PATRÍCIA MONACO BROSSI

**Avaliação dos efeitos antiinflamatórios da proteína antagonista de
receptor de interleucina-1 (IRAP) por citometria de fluxo em
líquido sinovial de equino**

São Paulo

2007

PATRÍCIA MONACO BROSSI

Avaliação dos efeitos antiinflamatórios da proteína antagonista de receptor de interleucina-1 (IRAP) por citometria de fluxo em líquido sinovial de eqüino

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:
Clínica Médica

Área de concentração:
Clínica Veterinária

Orientador:
Prof^a. Dr^a. Raquel Yvonne Arantes Baccarin

São Paulo

2007

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

8/

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP

10/17/07

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1869
FMVZ

Brossi, Patrícia Monaco

Avaliação dos efeitos antiinflamatórios da proteína antagonista de receptor de interleucina-1 (IRAP) por citometria de fluxo em líquido sinovial de equino / Patrícia Monaco Brossi. – São Paulo : P. M. Brossi, 2007.

108 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, 2007.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Raquel Yvonne Arantes Baccarin.

1. Equínos. 2. Líquido sinovial. 3. Osteoartrite. 4. Citometria de fluxo.
5. Irap I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação dos efeitos antiinflamatórios da proteína antagonista de receptor de interleucina-1 por citometria de fluxo em líquido sinovial de equino", protocolado sob o nº1142/2007, utilizando 45 (quarenta e cinco) equinos, sob a responsabilidade da Profa Dra Raquel Yvonne Arantes Baccarin, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Cytometry flow techniques for evaluation of anti-inflammatory effects of the interleukin-1 receptor antagonist protein in equine synovial fluid", protocol number 1142/2007, utilizing 45 (forty five) equines, under the responsibility Profa Dra Raquel Yvonne Arantes Baccarin, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting.

São Paulo, 04 de julho de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BROSSI, Patrícia Monaco

Título: Avaliação dos efeitos antiinflamatórios da proteína antagonista de receptor de interleucina-1 (IRAP) por citometria de fluxo em líquido sinovial de equino

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIAS

Aos meus pais, por terem me dado
vida, amor e princípios.

Aos meus irmãos, pelo conhecimento do
que é o fraterno.

Ao Ricardo, que tem resistido bravamente, por todos
estes anos, na condição de meu futuro marido.

A Maria Augusta, minha filha querida, pela generosidade
com que me acolheu em seu ventre.

AGRADECIMENTOS,

... por ordem de aparição...

...Ao “Loro”, que povoou meus primeiros anos de vida com o ruído dos cascos dos cavalos e o cheiro dos arreios.

...À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, onde me realizei pela segunda vez.

... Ao Dr. Guilherme Laguna, que me emprestou a chave do armário de vidro.

... À Jú, irmã que o destino me deu, cheia de cachos, de doçura e de fé, sem a qual, nada do que realizei seria possível.

... Aos Professores Doutores Carlos Eduardo Larsson e Luís Cláudio Lopes Correia da Silva, pelo exemplo profissional e pela atenção a mim dispensada no decorrer deste trabalho.

... Aos residentes e a todos os funcionários do HOVET/FMVZ-USP pela inestimável ajuda nas coletas.

... A todos os animais que as suportaram.

....À Prof. Dra. Cristina de O. Massoco Salles Gomes por todos os ensinamentos, idéias, palavras de carinho e todas as tardes deliciosas, frutíferas e intrigantes no laboratório do VPT.

... À todo pessoal da Fazenda Santa Rita- Piracaia- São Paulo, por ter disponibilizado seus animais, viabilizando a obtenção de material.

... À Dra Márcia, pelo auxílio na análise das amostras, madrugada a dentro.

... Ao Prof. Dr. Juarez Pinto Fernandes Távora e equipe do Instituto Butantan pelo empréstimo dos animais e pela gentil acolhida.

...À Andréa Parra, pelo auxílio durante as coletas no Instituto Butantan.

...À Médica Veterinária Fernanda Bicudo César pela grande ajuda no levantamento bibliográfico.

... À Médica Veterinária Flávia Bonizzi que pacientemente transportou as amostras, sobrevivendo ao trânsito das marginais.

... À Dra. Alma Y. A. Hoge, do Laboratório Hípico de São Paulo, pelo processamento das amostras e paciência com os meus horários.

... Aos proprietários dos queridos ***Mastricht, Nick, Guido, Laudatio, Young, Rebeca, Reno***: Micheline Schultz, Lindinha Macedo, Renata Ribeiro, Jorge Rocha e Romeu Ferreira Leite, pela generosidade com a minha curiosidade e pela oportunidade de conviver com estes animais.

