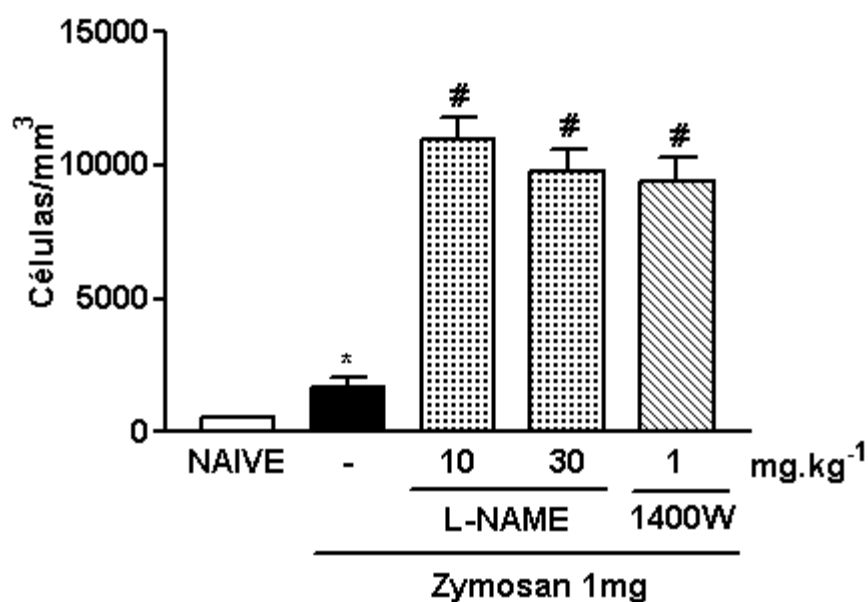


Figura 6- Efeito do pré-tratamento com L-NAME ou 1400W sobre o influxo celular à cavidade peritoneal de ratos submetidos à indução da peritonite por zymosan (PZy). Ratos Wistar receberam uma injeção intraperitoneal de zymosan (1 mg), sendo sacrificados, sob anestesia, após 4h da indução da PZy. L-NAME (10-30 mg/kg; s.c.) ou 1400W (1 mg/kg; s.c.) foi administrado 30 minutos antes da PZy. A contagem total de células foi realizada no lavado peritoneal. O grupo NAIVE representa animais que receberam salina intraperitoneal. Grupo não tratado (-) representa animais com peritonite que não receberam qualquer tratamento farmacológico. Os dados representam a média \pm EPM do número de células/mm³ de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo NAIVE; # $p < 0,001$ quando comparado ao grupo não tratado (ANOVA univariada seguida de teste de Tukey).

3.5. Efeito do pré-tratamento com L-NAME ou Nitro sobre o influxo celular à cavidade peritoneal de camundongos submetidos à indução da peritonite por zymosan (PZy)

De maneira semelhante ao observado em ratos, a administração profilática de L-NAME (30 mg/kg; s.c.) promoveu aumento significativo (155,8%) ($p < 0,05$) do influxo celular à cavidade peritoneal, quando comparado ao grupo que recebeu apenas zymosan intraperitoneal e salina subcutânea (-) (fig. 7).

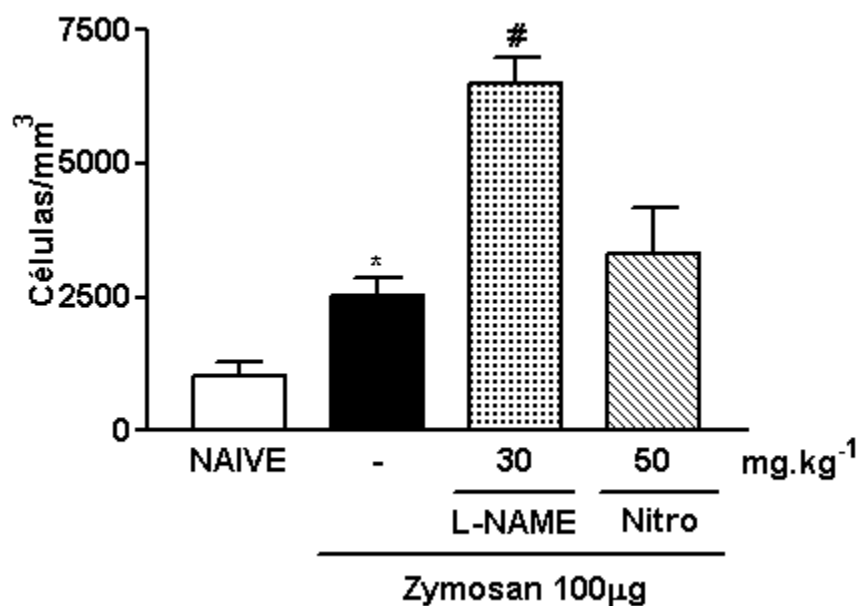


Figura 7- Efeito do pré-tratamento com L-NAME ou Nitro sobre o influxo celular à cavidade peritoneal de camundongos submetidos à indução da peritonite por zymosan (PZy). Camundongos Swiss receberam uma injeção intraperitoneal de zymosan (100 µg), sendo sacrificados, sob anestesia, após 4h da indução da PZy. L-NAME (30 mg/kg; s.c.) ou Nitro (50 mg/kg; s.c.) foi administrado 30 minutos antes da PZy. A contagem total de células foi realizada no lavado peritoneal. O grupo NAIVE representa animais que receberam salina intraperitoneal. Grupo não tratado (-) representa animais com peritonite que não receberam qualquer tratamento farmacológico. Os dados representam a média \pm EPM do número de células/mm³ de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo NAIVE; # $p < 0,001$ quando comparado ao grupo não tratado (ANOVA univariada seguida de teste de Tukey).

3.6. Efeito do pré-tratamento local com L-NAME sobre o influxo celular à cavidade peritoneal de ratos submetidos à indução da peritonite por zymosan (PZy)

De maneira semelhante ao observado na artrite por zymosan, a administração local (intraperitoneal) de L-NAME (10 mg/kg) também promoveu aumento significativo do influxo celular (13900 ± 2464 células/mm³), quando comparado ao grupo que recebeu apenas zymosan intraperitoneal e salina subcutânea (-) (1640 ± 397 células/mm³) ($p < 0,05$) (fig. 8).

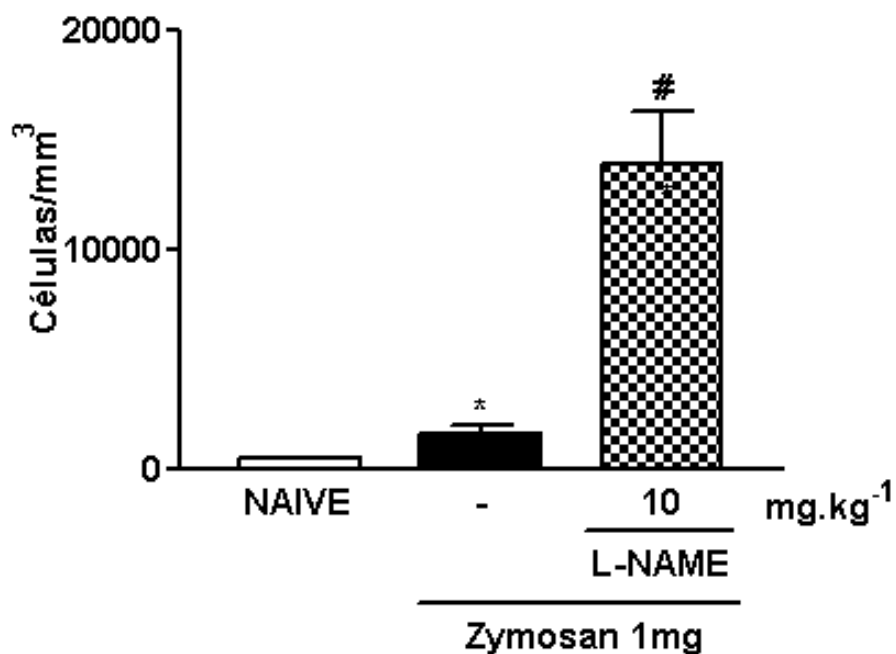


Figura 8- Efeito do pré-tratamento local com L-NAME sobre o influxo celular à cavidade peritoneal de ratos submetidos à indução da peritonite por zymosan (PZy). Ratos Wistar receberam uma injeção intraperitoneal de zymosan (1 mg), sendo sacrificados, sob anestesia, após 4h da indução da PZy. L-NAME (10 mg/kg; i.p.) foi administrado 30 minutos antes da PZy. A contagem total de células foi realizada no lavado peritoneal. O grupo NAIVE representa animais que receberam salina intraperitoneal. Grupo não tratado (-) representa animais com peritonite que não receberam qualquer tratamento farmacológico. Os dados representam a média \pm EPM do número de células/mm³ de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo NAIVE; # $p < 0,001$ quando comparado ao grupo não tratado (ANOVA univariada seguida de teste de Tukey).

3.7. Efeito do pré-tratamento com L-NAME sobre o influxo celular na artrite por LPS em ratos (ALPS)

A administração profilática de L-NAME (30 mg/kg; i.p.), um inibidor não seletivo de NOS, em ratos submetidos à artrite induzida pela injeção intra-articular de LPS (ALPS) (LPS 1-10 μg), independente da concentração do estímulo, reduziu de forma significativa ($1333,3 \pm 290,6$ e $1133,3 \pm 84,3$ células/ mm^3 para L-NAME em LPS 1 μg e 10 μg , respectivamente) ($p < 0,05$) o influxo celular à cavidade articular dos animais, quando comparado ao grupo que recebeu apenas LPS intra-articular e salina intraperitoneal ($2685 \pm 271,6$ e $2375 \pm 193,1$ células/ mm^3 para LPS 1 e 10 μg , respectivamente) (fig. 9).