... À Dra, Carla Belli pelo auxílio na revisão bibliográfica.

À minha orientadora, Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin, a quem devo a oportunidade de ter iniciado este trabalho e todos os méritos de vê-lo finalizado;

À minha querida amiga Raquel, pela insuspeitada doçura, pelo carinho e por resistir todos estes anos – e especialmente nos últimos meses - à minha desorientação,

Agradeço especialmente.

RESUMO

BROSSI, P. M. **Avaliação dos efeitos antiinflamatórios da proteína antagonista de receptor de interleucina-1 (IRAP) por citometria de fluxo em líquido sinovial de equino.** [Evaluation of the anti-inflammatory effects of the interleukin-1 receptor antagonist protein in equine synovial fluid using flow cytometric techniques]. 2007. 108 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

A doença articular, especificamente a osteoartrite é uma das enfermidades mais prevalentes e mais debilitantes que acomete os cavalos, tendo um grande impacto econômico na indústria eqüina. Assim sendo, a investigação contínua e avanços na área terapêutica são de fundamental importância. A osteoartrite é uma doença degenerativa que pode ser deflagrada por uma série de fatores e onde, ultimamente, todos os tecidos articulares encontram-se comprometidos. Não obstante, é na degradação da matriz extracelular da cartilagem articular que ocorrem os eventos de maior expressão e repercussão. Na gênese da degradação da matriz extracelular encontra-se um desequilíbrio entre os processos anabólicos e catabólicos responsáveis pela homeostase normal da cartilagem articular e pela adaptação deste tecido às forças que sobre ele incidem. Estes processos são orquestrados por proteínas anabólicas, como, por exemplo o fator de crescimento tipo insulina 1 (IGF-1), e por citocinas inflamatórias que, de forma contrária, são responsáveis pela depleção de colágeno e de proteoglicanas da matriz, representando o grupo de proteínas catabólicas, cujo exemplo clássico é a interleucina-1. A interleucina-1 tem papel central nos processos fisiopatológicos da osteoartrite por desencadear vários eventos catabólicos nos sinoviócitos e condrócitos, incluindo a indução de gens de metaloproteinases e agreganases e de outros mediadores inflamatórios como a cicloxigenase, a prostaglandina E2 e as espécies reativas do oxigênio. Seus efeitos biológicos se verificam após a ligação com dois tipos de receptores específicos e são modulados pela ocorrência natural de uma proteína antagonista destes receptores. O presente estudo procurou observar os efeitos antiinflamatórios desta proteína antagonista do receptor (IRAP) no líquido sinovial de equino através do emprego da técnica de citometria de fluxo. Nos ensaios observou-se que: 1-a adição de IRAP às células de líquido sinovial estimuladas *in vitro* por LPS e PMA reduziu a liberação de espécies reativas de oxigênio produzidas por elas; 2 – o plasma, quando utilizado como controle, exibiu efeitos semelhantes aos do IRAP sobre as células de líquido sinovial ativadas *in vitro*; 3- o efeito antiinflamatório deve-se mais à variação na intensidade de produção de espécies reativas do oxigênio do que à

flutuação no percentil de células do líquido sinovial engajadas em sua geração, *in vitro*. Estes resultados suportam a aplicabilidade terapêutica do IRAP® pelo efeito antiinflamatório verificado sobre as células do líquido sinovial avaliadas por citometria de fluxo. Eles corroboram, ainda, para o uso da citometria de fluxo como instrumento eficaz na avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio por células do líquido sinovial ativadas pelos estímulos de LPS e PMA, tanto quantitativamente como qualitativamente.

Palavras-chave: Equinos. Líquido sinovial. Osteoartrite. Citometria de fluxo. Irap