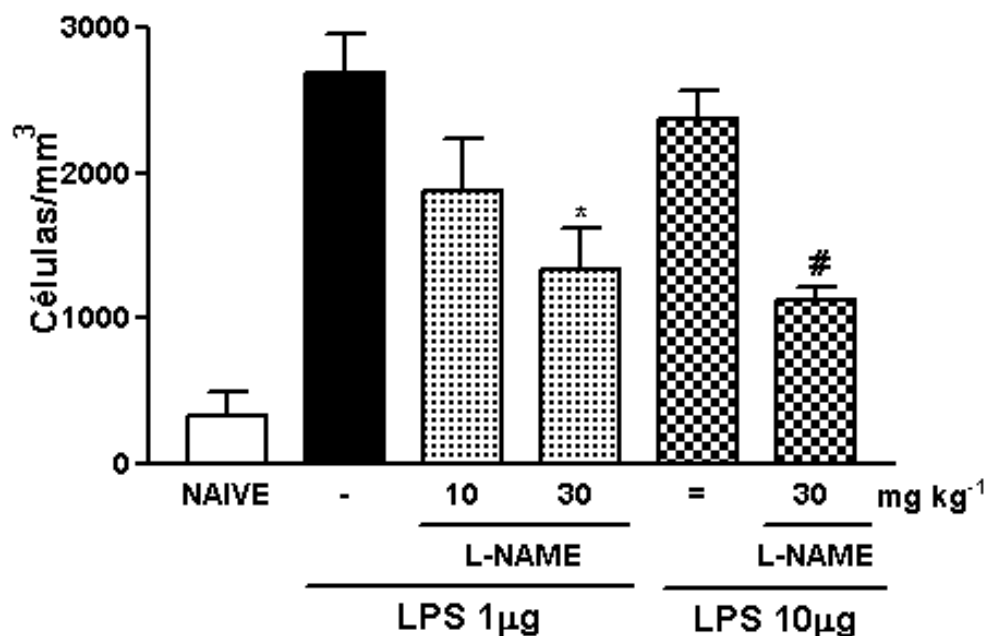


Figura 9- Efeito do pré-tratamento com L-NAME sobre o influxo celular à cavidade articular de ratos submetidos à indução da artrite por LPS (ALPS). Ratos Wistar receberam uma injeção intra-articular de LPS (1-10 μg) no joelho direito, sendo sacrificados, sob anestesia, após 6h da indução da ALPS. L-NAME (10-30 mg/kg; i.p.) foi administrado 30 minutos antes da ALPS. A contagem total de células foi realizada no lavado articular. O grupo NAIVE representa animais que receberam salina intra-articular. Grupo não tratado (-) representa animais artríticos que não receberam qualquer tratamento farmacológico. Os dados representam a média \pm EPM do número de células/ mm^3 de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo não tratado (-); # $p < 0,001$ quando comparado ao grupo não tratado (=) (ANOVA univariada seguida de teste de Tukey).

3.8. Efeito do pré-tratamento com L-NAME sobre o influxo celular à cavidade peritoneal de ratos submetidos à indução da peritonite por LPS (PLPS)

Em animais submetidos à peritonite pela injeção intraperitoneal de LPS, a administração profilática de L-NAME (30 mg/kg, s.c.) aumentou significativamente (2700 ± 238 células/mm³) ($p < 0,05$) o influxo celular, quando comparado ao grupo que recebeu apenas LPS intraperitoneal e salina subcutânea (-) (1760 ± 204 células/mm³) (fig. 10).

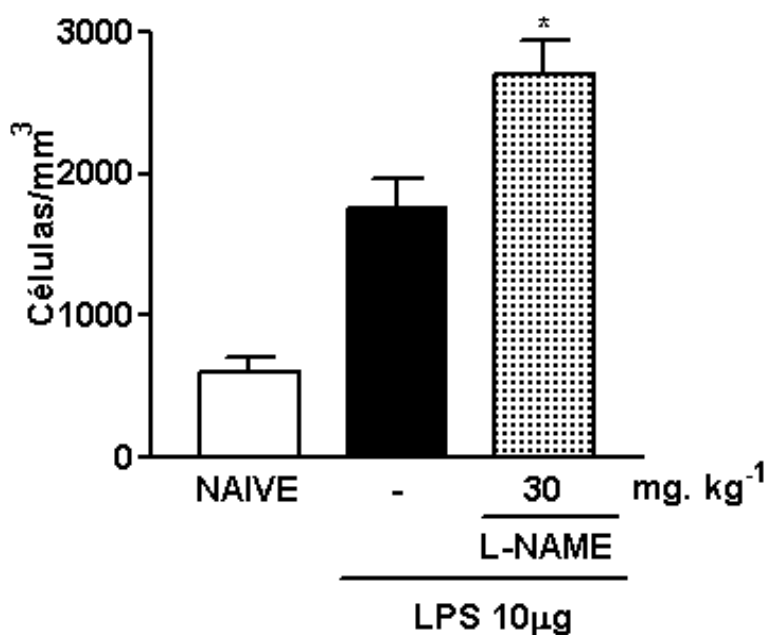


Figura 10- Efeito do pré-tratamento com L-NAME sobre o influxo celular à cavidade peritoneal de ratos submetidos à indução da peritonite por LPS (PLPS). Ratos Wistar receberam uma injeção intraperitoneal de LPS (10 µg), sendo sacrificados, sob anestesia, após 4h da indução da PLPS. L-NAME (30 mg/kg; s.c.) foi administrado 30 minutos antes da PLPS. A contagem total de células foi realizada no lavado peritoneal. O grupo NAIVE representa animais que receberam salina intraperitoneal. Grupo não tratado (-) representa animais com peritonite que não receberam qualquer tratamento farmacológico. Os dados representam a média \pm EPM do número de células/mm³ de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo não tratado (-) (ANOVA univariada seguida de teste de Tukey).

3.9. Liberação de leucotrieno B₄ (LTB₄) na artrite e peritonite induzidas por zymosan em ratos

A determinação dos níveis de LTB₄ nos lavados articulares ou peritoneais dos animais submetidos à AZy ou PZy, respectivamente, não sofreu alteração que alcançasse significância estatística pelo pré-tratamento com L-NAME (30 mg/kg; i.p. e 10 mg/kg; s.c. para AZy e PZy, respectivamente) (fig. 11).

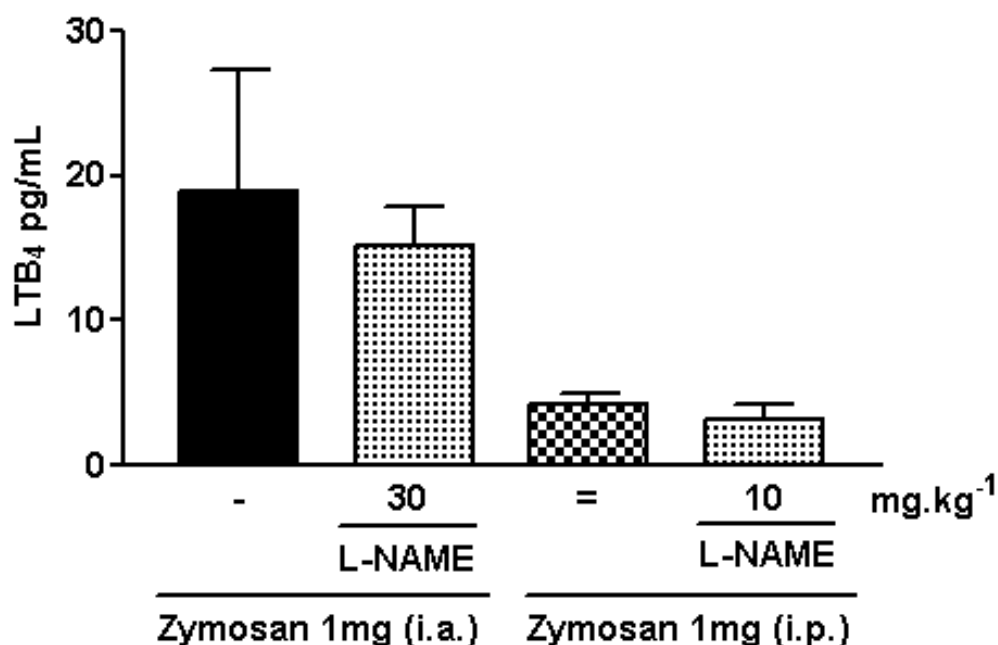


Figura 11- Liberação de leucotrieno B₄ (LTB₄) na artrite e peritonite induzidas por zymosan em ratos. Ratos Wistar receberam uma injeção intra-articular ou intraperitoneal de zymosan (1 mg), sendo sacrificados, sob anestesia, após 6 ou 4h da indução da AZy ou PZy, respectivamente. L-NAME (10-30 mg/kg; i.p. ou s.c.) foi administrado 30 minutos antes da AZy ou PZy. Os níveis de leucotrieno B₄ (LTB₄) nos lavados articular e peritoneal foram medidos através do ELISA. Grupos não tratados (- e =) representam animais com artrite ou peritonite que não receberam qualquer tratamento farmacológico. Os dados representam a média ± EPM da quantidade de LTB₄ (pg/mL) de 6 animais por grupo. Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA univariada seguida de teste de Tukey).

4. Participação de ICAM-1 sobre o influxo celular à cavidade articular de camundongos submetidos à artrite induzida por zymosan (AZy)

A figura 10 mostra a comparação do influxo celular na artrite por zymosan em animais selvagens e “knock out” para ICAM-1. Observa-se diminuição significativa (32,1%) do influxo nos animais “knock out” para ICAM-1 (ICAM-1^{-/-}) (=), em comparação aos animais selvagens submetidos à artrite (-) ($p < 0,05$). O pré-tratamento dos animais com inibidor não seletivo de NOS, Nitro (50 mg/kg; i.p.), reduziu significativamente (39,4% e 57,8% para animais selvagens e ICAM-1^{-/-}, respectivamente) ($p < 0,05$) o influxo celular, quando comparado aos animais que receberam apenas zymosan, quer fossem selvagens (-), quer ICAM-1^{-/-} (=) (fig. 12).

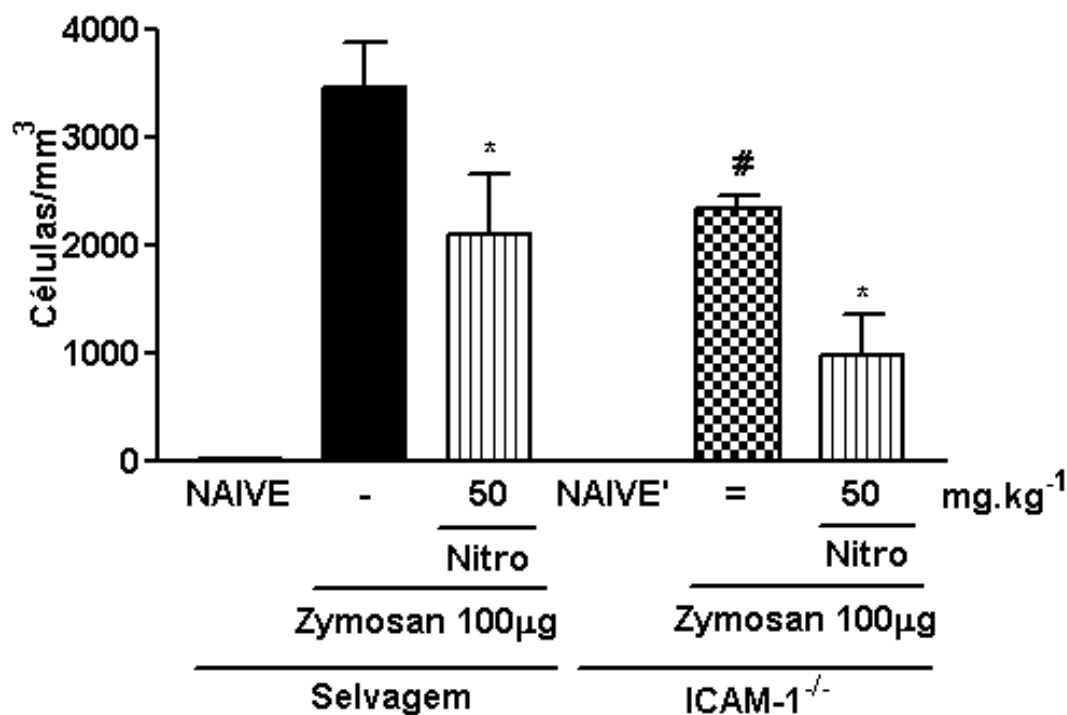


Figura 12- Participação de ICAM-1 sobre o influxo celular à cavidade articular de camundongos submetidos à artrite induzida por zymosan (AZy). Camundongos Swiss selvagens ou “knock out” para ICAM-1 (ICAM-1^{-/-}) receberam uma injeção intra-articular de zymosan (100 µg) no joelho direito, sendo sacrificados, sob anestesia, após 6h da indução da AZy. Nitro (50 mg/kg; i.p.) foi administrado 30 minutos antes da AZy. A contagem total de células foi realizada no lavado articular. Os grupos NAIVE e NAIVE' representam animais selvagens e ICAM-1^{-/-}, respectivamente, que receberam salina intra-articular. Grupos não tratados (- e =) representam animais selvagens e ICAM-1^{-/-} artríticos que não receberam qualquer tratamento farmacológico. Os dados representam a média ± EPM do número de células/mm³ de 6 animais por grupo. # $p < 0,01$ quando comparado ao grupo não tratado (-); * $p < 0,05$ quando comparado aos respectivos grupos não tratados (ANOVA univariada seguida de teste de Tukey).

4.1. Participação de ICAM-1 sobre o influxo celular á cavidade peritoneal de camundongos submetidos à peritonite induzida por zymosan (PZy)

A administração i.p. de zymosan (100 μg) em camundongos ICAM-1^{-/-} (=) promoveu uma diminuição do influxo celular (1968,7 \pm 710,3 células/mm³), quando comparado aos animais selvagens submetidos à peritonite por zymosan (-) (2533,3 \pm 312,7 células/mm³). Entretanto, essa redução no influxo (22,3%) não alcançou significância estatística. Como esperado, o pré-tratamento dos animais selvagens com Nitro (50 mg/kg) aumentou (3299,25 \pm 866,7 células/mm³) o influxo celular, comparado aos que receberam apenas zymosan i.p. (-). Entretanto, o tratamento profilático com Nitro (50 mg/kg) dos animais ICAM-1^{-/-} não alterou o influxo celular (1781 \pm 457,5 células/mm³), quando comparado aos animais ICAM-1^{-/-} que receberam apenas zymosan i.p. (1968,75 \pm 710,3 células/mm³) (=) (fig. 13).

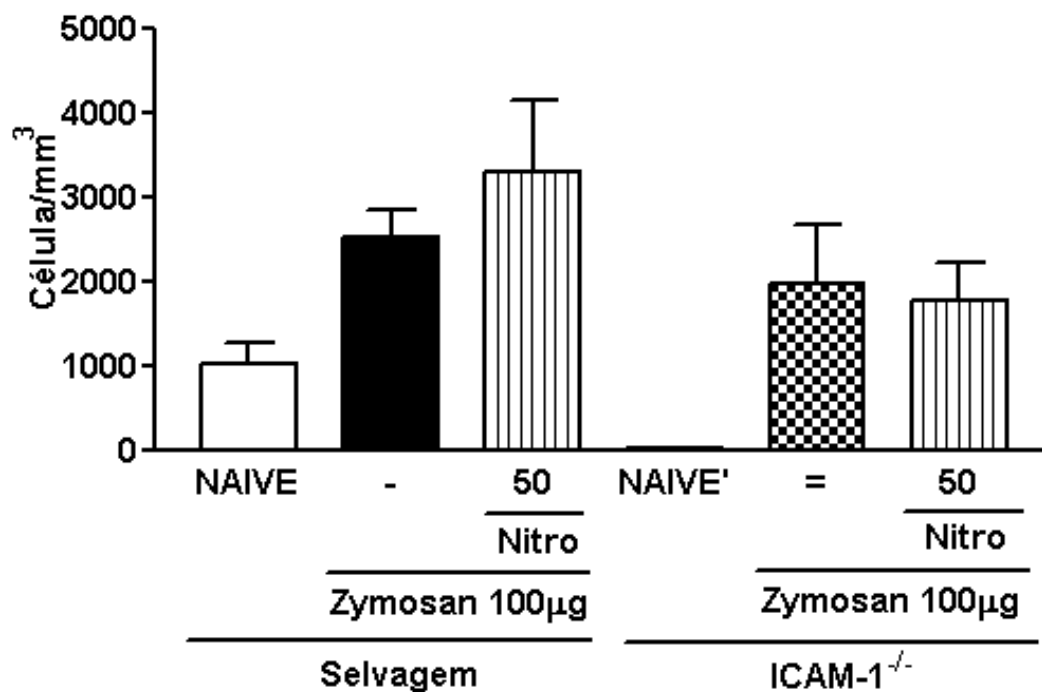


Figura 13- Participação de ICAM-1 sobre o influxo celular à cavidade peritoneal de camundongos submetidos à peritonite induzida por zymosan (PZy). Camundongos Swiss selvagens ou “knock out” para ICAM-1 (ICAM-1^{-/-}) receberam uma injeção intraperitoneal de zymosan (100 μg), sendo sacrificados, sob anestesia, após 4h da indução da PZy. Nitro (50 mg/kg; i.p.) foi administrado 30 minutos antes da PZy. A contagem total de células foi realizada no lavado peritoneal. Os grupos NAIVE e NAIVE' representam animais selvagens e ICAM-1^{-/-}, respectivamente, que receberam salina intraperitoneal. Grupos não tratados (- e =) representam animais selvagens e ICAM-1^{-/-} com peritonite que não receberam qualquer tratamento farmacológico. Os dados representam a média \pm EPM do número de células/mm³ de 6 animais por grupo (ANOVA univariada seguida de teste de Tukey).

4. DISCUSSÃO

Nesse trabalho, nós investigamos a participação do óxido nítrico (NO) na migração celular aguda em modelos experimentais de artrite e peritonite. Com o intuito de se estudar essa possível participação, observamos o efeito de inibidores da óxido nítrico sintase (NOS) sobre a migração leucocitária em ratos e camundongos submetidos à artrite ou peritonite induzida por zymosan (Zy) ou lipopolissacarídeo (LPS). Além disso, investigamos a possível influência da liberação de leucotrieno B₄ (LTB₄) sobre o efeito do NO nessa quimiotaxia, bem como a participação de moléculas de adesão nessa migração celular através de animais geneticamente manipulados (knock out) para ICAM-1.

Em estudos anteriores, nosso grupo e outros autores demonstraram que a administração de inibidores de NOS, em animais submetidos à artrite experimental, promovia efeito antiinflamatório associado à inibição da migração celular (Rocha et al., 2002; Ajuebor et al., 1999; Cuzzocrea et al., 1997). Além disso, animais geneticamente modificados, não expressando a enzima NOS_i, apresentaram uma redução na migração celular às articulações inflamadas, no modelo de artrite induzida por colágeno. Entretanto, conforme exposto na introdução desse trabalho, dados da literatura mostram que a administração de inibidores de NOS potencia a migração celular nos modelos de peritonite séptica ou por injeção de LPS na cavidade abdominal de ratos ou camundongos.