ABSTRACT

BROSSI, P. M. Evaluation of the anti-inflammatory effects of the interleukin-1 receptor antagonist protein in equine synovial fluid using flow cytometric techniques [Avaliação dos efeitos antiinflamatórios da proteína antagonista de receptor de interleucina-1 (IRAP) por citometria de fluxo em líquido sinovial de equino]. 2007. 108 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Joint disease in horses, specifically osteoarthritis, is one of the most prevalent and debilitating illnesses affecting equine industry and for this reason continued research and improvements in therapeutics are needed. Osteoarthritis is a degenerative disease that can be triggered by a number of factors and where ultimately all articular tissues are affected. The hallmark of osteoarthritis is the degeneration of the articular cartilage matrix, where the most relevant and expressive events take place. In the development of osteoarthritis there is disruption in extracellular matrix homeostasis with an overall balance toward cartilage metabolism. Homeostasis of the articular environment relies on balance between anabolic and catabolic events and results in ability of cartilage to respond to molecular or mechanical cues. This apparently antagonistic processes are orchestrated by soluble protein mediators, for example the anabolic insulin-like growth factor-I (IGF-I), and, on the other side, by inflammatory cytokines, which in turn, are implicated in degradative processes of articular cartilage, characteristic of osteoarthritis. They deplete cartilage matrix from collagen and proteoglycans and the classical example of such a cytokine is interleukin-1. Interleukin-1 has a central role in the physiopathologic processes of osteoarthritis and has been implicated in the genesis of a number of catabolic events when acting on chondrocytes and synoviocytes. Examples are gene induction for metalloproteinases and aggrecanases production, as well as production of other inflammatory mediators like cicloxygenase, prostaglandin E2 and oxygen-derived reactive species. Its biological effects are observed after interaction with two different but specific types of receptors and are modulated by the occurrence of a natural antagonist, the interleukin-1 receptor antagonist protein (IRAP). In the present study the anti-inflammatory effects of this antagonist protein were evaluated in synovial fluid using cytometric flow techniques. It was observed that: 1- addition of IRAP to synovial fluid cells stimulated *in vitro* by LPS and PMA reduced the production of oxygen-derived reactive species; 2- plasma, used as a control, exhibited similar effects on activated synovial cells when compared to IRAP *in*

vitro; 3- the anti-inflammatory effect is due, in its majority, to the variation in intensity of oxygen-derived reactive species, more than on fluctuations on the percentage of synovial fluid cells actively engaged in its generation *in vitro*. These results support the therapeutic applicability of IRAP® for its anti-inflammatory effect observed on synovial fluid cells evaluated with flow cytometric techniques. They also corroborate to the usefulness of cytometric flow techniques in equine synovial fluid cells; they are an invaluable tool to evaluate quantitative and qualitatively the production of oxygen-derived reactive species mediated by their activation with PMA and LPS.

Key words: Equine. Synovial fluid. Osteoarthritis. Flow cytometry . Irap

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Foto mostrando as esferas de vidro tratadas com sulfato de cromo contidas em seringa de 60mL, para obtenção do IRAP – São Paulo – 2007.....	60
Figura 2 -	Foto exemplificando o <i>Kit</i> comercial para obtenção do IRAP, composto de seringa, extensor e tampa – São Paulo – 2007.....	60
Figura 3 -	Foto do procedimento de retirada de sangue da veia jugular direita de um equino para obtenção do IRAP – São Paulo – 2007.....	61
Figura 4 -	Foto da seringa preenchida com sangue pronto para ser incubado a 37°C por 24 horas – São Paulo – 2007.....	62
Figura 5 –	Citograma de células do líquido sinovial de equinos, em ensaio prévio sem estímulo <i>in vitro</i> , com a separação em <i>gates</i> das populações de interesse: R1- células mononucleares, R2- células polimorfonucleares – São Paulo – 2007.....	66
Figura 6 –	Histograma da porcentagem de células do líquido sinovial de equinos produzindo EROS, em ensaio prévio sem estímulo <i>in vitro</i> – São Paulo – 2007.....	67
Figura 7 –	Citograma de células do líquido sinovial de equinos, em ensaio após adição de PMA <i>in vitro</i> , com a separação em <i>gates</i> das populações de interesse: R1- células mononucleares, R2- células polimorfonucleares – São Paulo – 2007.....	68
Figura 8 –	Histograma da porcentagem de células do líquido sinovial de equinos produzindo EROS, após adição de PMA <i>in vitro</i> – São Paulo – 2007.....	68
Figura 9 –	Citograma de células do líquido sinovial de equinos, em ensaio após adição de LPS <i>in vitro</i> , com a separação em <i>gates</i> das populações de interesse: R1- células mononucleares, R2- células polimorfonucleares – São Paulo – 2007.....	69
Figura 10 –	Histograma da porcentagem de células do líquido sinovial de equinos produzindo EROS, após adição de LPS <i>in vitro</i> – São Paulo – 2007.....	69
Figura 11 –	Citograma de células do líquido sinovial de equinos, em ensaio após adição de PMA e IRAP <i>in vitro</i> , com a separação em <i>gates</i> das populações de interesse: R1- células mononucleares, R2- células polimorfonucleares – São Paulo – 2007.....	70
Figura 12 –	Histograma da porcentagem de células do líquido sinovial de equinos produzindo EROS, após adição de PMA e IRAP <i>in vitro</i> – São Paulo – 2007.....	70