Os resultados do presente estudo mostraram de forma inequívoca que a administração profilática sistêmica (intraperitoneal) de inibidores não seletivos de NOS (L-NAME ou Nitro-L-arginina), de forma significativa e dose dependente, reduziu a migração de polimorfonucleares (PMNs) à cavidade articular na artrite induzida por zymosan. Observamos ainda uma inibição dessa quimiotaxia quando L-NAME foi administrado localmente (intra-articular). Dessa forma, os dados apontam para um efeito modulador do NO sobre as células residentes e/ou migradas para o foco inflamatório articular, além de sugerirem uma independência da via de administração sobre essa modulação. Resultados semelhantes foram obtidos quando administramos dois inibidores seletivos de NOS_i,

1400W ou aminoguanidina, sugerindo-se uma participação dessa isoenzima nesse fenômeno.

Corroborando esses achados, mostramos, em estudos anteriores, uma associação entre níveis elevados de nitrito (um produto da oxidação de NO) e o aumento da migração celular no lavado articular de animais submetidos à AZy (Rocha et al., 1999; Rocha et al., 2002). Essa maior liberação de NO foi também associada a um aumento na expressão de NOSi na sinóvia daqueles animais, particularmente nas células sinoviais, bem como em neutrófilos e macrófagos presentes na sinovite, promovido pela administração intra-articular de zymosan. Semelhante participação do NO foi observada em ratos submetidos à administração intradérmica (i.d.) de zymosan (Greenacre et al., 2002).

Saliente-se ainda que a redução na concentração de zymosan administrado na articulação dos animais, conforme mostrado nos resultados desse trabalho, não alterou o efeito dos inibidores de NOS, sugerindo-se que esses compostos são capazes de inibirem a migração celular aguda no modelo de AZy, de forma independente da dose. Ainda, a indução da artrite por zymosan com concentração à comumente padronizada se deveu à possibilidade, aventada nos estudos com peritonite (Ajuebor et al., 1999), de que altas concentrações de zymosan promoveriam uma migração celular exacerbada, de modo a prejudicar a demonstração de uma potenciação desse fenômeno inflamatório pela administração de inibidores de NOS. Nossos dados, portanto, descartam essa possibilidade e apontam para uma diferença no efeito desses compostos na artrite induzida por zymosan. Diante dos resultados obtidos, algumas possibilidades foram aventadas, a saber: diferença do estímulo inflamatório, da espécie estudada e/ou das características próprias do local inflamado.

Com o intuito de elucidar essas hipóteses, submetemos camundongos à artrite induzida por zymosan, além de utilizarmos LPS como um diferente estímulo inflamatório para a artrite. Os resultados obtidos demonstraram, à semelhança do ocorrido na AZy em ratos, que, em camundongos, a administração de inibidores de NOS promovia a inibição da migração celular. Associado a isso, na artrite induzida por LPS, os inibidores de NOS

promoveram também uma inibição significativa da quimiotaxia de PMNs. Em conjunto, os dados nos permitem sugerir que o efeito da inibição da NOS, provavelmente da NOSi, em modelos de artrite, é promover uma redução da migração celular aguda de forma independente do estímulo e da espécie estudada.

Resultados semelhantes aos nossos foram obtidos em cobaias pela co-administração intradérmica de plasma ativado por zymosan e L-NAME, promovendo uma inibição significativa da acumulação de polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos). Além disso, houve uma reversão dessa inibição quando um doador de NO, o nitroprussiato de sódio, foi administrado (Faccioli et al., 1991; Teixeira et al., 1993). No modelo de artrite induzida por antígeno em coelhos, observou-se uma redução do recrutamento de PMNs pela administração de L-NAME (Mello et al., 1997) e, ainda, na artrite induzida pela parede de *Streptococcus*, a administração de L-NMMA inibiu o influxo celular para a cavidade articular dos animais artríticos (McCartney-Francis et al., 1993). Ademais, a administração do composto L-NAME em ratos promoveu a diminuição da migração de eosinófilos no modelo de pleurite provocado pela injeção de bradicinina, PAF, LPS ou carragenina (Ferreira et al., 1996).

Essa redução da migração celular observada quando a síntese de NO é bloqueada, especialmente quando NOSi é inibida, pode estar relacionada com a possível participação do NO na produção de quimiocinas CXC, como proteína inflamatória de macrófago-2 (MIP-2) e quimioatraente neutrofílico induzido por citocina (KC), cujas ações quimiotáticas para PMNs já estão bem estabelecidas (Ajuebor et al., 1998; Haelens et al., 1996; Rollins, 1997; Luster, 1998).

De fato, apesar das controvérsias, há evidências na literatura de que o NO e o GMPc agem como mediadores endógenos da quimiotaxia neutrofílica, conforme mostrado em um estudo em que tanto inibidores de NOS (L-NMMA, L-NAME e L-canavanina) quanto inibidor de guanilato ciclase (LY-83583) bloquearam a quimiotaxia de neutrófilos induzida por fMLP (Armstrong, 2001). Associado a isso, a supressão do efeito vasodilatador do NO, pela administração de inibidores de NOS, pode promover uma

vasoconstrição e, dessa forma, contribuir para uma redução da migração celular. Entretanto, essa possibilidade nos parece improvável pelo fato da sinóvia ser um tecido ricamente irrigado, no qual, em situações inflamatórias, há vasodilatação e angiogênese, com essa última sendo detectada a partir do 7º dia de artrite induzida por zymosan (Bezerra et al., 2004), sugerindo-se a inexistência de déficit na irrigação desse tecido. Corroborando essa idéia, em um estudo anterior, mostramos que a aminoguanidina, apesar de não alterar a pressão arterial dos animais, sugerindo não estar agindo sobre a NOS constitutiva, promoveu uma redução no influxo celular na artrite por zymosan (Rocha et al., 2002). Assim, considerando que uma vasoconstrição significativa deveria levar a alterações da resistência periférica e, portanto, da pressão arterial dos animais, parece-nos improvável que esse fenômeno vasoconstritor, ainda que ocorra, tenha repercussão fisiopatológica significativa a ponto de ser responsável pela redução do influxo celular à sinóvia inflamada promovida pela inibição de NOSi.

Conforme os resultados apresentados nesse trabalho, a administração dos inibidores de NOS promoveram um aumento significativo da migração celular aguda na peritonite induzida por zymosan (PZy) em ratos, de forma dose-dependente. Ainda, esse efeito foi também observado em camundongos submetidos à PZy e, quando administramos LPS como estímulo inflamatório, os resultados mostraram-se semelhantes aos obtidos com o zymosan. Esses resultados concordam com dados obtidos anteriormente no modelo de peritonite induzida por LPS, na sepse por lesão intestinal ou ainda pela administração intraperitoneal de *Staphylococcus aureus* (Tavares-Murta et al., 1998; Benjamim et al., 2000; Crosara-Alberto et al., 2002). Corroborando esses achados, foi mostrado ainda um aumento significativo da migração neutrofílica em animais pré-tratados com Nitro (50 mg/kg; s.c.) ou aminoguanidina (50 mg/kg; s.c.) submetidos à peritonite por carragenina (30 µg/1 mL) ou por LPS (20 ng/1mL), com a administração de L-arginina (500 mg/kg) revertendo aquele aumento (Secco et al., 2003). Em conjunto, nossos resultados mostram que a variação do local inflamatório, mas não da espécie ou do estímulo empregado, é um determinante na modulação exercida pelo NO sobre a migração de PMNs nas articulações e na cavidade peritoneal.

Estudos em animais geneticamente manipulados (knock out) para NOSi, em diferentes modelos experimentais, mostraram um aumento no recrutamento leucocitário para o sítio inflamatório, quando comparado aos animais selvagens, sugerindo a participação do NO sintetizado por aquela enzima na redução da migração celular em modelos experimentais (Secco et al., 2003; Hickey et al., 1997; Benjamim et al., 2002). Entretanto, foi demonstrada, em animais “knock out” para NOSi submetidos à peritonite induzida por zymosan (0,2 mg), uma diminuição significativa do influxo celular no lavado peritoneal daqueles animais (Ajuebor et al., 1998). Os autores associaram essa supressão do influxo aos baixos níveis de MIP-2 e IL-10 detectados no lavado peritoneal dos animais. Sugeriram ainda que, apesar da IL-10 suprimir a infiltração de PMNs às áreas inflamadas (Mosmann, 1994; Cassatella et al., 1993; Perretti et al., 1995; Haskó et al., 1998), a modulação de sua produção pela NOSi não se mostrou tão relevante, nas condições experimentais utilizadas, a ponto de interferir significativamente na migração celular. Essa aparente discrepância do NO sobre a migração celular aguda apresentada em nossos experimentos pode refletir as diferentes ações que o NO exerce sobre a quimiotaxia neutrofílica, conforme descrito na literatura. De fato, estudos *in vitro* mostraram uma diminuição da quimiotaxia mediada pelo fMLP, quando um inibidor de NOS (L-NMMA) foi utilizado (Kaplan et al., 1989), bem como uma indução da quimiotaxia neutrofílica na presença de NO exógeno (Beauvais et al., 1995). Contrapondo-se a esses estudos, foi sugerido que o NO ou compostos doadores é capaz de inibir aspectos da ativação neutrofílica, incluindo a quimiotaxia (Clancy et al., 1992). Dessa forma, existe a possibilidade de que variações nas concentrações de NO sejam capazes de alterar o seu efeito sobre a quimiotaxia de neutrófilos, uma vez que há estudos sugerindo que baixas concentrações de NO promoveriam a migração neutrofílica, ao passo que altas concentrações a inibiriam (Wanikiat et al., 1997; Van Uffelen et al., 1996). No presente estudo, essa possibilidade nos parece remota, uma vez que, na artrite induzida por zymosan, a redução da concentração dos inibidores de NOS reproduziu os resultados obtidos com as maiores concentrações ou não os alterou, sugerindo-se um efeito dose-dependente.

Entre os diversos mediadores lipídicos envolvidos na migração celular aguda, o leucotrieno B₄ (LTB₄) tem sido implicado nos fenômenos de quimiotaxia, particularmente

para polimorfonucleares. Em estudos anteriores, nosso grupo, além de outros autores, demonstrou um aumento na liberação de LTB₄ em modelos de artrite, bem como inibição da migração de PMNs pela administração de antagonistas ou inibidores da síntese de LTB₄ (Rocha et al., 1996; Oliveira et al., 1997; Crooks e Stockley, 1998; Rocha et al., 2004). *In vitro*, em leucócitos do sangue periférico de portadores de artrite reumatóide, demonstrou-se a inibição da expressão das moléculas de adesão CD11b/CD18 após a administração oral de um antagonista de LTB₄ (Alten et al., 2004). Com o intuito de se demonstrar um possível efeito modulador do NO sobre a liberação de leucotrienos, determinamos os níveis de LTB₄ na articulação e na cavidade peritoneal dos animais. Reproduzindo achados anteriores, obtivemos aumento nos níveis de LTB₄ tanto na artrite quanto na peritonite por zymosan. Entretanto, a administração dos inibidores de NOS não alterou esses níveis, independentemente do local inflamado, sugerindo que a participação do NO no processo de migração celular aguda nos modelos de artrite ou peritonite induzida por zymosan parece ser independente da liberação de LTB₄ em nível local.

Além da atuação do NO sobre a quimiotaxia de neutrófilos, vários são os possíveis mecanismos responsáveis pela inibição da migração celular mediada por aquele radical. Dentre esses, encontra-se o envolvimento do NO na inibição do rolamento e da adesão neutrofilica ao endotélio (Secco et al., 2003), assim como da transmigração leucocitária (Grisham et al., 1998). Reforçando essa idéia, estudos demonstraram um rápido aumento no rolamento e na adesão leucocitária em vênulas pós-capilares não inflamadas, quando se inibiu a produção de NO endógeno (Davenpeck et al., 1994; Kubes et al., 1991), com a reversão do processo pela administração de L-arginina ou de doadores de NO (Kubes e Granger, 1992). Tem sido proposta ainda, como outro possível mecanismo de ação, uma diminuição na expressão de moléculas de adesão (V-CAM-1, E-selectina e P-selectina) mediada pelo NO. Essa diminuição ocorreria através da atuação do NO sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-8) ou a ativação de NF- κ B, promovendo a inibição desses dois processos (Gauthier et al., 1994; De Caterina et al., 1995; Khan et al., 1996; Hickey et al., 1997). De fato, tem sido mostrado que inibidores de NOS aumentam, enquanto que doadores de NO diminuem, a expressão de moléculas de adesão CD11b/CD18, L-, P-, E-selectinas, ICAM-1 e VCAM-1 (Lefler e Lefler, 1996; Spiecker et

al., 1998; Gauthier et al., 1994; Armstead et al., 1997; Sato et al., 1999; Pruefer et al., 1999).

Com relação à NF- κ B, esse fator nuclear é tido como um dos principais fatores de transcrição na resposta inflamatória, estando envolvido na expressão de moléculas de adesão e de citocinas pró-inflamatórias (Baeuerle e Henkel, 1994). Sua relação com o NO está associada com o fato de que ele inibe a sua ativação através da indução e estabilização de I κ B- α , uma proteína reguladora que inibe a translocação de NF- κ B para o núcleo (Peng et al., 1995). Dessa forma, o NO pode impedir a expressão de moléculas de adesão e de mediadores inflamatórios, interferindo assim no processo de migração celular.

Associado a esses possíveis mecanismos, sugere-se ainda que o NO pode agir como um antioxidante, induzindo proteínas protetoras (ferritina, hemeoxigenase e superóxido dismutase) contra o estresse oxidativo, uma condição ativadora de NF- κ B e promotora de injúria tecidual (Kim et al., 1995; Nunoshiba et al., 1993). Além disso, o NO pode reagir com o ânion superóxido (O_2^-), impedindo a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), composto envolvido na adesão leucocitária por promover a expressão de moléculas de adesão através da ativação de NF- κ B ou pela formação de PAF (Benjamim, 2001).

Por fim, a evidência de que o NO modula a função do citoesqueleto (estrutura essencial para leucócitos ativados realizarem a adesão, migração, fagocitose e degranulação), através da regulação da polimerização e despolimerização da actina, pode contribuir para a redução na infiltração celular mediada por aquele radical (Downey, 1994). De fato, estudos mostraram que o NO exógeno inibiu a polimerização da actina em neutrófilos humanos, reduzindo a sua habilidade em aderir à fibronectina (Sato et al., 1999; Clancy et al., 1995). Ainda, foi mostrada uma diminuição no número de projeções de microvilos na superfície celular e uma redução na capacidade leucocitária em iniciar interações com P e E-selectinas no rolamento, quando houve uma interrupção no citoesqueleto leucocitário (Finger et al., 1996).

Diante do exposto, decidimos investigar o papel de moléculas de adesão endotelial sobre a modulação exercida pelo NO no influxo celular naqueles modelos experimentais. Para tanto, utilizamos animais “knock out” para ICAM-1 (ICAM-1^{-/-}), um ligante de superfície endotelial que contribui para a adesão leucocitária ao endotélio vascular (Diamond et al., 1990; Marlin e Springer, 1987). Os resultados mostraram uma redução do influxo celular ao sítio inflamatório nos animais ICAM-1^{-/-} submetidos à AZy ou PZy, quando comparado aos animais selvagens. Essa redução só alcançou significância estatística nos animais submetidos à artrite. Esse resultado pode indicar uma maior participação de ICAM-1 na modulação da migração leucocitária na sinóvia, quando comparado ao peritônio.

A administração do inibidor não seletivo de NOS, Nitro-L-arginina (Nitro), promoveu uma redução no influxo celular na artrite por zymosan, tanto nos animais selvagens quanto naqueles ICAM-1^{-/-}. Entretanto, a administração de Nitro não modificou o influxo celular nos animais ICAM-1^{-/-} submetidos à peritonite por zymosan, diferentemente ao aumento observado quando se administrou Nitro-L-arginina em animais selvagens submetidos à peritonite por zymosan. Como exposto acima, ICAM-1 é tido como uma molécula presente na superfície endotelial que participa do processo de adesão de neutrófilos, macrófagos e linfócitos ao endotélio (Diamond et al., 1990; Marlin e Springer, 1987) e que cuja expressão parece estar diminuída na presença de NO (Lefer e Lefer, 1999). Em conjunto, os nossos resultados obtidos com os animais geneticamente manipulados mostram a participação de ICAM-1 na modulação do influxo celular na cavidade articular e peritoneal. Ainda, a diferença do efeito dos inibidores de NOS sobre o influxo celular em ambas as cavidades, promovendo aumento da migração no peritônio está associado à modulação da expressão dessa molécula de adesão pelo NO produzido a partir da ativação de NOSi.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nos modelos de artrite e peritonite animais apresentados nesse trabalho, concluímos:

- O óxido nítrico (NO), particularmente o produzido pela óxido nítrico sintase induzível (NOSi), modula a migração celular aguda de forma dependente do sítio inflamatório, mas independente do estímulo, da espécie e da via de administração;

- A modulação mediada pelo NO envolve a participação de células residentes e/ou migradas nos modelos experimentais de artrite e peritonite;

- Em ambos os modelos animais, o NO modula essa migração por uma via independente da liberação de leucotrieno B₄ (LTB₄);

- A molécula de adesão intercelular ICAM-1 participa da migração celular nos modelos experimentais estudados, principalmente no modelo de artrite;

- No modelo de peritonite induzida por zymosan (PZy), o NO age sobre a migração celular através de uma via dependente de ICAM-1.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJUEBOR, M.N., FLOWER, R.J., HANNON, R., et al. Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 recruits monocytes in the zymosan peritonitis model. **J. Leukoc. Biol.**, **63**: 108-116, 1998a.

AJUEBOR, M.N., VIRAG, L., FLOWER, R.J., PERRETTI, M. and SZABO, C. Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of neutrophil migration in zymosan-induced inflammation. **Immunology**, **95**: 625-630, 1998b.

ALTEN, R., GROMNICA-IHLE, E., POHL, C., EMMERICH, J., STEFFGEN, J., ROSCHER, R., SIGMUND, R., SCHMOLKE, B. and STEINMANN, G. Inhibition of leukotriene B₄-induced CD11B/CD18 (Mac-1) expression by BIIL 284, a new long acting LTB₄ receptor antagonist, in patients with rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, **63**: 170-176, 2004.

ARMOUR, K.E., van't HOF, R.J., GRABOWSKI, P.S., et al. Evidence for a pathogenic role of nitric oxide in inflammatory-induced osteoporosis. **J. Bone Miner. Res.**, **14**: 2137-2142, 1999.

ARMSTEAD, V.E., MINCHENCO, A.G., SCHUHL, R.A., et al. Regulation of P-selectin expression in human endothelial cells by nitric oxide. **Am. J. Physiol.**, **273**: H740-H746, 1997.

ARMSTRONG, R. The physiological role and pharmacological potential of nitric oxide in neutrophil activation. **International Immunopharmacology**, **1**: 1501-1512, 2001.

ARNOLD, W.P., MITTAL, C.K., KATSUKI, S. and MURAD, F. Nitric oxide activate guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **74**: 3203-3207, 1977.

ARNAOUT, M.A. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. **Blood**, **75**: 1037-1050, 1990.

BAEUEERLE, P.A. and HENKEL, T. Function and activation of NF- κ B in the immune system. **Annu. Rev. Immunol.**, **12**: 141-179, 1994.

BAEUERLE, P.A. and BALTIMORE, D. NF- κ B: Ten years after. **Cell**, **87**: 13-20, 1996.

BAINTON, D.F. Developmental biology of neutrophil and eosinophils. In Gallin J.I, Goldstein, I.M., Snyderman, R.(eds). Inflammation. **Basic Principles and Clinical Correlates**, 2nd ed. New York, Raven Press, 1992, pp 303-324.

BALDWIN, A.S.J. The NK- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. **Annu. Rev. Immunol.**, **14**: 649-683, 1996.

BAUEROVA, K. and BEZEK, A. Role of reactive oxygen and nitrogen species in etiopathogenesis of rheumatoid arthritis. **Gen. Physiol. Biophys.**, **18**:15-20, 1999.

BEAULIEU, A.D., LANG, F., BELLES-ISLES, M. and POUBELLE, P. Protein biosynthetic activity of polymorphonuclear leukocytes in inflammatory arthropathies: Increased synthesis and release of fibronectin. **J. Rheumatol.**, **14**: 656, 1987.

BEAUVAIS, F., MICHEL, L. and DUBERTRET, L. Exogenous nitric oxide elicits chemotaxis of neutrophils in vitro. **J. Cell. Physiol.**, **165**: 610-614, 1995.

BENJAMIM, C.F., FERREIRA, S.H. and CUNHA, F.Q. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. **The Journal of Infectious Diseases**, **182**: 214-223, 2000.

BENJAMIM, C.F. Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepse. **Medicina, Ribeirão Preto**, **34**: 18-26, jan./mar. 2001.

BEZERRA, M.M., BRAIN, S.D., GREENACRE, S., JERÔNIMO S.M.B., MELO L.B.D, KEEBLE, J. and ROCHA, F.A.C. Reactive nitrogen species scavenging, rather than nitric oxide inhibition, protects from articular cartilage damage in rat zymosan-induced arthritis. **British Journal of Pharmacology**, **141**: 172-182, 2004.

BRENNAN, F.M., MAINI, R.N. and FELDMANN, M. TNF- α – a pivotal role in rheumatoid arthritis? **Br. J. Rheumatol.**, **31**: 293-298, 1992.

BUTLER, A.R., FLITNEY, F.W. and WILLIAMS, D.L. NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. **Trends. Pharmacol. Sci.**, **16**: 18-22, 1995.

CANNON, G.W., OPENSHAW, S.J., HIBBS, J.B. Jr., et al. Nitric oxide production during adjuvant-induced and collagen-induced arthritis. **Arthritis Rheum.**, **39**: 1677-1684, 1996.
CARVALHO, M.H.C., NIGRO, D., LEMOS, V.S., TOSTES, R.C.A. and FORTES, Z.B. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Ver Brás Hipertens.**, **8(1)**: 76-88, 2001.

CASSATELLA, M.A., MEDA, L., BONORA, S., CESKA, M. and CONSTANTIN, G. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. **J. Exp. Med.**, **178**: 2207, 1993.

CLANCY, R.M., LESZCZYNSKA-PIZIAK, J. and ABRAMSON, S.B. Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. **J. Clin. Invest.**, **90**: 11156-1121, 1992.

CLANCY, R., LESZCZYNSKA, J., AMIN, A., LEVARTOVSKY, D. and ABRAMSON, S.B. Nitric oxide stimulates ADP ribosylation of actin in association with the inhibition of actin polymerization in human neutrophils. **J. Leukocyte Biol.**, **58**: 196-202, 1995.

COATES, N.J. and McCOLL, S.R. Production of chemokines in vivo in response to microbial stimulation. **J. Immunol.**, **166**: 5176-5182, 2001.

COLEMAN, J.W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **International Immunopharmacology**, **1**: 1397-1406, 2001.

CROOKS, S.W. and STOCKLEY, R.A. Leukotriene B₄. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, **30**: 173-178, 1998.

CROSARA-ALBERTO, D.P., DARINI, A.L.C., INOUE, R.Y., SILVA, J.S., et al. Involvement of NO in the failure of neutrophil migration in sepsis induced by *Staphylococcus aureus*. **British Journal of Pharmacology**, **136**: 645-658, 2002.

CUZZOCREA, S., ZINGARELLI, B., SAUTEBIN, L., et al. Multiple organ failure following zymosan-induced peritonitis is mediated by nitric oxide. **Shock.**, **8**: 268-275, 1997.

DAVENPECK, K.L., GAUTHIER, T.W. and LEFER, A.M. Inhibition of endothelial-derived nitric oxide promotes P-selectin expression and actions in the rat microcirculation. **Gastroenterology**, **107**: 1050-1058, 1994.

De CATERINA, R., LIBBY, P., PENG, H.B., THANNICKAL, V.J., RAJAVASHISTH, T.B., GIMBRONE Jr, M.A., SHIN, W.S. and LIAO, J.K. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. **J. Clin. Invest.**, **96**: 60-68, 1995.

DIAMOND, M.S., STAUMION, D.E., De FOUGEROLLES, A.R., STACKER, S.A., GAREIA-AGUILAR, J., HIBBS, M.L., et al. icam-1 (cd54): A COUNTER-RECEPTOR FOR Mac-1 (CD11b/CD18). **J. Cell Biol.**, **111**: 3129-3139, 1990.

DOWNEY, G.P. Mechanisms of leukocyte motility and chemotaxis. **Curr. Opin. Immunol.**, **6**: 113-124, 1994.

DUSTIN, M.L., STAUNTON, D.E. and SPRINGER, T.A. Supergene families meet in the immune system. **Immunol Today**, **9**: 213, 1988.

EVANS, C.H. and STEFANOVIC-RACIC, M. Nitric oxide in arthritis. **METHODS: A Companion to Methods in Enzymology**, **10**: 38-42, 1996.

FACCIOLI, L.H., NOURSCHARGH, S., MOQBEL, R., WILLIAMS, F.M., SEHMI, R., KAY, A.B. and WILLIAMS, T.J. The accumulation of ¹¹¹In-eosinophils induced by inflammatory mediators in vivo. **Immunology**, **73**: 22-227, 1991.

FARRELL, A.J., BLAKE, D.R., PALMER, R.M. and MONCADA, S. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in reumatic diseases. **Ann. Rheum. Dis.**, **51**: 1219-1222, 1992.

FERREIRA, H.H.A., MEDEIROS, M.V., LIMAS, C.S.P., et al. Inhibition of eosinophil chemotaxis by chronic blockade of nitric oxide biosynthesis. **Eur. J. Pharmacol.**, **55163**: 1-7, 1996.

FINGER, E.B., BRUEHL, R.E., BAINTON, D.F. and SPRINGER, T.A. A differential role for cell shape in neutrophil tethering and rolling on endothelial selectins under flow. **J. Immunol.**, **157**: 5085-5096, 1996.

FÖRSTERMANN, U., MÜLSCH, A., BÖHME, E. and BUSSE, R. Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries. **Cir. Res.**, **58**: 531-538, 1986.

FRATICELLI, A., SERRANO, C.V.Jr., BOCHNER, B.S., CAPOGROSSI, M.C. and ZWEIER, J.L. Hydrogen peroxide and superoxide modulate leukocyte adhesion molecule expression and leukocyte endothelial adhesion. **Biochim. Biophys. Acta**, **1310(3)**: 251-259, 1996.

FURCHGOTT, R.F. and ZAWADZKI, J.W. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, **228**:373-376, 1980.

FURCHGOTT, R.F. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid-activatable inhibitory factor from retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. **In: Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves and Endothelium**, pp: 401-414, Raven Press, New York, 1988.

GABOURY, J., WOODMAN, R.C., GRANGER, D.N., REINHARDT, P. and KUBES, P. Nitric oxide prevents leukocyte adherence: role of superoxide. **Am. J. Physiol.**, **265**: H862-H867, 1993.

GALLIN, J.I. Disorders of phagocytic cells. In Gallin, J.L., Goldsein, I.M., Snyderman, R. (eds). **Inflammation. Basic Principles and Clinical Correlates**, 2 nd ed. New York, Raven Press, 1992, pp 859-874.

GAUTHIER, T.W., DAVENPECK, K.L. and LEFER, A.M. Nitric oxide attenuates leukocyte-endothelial interaction via P-selectin in splanchnic ischemia-reperfusion. **Am. J. Physiol.**, **267**: G562-G568, 1994.

GEGOUT, P., GILLET, P., CHEVRIER, D., et al. Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat: effects on joint inflammation and cartilage metabolism. **Life Sci.**, **55(17)**: 321-326, 1994.

GLEZER, I., MARCOURAKIS, T., AVELLAR, M.C.W., GORENSTEIN, C. and SCAVONE, C. O fator de transcrição NF- κ B nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, **22(1)**: 26-30, 2000.

GRANGER, D. N. and KUBES, P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. **J. Leukocyte Biol.**, **55**: 662-675, 1994.

GREENACRE, S., BEZERRA, M.M., ROCHA, F.A.C. and BRAIN, S. Correlation between neutrophil accumulation and protein nitration in zymosan-induced inflammation in the rat. **J. Physiol., Scientific Meeting, King's College London**, 2000.

GRIFFITHS, M.J.D., MESSENT, M., MacALLISTER, R.J. and EVANS, T.W. Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase. **Br. J. Pharmacol.**, **110**: 963-968, 1993.

GRISHAM, M.B., GRANGER, D.N. and LEFER, D.J. Modulation of leukocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease. **Free Radic. Biol. Med.**, **25**: 404-433, 1998.

HAELENS, A., WUYTS, A., PROOST, P., STRUYF, S., OPDENNAKER, G. and Van DAMME, J. Leukocyte migration and activation by murine chemokines. **Immunobiology**, **195**: 499, 1996.

HARRIS Jr, E.D. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. **N Engl. J. Med.**, **322(18)**:1277-1289, 1990.

HASKÓ, G., VIRÁG, L., EGNACZYK, G., SALZMAN, A.L. and SZABÓ, C. The crucial role of IL-10 in the suppression of the immunological response in mice exposed to staphylococcal enterotoxin. **B. Eur. J. Immunol.**, **28**: 1417, 1998.

HELIOVAARA, M., AHO, K., AROMAA, A., KNEKT, P. and REUNANEN, A. Smoking and risk of rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol.**, **20**: 1830-1835, 1993.

HICKEY, M.J., SHARKEY, K.A., SIHOTA, E.G., REINHARDT, P.H., MACMICKING, J.D., NATHAN, C. and KUBES, P. Inducible nitric oxide synthase-deficient mice have enhanced leukocyte-endothelium interactions in endotoxemia. **The FASEB Journal**, **11**: 955-964, 1997.

HICKEY, M.J. Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of leucocyte recruitment. **Clinical Science**, **1000**: 1-12, 2001.

HOBBS, A.J., HIGGS, A. and MONCADA, S. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, **39**: 191-220, 1999.

HOCHBERG, M.C. and SPECTOR, T.D. Epidemiology of rheumatoid arthritis: update. **Epidemiol. Rev.**, **12**: 247-252, 1990.

HOLDSWORTH, S.R. and BELLOMO, R. Differential effects of steroids on leukocyte-mediated glomerulonephritis in the rabbit. **Kidney Int.**, **26**: 162-169, 1984.

IALENTI, A., IANARO, A., MAFFIA, P., SAUTEBIN, L. and Di ROSA, M. Nitric oxide inhibits leukocyte migration in carrageenin-induced rat pleurisy. **Inflamm. Res.**, **49**: 411-417, 2000.

IGNARRO, L.J., BYRNS, R.E. and WOOD, K.S. Biochemical and pharmacological properties of endothelium-derived relaxing factor and its similarity to nitric oxide radical. **In: Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves and Endothelium**, pp. 427-436, Raven Press, New York, 1988.

IGNARRO, L.J. Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. **Biochem. Pharmacol.**, **41**: 485-490, 1991.

JANG, D. and MURRELL, G.A. Nitric oxide in arthritis. **Free Radic. Biol. Med.**, **24(9)**: 1511-1519, 1998.

JARVINEN, T.A., MOILANEN, T., JARVINEN, T.L. and MOILANEN, E. Endogenous nitric oxide and prostaglandin E2 do not regulate the synthesis of each other in interleukin-1 beta-stimulated rat articular cartilage. **Inflammation**, **20(6)**: 683-392, 1996.

KAPLAN, S.S., BILLIAR, T., CURRAN, R.D., ZDZIARSKI, U.E., SIMMONS, R.L. and BASFORD, R.E. Inhibition of chemotaxis with N^G-monomethyl-L-arginine: A role for cyclic GMP. **Blood**, **74**: 1885-1887, 1989.

KARLSON, E.W., LEE, I. M., COOK, N.R., MANSON, J.E., et al. A retrospective cohort study of cigarette smoking and risk of rheumatoid arthritis in female health professionals. **Arthritis Rheum.**, **42**: 910-917, 1999.

KHAN, B.V., HARRISON, D.G., OLBRYCH, M.T., ALEXANDER, R.W. and MEDFORD, R.M. Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **93**: 9114-9119, 1996.

KIM, Y.M., BERGONIA, H. and LANCASTER, J.R. Nitrogen oxide-induced autoprotection in isolated rat hepatocytes. **FEBS LETT.**, **374**: 228-232, 1995.

KOARAI, A., ICHINOSE, M., SUGIURA, H., et al. Allergic airway hyperresponsiveness and eosinophil infiltration is reduced by a selective iNOS inhibitor, 1400W, in mice. **Pulm Pharmacol. Ther.**, **13**: 267-275, 2000.

KOLACZKWSKA, E., SELJELID, R. and PLYTYCZ, B. Role of mast cells in zymosan-induced peritoneal inflammation in Balb/c and mast cell-deficient WBB6F1 mice. **J. Leukoc. Biol.**, **69**: 33-42, 2001.

KORCHAK, H.M., VIENNE, K., RUTHERFORD, L.E. and weissmann, g. Neutrophil stimulation: Receptor, membrane, and metabolic events. **Fed Proc.**, **43**: 2749, 1984.

KUBES, P., SUZUKI, M. and GRANGER, D.N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **88**: 4651-4655, 1991.

KUBES, P. and GRANGER, D.N. Nitric oxide modulates microvascular permeability. **Am. J. Physiol.**, **262**: H611-H615, 1992.

KUBES, P., KANWAR, S., NIU, X.F. and GABOURY, J.P. Nitric oxide synthesis inhibition induces leukocyte adhesion via superoxide and mast cells. **FASEB J.**, **7**: 1293-1299, 1993.

LANDER, H.M., SEHAJPAL, P., LEVINE, D.M. and NOVOGRODSKY, A. Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nitric oxide-generating compounds. **J. Immunol.**, **150**: 1509-1516, 1993.

LEFER, A.M. and LEFER, D.J. The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion. **Cardiovasc. Res.**, 32: 743-751, 1996.

LEFKOWITZ, D.L., GELDERMAN, M.P., FUHRMANN, S.R., et al. Neutrophilic myeloperoxidase-macrophage interactions perpetuate chronic inflammation associated with experimental arthritis. **Clin. Immunol.**, 91(2): 145-155, 1999.

LUSTER, A.D. Chemokines- chemotactic cytokines that mediate inflammation. **N. Engl. J. Med.**, 338: 436, 1998.

LYENGAR, R., STUEHR, D.J. and MARLETTA, M.A. Macrophage synthesis of nitrite, nitrate and N-nitrosamines: precursors and role of respiratory burst. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 84: 6369-6373, 1987.

MARKENSON, J.A. Worldwide trends in the socioeconomic impact in the long-term prognosis of rheumatoid arthritis. **Semin. Arthritis Rheum.**, 21:4-12, 1991.

MARLIN, S.D. and SPRINGER, T.A. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). **Cell.**, 51: 813-819, 1987.

McCALL, T.B., FEELISCH, M., PALMER, R.M.J. and MONCADA, S. Identification of N-iminoethyl-L-ornithine as an irreversible inhibitor of nitric oxide synthase in phagocytic cells. **Br. J. Pharmacol.**, 102: 234-238, 1991.

McCANCE, K.L. and HUETHER, S.E. Pathophysiology: the biologic basis for disease in adults and children, 3rd edition, Mosby, St. Louis, 1998, pp. 217, 1576, 1577.

McCARTNEY-FRANCIS, N., ALLEN, J.B., MIZEL, D.E., et al. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. **J. Exp. Med.**, 178: 749-754, 1993.

McCOLL, S.R., PAQUIN, R., MENARD, C. and BEAULIEU, A.D. Human neutrophils produce high levels of the interleukin 1 receptor antagonist in response to granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha. **J. Exper. Med.**, 176: 593, 1992.

McINNES, I.B., LEUNG, B.P., FIELD, M., et al. Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients. **J. Exp. Med.**, 184: 1519-1524, 1996.

MELLO, S.B., NOVAES, G.S., LAURINDO, I.M., MUSCARA, M.N., MACIEL, F.M. and COSSERMELLI, W. Nitric oxide synthase inhibitor influences prostaglandin and interleukin-1 production in experimental arthritic joints. **Inflamm. Res.**, **46(2)**: 72-77, 1997.

MIYASAKA, N. and HIRATA, Y. Nitric oxide and inflammatory arthritides. **Life Sciences**, **61**: 2073-2081, 1997.

MONCADA, S., PALMER, R.M.J. and HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, **43**: 109-142, 1991.

MONCADA, S. and HIGGS, E.A. Mechanisms of disease. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N. Engl. Med.**, **329**: 2002-2012, 1993.

MONCADA, S. and HIGGS, E.A. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. **FASEB J.**, **9**:1319-1330, 1995.

MOSMANN, T.R. Properties and function of interleukin-10. **Adv. Immunol.**, **56**: 1, 1994.

MURAD, F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. **J. Clin. Invest.**, **78**: 1-5, 1987.

NADA, R., DATTA, U., DEODHAR, S.D. and SEHGAL, S. Neutrophil functions in rheumatoid arthritis. **Indian. J. Pathol. Microbiol.**, **42(3)**: 283-289, 1999.

NIU, X., SMITH, C.W. and KUBES, P. Intracellular oxidative stress induced by nitric oxide synthesis inhibition increases endothelial cell adhesion to neutrophils. **Circ. Res.**, **74**: 1133-1140, 1994.

NUNOSHIBA, T., DEROJAS-WALKER, T., WISHNOK, J.S., TANNENBAUM, S.R. and DEMPLE, B. Activation by nitric oxide of an oxidative-stress response that defends *Escherichia coli* against activated macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **90**: 9993-9997, 1993.

OLIVEIRA, R.C., OLIVEIRA, K.R.B., ARAGÃO Jr, A.G.M., RIBEIRO, R.A. and ROCHA, F.A.C. Papel de eicosanóides na artrite induzida por zymosan. XII Reunião Anual da FESBE – Resumo 14048, 1997.

O'NEILL, L.A.J. and KALTSCHMIDT, C. NF- κ B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. **TINS**, **20**: 252-258, 1997.

OYANAGUI, Y. Nitric oxide and superoxide radical are involved in both initiation and development of adjuvant arthritis in rats. **Life Sci.**, **54(17)**: PL285-289, 1994.

PALMER, R.M.J., FERRIGE, A.G. and MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, **327**: 524-526, 1987.

PAYA, M. PASTOR, P.G., COLOMA, J. and ALCARAZ, M.J. Nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase pathways in the inflammatory response induced by zymosan in the rat air pouch. **Br. J. Pharmacol.**, **120(8)**: 1445-1452, 1997.

PELLETIER, J.P., JONANOVIC, D.V., LASCAU-COMAN, V., et al. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces progression of experimental osteoarthritis in vivo: possible link with the reduction in chondrocyte apoptosis and caspase 3 level. **Arthritis Rheum.**, **43(6)**: 1290-1299, 2000.

PENG, H.B., LIBBY, P. and LIAO, J.K. Induction and stabilization of iNOS by nitric oxide mediates inhibition of NF- κ B. **The American Society for Biochemistry and Molecular Biology**, **270(23)**: 14214-14219, 1995.

PERRETTI, M., SZABÓ, C. and THIEMERMANN, C. Effect of interleukin-4 and interleukin-10 on leucocyte migration and nitric oxide production in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, **116**: 2251, 1995.

POBER, J.S. and COTRAN, R.S. The role of endothelial cells in inflammation. **Transplantation**, **4(50)**: 537-544, 1990.

PRUEFER, D., SCALIA, R. and LEFER, A.M. Homocysteine provokes leukocyte-endothelium interaction by downregulation of nitric oxide. **General Pharmacol.**, **33**: 487-498, 1999.

RADOMSKI, M.W., PALMER, R.M.J. and MONCADA, S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. **Lancet**, **2**: 1057-1058, 1987.

ROCHA, F.A.C., ANDRADE, L.E.C. and JANCAR, S. Immune complex induced arthritis in rats: role of lipid mediators on cell infiltration. **Mediators of Inflammation**, **5**: 104-109, 1996.

ROCHA, F.A.C., ARAGÃO Jr, A.G.M., OLIVEIRA, R.C., POMPEU, M.M.L., VALE, M.R. and RIBEIRO, R.A. Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. **Inflamm. Res.**, **48**: 485-490, 1999.

ROCHA, J.C.S. PEIXOTO, M.E.B., JANCAR, S., CUNHA, F.Q., RIBEIRO, R.A. and ROCHA, F.A.C. Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymosan-induced arthritis in rats. **Br. J. Pharmacol.**, **136**: 588-596, 2002.

ROCHA, F.A.C., ROCHA, J.C.S., PEIXOTO, M.E.B., JANCAR, S., CUNHA, F.Q. and RIBEIRO, R.A. Efeito de inibidores da sintase de óxido nítrico na dor inflamatória articular e influxo celular da artrite induzida por zymosan em ratos. **Rev. Bras. Reumatol.**, **43(4)**: 206-217, 2003.

ROCHA, F.A.C., TEIXEIRA, M.M., ROCHA, J.C.S., GIRÃO, V.C.C., BEZERRA, .M., RIBEIRO R.A. and CUNHA, F.Q. Blockade of leukotriene B₄ prevents articular incapacitation in rat zymosan-induced arthritis. **European Journal of Pharmacology**, **497**: 81-86, 2004.

ROLLINS, B.J. Chemokines. **Blood**, **90**: 909, 1997.

ROSS, R. and RESKE-KUNZ, A.B. The role of nitric oxide in contact hypersensitivity. **Int. Immunopharmacol.**, **1**:1469-1478, 2001.

SATO, Y., WALLEY, K.R., KLUT, M.E., et al. Nitric oxide reduces the sequestration of polymorphonuclear leukocytes in lung by changing deformability and CD 18 expression. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, **159**: 1469-1476, 1999.

SAUTEBIN, L. Prostaglandins and nitric oxide as molecular targets for anti-inflammatory therapy. **Fitoterapia**, **71**: S48-S57, 2000.

SCHMID-SCHONBEIN, G.W., USAMI, S., SKALAK, R., CHIEN, S. The interaction of leukocytes and erythrocytes in capillary and post-capillary vessels. **Microvasc. Res.**, **19**: 45-70, 1980.

SECCO, D.D., PARON, J.A., De OLIVEIRA, S.H.P., et al. Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. **Nitric Oxide**, **9**: 153-164, 2003.

SEELY, A.J.E., PASCUAL, J.L. and CHRISTOU, N.V. Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. **Critical Care**, **7**: 291-307, 2003.

SILMAN, A.J., NEWMAN, J. and MacGREGOR, A.J. Cigarette smoking increases the risk of rheumatoid arthritis. Results from nationwide study of disease-discordant twins. **Arthritis Rheum.**, **39**: 732-735, 1996.

SPECTOR, T.D. Rheumatoid Arthritis. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, **16**: 513-537, 1990.

SPIECKER, M., DARIUS, H., KABOTH, K., et al. Differential regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by nitric oxide donors and antioxidants. **J. Leukoc. Biol.**, **63**: 732-739, 1998.

SPRINGER, T.A. Traffic signals for lymphocyte circulation and leukocyte migration: the multistep paradigm. **Cell**, **76**: 301, 1994.

STAMLER, J.S. Redox signalling: nitroylation and related target interactions of nitric oxide. **Cell**, **78**: 931-936, 1994.

STAUNTON, D.E., DUSTIN, M.L. and SPRINGER, T.A. Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. **Nature**, **339**: 61, 1989.

STAVARU, C., DOLGANIUC, A., BALTARU, D. and OLINESCU, A. The levels of neutrophils oxidative burst in rheumatic disorders. **Roum. Arch. Microbiol. Immunol.**, **58** (3-4): 241-248, 1999.

STEFANOVIC-RACIC, M., STADLER, J. and EVANS, C.H. Nitric oxide and arthritis. **Arthritis and Rheumatism.**, **36**: 1036-1044, 1993.

STEFANOVIC-RACIC, M., MEYERS, K., MESCHTER, C., et al. N-monomethyl arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, suppresses the development of adjuvant arthritis in rats. **Arthritis Rheum.**, **37**: 1062-1069, 1994.

STICHTENOTH, D.O., FAULER, J., ZEIDLER, H. and FRÖLICH, J.C. Urinary nitrate excretion is increased in patients with rheumatoid arthritis and reduced by prednisolone. **Ann. Rheum. Dis.**, **54**: 820-824, 1995.

STICHTENOTH, D.O. and FRÖLICH, J.C. Nitric oxide and inflammatory joint diseases. **British Journal of Rheumatology**, **37**: 246-257, 1998.

TADIMETI, S.R., CURRIE, J.L., SHAFFER, A.F. and ISAKSON, P.C. In vivo characterization of zymosan-induced mouse peritoneal inflammation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **269**:917-925, 1994.

TASKIRAN, D., STEFANOVIC-RACIC, M., GEORGESCU, H. and EVANS, C. Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **200**: 142-148, 1994.

TAVARES-MURTA, B.M., CUNHA, F.Q. and FERREIRA, S.H. The intravenous administration of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-8 and macrophage-derived neutrophil chemotactic factor inhibits neutrophil migration by stimulating nitric oxide production. **Br. J. Pharmacol.**, **124**: 1369-1374, 1998.

TAVARES-MURTA, B.M., MACHADO, J.S., FERREIRA, S.H. and CUNHA, Q.F. Nitric oxide mediates the inhibition of neutrophil migration induced by systemic administration of LPS. **Inflammation**, **25(4)**: 247-253, 2001.

TEIXEIRA, M.M., WILLIAMS, T.J. and HELLEWELL, P.G. E-type prostaglandins enhance local oedema formation and neutrophil accumulation but suppress eosinophil accumulation in guinea pig skin. **Br. J. Pharmacol.**, **110**: 416-422, 1993.

TIKU, K., TIKU, M.S. and SKOSEY, J.L. Interleukin 1 production by human polymorphonuclear neutrophils. **J. Immunol.**, **136**: 3677, 1986.

TSAO, P.S., McEVOY, L.M., DREXLER, H., BUTCHER, E.C. and COOKE, J.P. Enhanced endothelial adhesiveness in hypercholesterolemia is attenuated by L-arginine. **Circulation**, **89**: 2176-2182, 1994.

UEKI, Y., MIYAKE, S., TOMINAGA, Y. and KGUCHI, K. Increased nitric oxide levels in patients with rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol.**, **230**: 230-236, 1996.

Van UFFLELEN, B.E., De KOSTER, B.M., Van Den BROEK, P.J., VANSTEVENINCK, J. and ELFERINK, J.G. Modulation of neutrophil migration by exogenous gaseous nitric oxide. **J. Leukocyte Biol.**, **60**: 94-100, 1996.

VERMEIRE, K., THIELEMANS, L., MATTHYS, P. and BILLIAU, A. The effects of NO synthase inhibitors on murine collagen-induced arthritis do not support a role of NO in the protective effect of IFN-gama. **J. Leukoc. Biol.**, **68(1)**: 119-124, 2000.

VICTOR, M.V., ROCHA, M. and de la FUENTE, M. Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. **International Immunopharmacology**, **4**: 327-347, 2004.

WANDALL, J.H. Function of exudative neutrophilic granulocytes in patients with Crohn's disease or ulcerative colitis. **Scand. J. Gastroenterol.**, **20**: 1155-1156, 1985.

WANIKIAT, P., WOODWARD, D.F. and ARMSTRONG, R.A. Investigation of the role of nitric oxide and cyclic GMP in both the activation and inhibition of human neutrophils. **Br. J. Pharmacol.**, **122**: 1135-1145, 1997.

WEISSMANN, G. and KORCHAK, H. Rheumatoid arthritis. The role of neutrophil activation. **Inflammation**, **8**: S3-S14, 1984.

WINK, D.A., HANBAUER, I., GRISHAM, M.B., et al. Chemical biology of nitric oxide: regulation and protective and toxic mechanisms. **Curr. Top Cell Regul.**, **34**: 159-187, 1996.

WIPKE, B.T and ALLEN, P.M. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. **The Journal of Immunology**, **167**: 1601-1608, 2001.