Figura 13 – Citograma de células do líquido sinovial de eqüinos, em ensaio após adição de LPS e IRAP <i>in vitro</i> , com a separação em <i>gates</i> das populações de interesse: R1- células mononucleares, R2- células polimorfonucleares – São Paulo – 2007.....	71
Figura 14 – Histograma da porcentagem de células do líquido sinovial de eqüinos produzindo EROS, após adição de LPS e IRAP <i>in vitro</i> – São Paulo – 2007.....	71
Figura 15 – Citograma de células do líquido sinovial de eqüinos, em ensaio após adição de plasma <i>in vitro</i> , com a separação em <i>gates</i> das populações de interesse: R1- células mononucleares, R2- células polimorfonucleares – São Paulo – 2007.....	72
Figura 16 – Histograma da porcentagem de células do líquido sinovial de eqüinos produzindo EROS, após adição de plasma <i>in vitro</i> – São Paulo – 2007.....	72
Figura 17 – Citograma de células do líquido sinovial de eqüinos, em ensaio após adição de PMA e plasma <i>in vitro</i> , com a separação em <i>gates</i> das populações de interesse: R1- células mononucleares, R2- células polimorfonucleares – São Paulo – 2007.....	73
Figura 18 – Histograma da porcentagem de células do líquido sinovial de eqüinos produzindo EROS, após adição de PMA e plasma <i>in vitro</i> – São Paulo – 2007.....	73
Figura 19 – Citograma de células do líquido sinovial de eqüinos, em ensaio após adição de LPS e plasma <i>in vitro</i> , com a separação em <i>gates</i> das populações de interesse: R1- células mononucleares, R2- células polimorfonucleares – São Paulo – 2007.....	74
Figura 20 – Histograma da porcentagem de células do líquido sinovial de eqüinos produzindo EROS, após adição de LPS e plasma <i>in vitro</i> – São Paulo – 2007.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Porcentagem (média e desvio padrão) de células totais, células mononucleares (R1) e polimorfonucleares (R2) produzindo EROs, frente a diferentes estímulos <i>in vitro</i> , realizada em três <i>pools</i> de células do líquido sinovial de equinos – São Paulo – 2007.....	76
Tabela 2 – Intensidade de fluorescência média (média e desvio padrão de valores arbitrários) de células totais, células mononucleares (R1) e polimorfonucleares (R2) pela produção intracelular de EROs, frente a diferentes estímulos <i>in vitro</i> , realizada em três <i>pools</i> de células do líquido sinovial de equinos – São Paulo – 2007.....	77
Tabela 3 – Porcentagem (média e desvio padrão) de células totais, células mononucleares (R1) e polimorfonucleares (R2) produzindo EROS, frente a adição de PMA, LPS e cinco IRAP <i>in vitro</i> , realizada em um <i>pool</i> de células do líquido sinovial de equinos – São Paulo – 2007.....	80
Tabela 4 – Intensidade de fluorescência média (média e desvio padrão de valores arbitrários) de células totais, células mononucleares (R1) e polimorfonucleares (R2) pela produção intracelular de EROs, frente a adição de PMA, LPS e cinco IRAP <i>in vitro</i> , realizada em um <i>pool</i> de células do líquido sinovial de equinos – São Paulo – 2007.....	81
Tabela 5 – Porcentagem (média e desvio padrão) de células totais, células mononucleares (R1) e polimorfonucleares (R2) produzindo EROs, frente a adição de PMA, LPS e cinco plasmas <i>in vitro</i> , realizada em um <i>pool</i> de células do líquido sinovial de equinos – São Paulo – 2007.....	84
Tabela 6 – Intensidade de fluorescência média (média e desvio padrão de valores arbitrários) de células totais, células mononucleares (R1) e polimorfonucleares (R2) pela produção intracelular de EROs, frente a adição de PMA, LPS e cinco plasmas <i>in vitro</i> , realizada em um <i>pool</i> de células do líquido sinovial de equinos – São Paulo – 2007.....	85
Tabela 7 – Porcentagem (média e desvio padrão) de células totais, células mononucleares (R1) e polimorfonucleares (R2) produzindo EROs, frente a adição de PMA, LPS, três plasmas e três IRAP <i>in vitro</i> , realizada em um <i>pool</i> de células do líquido sinovial de equinos – São Paulo – 2007.....	89
Tabela 8 – Intensidade de fluorescência média (média e desvio padrão de valores arbitrários) de células totais, células mononucleares (R1) e polimorfonucleares (R2) pela produção intracelular de EROs, frente a adição de PMA, LPS, três plasmas e três IRAP <i>in vitro</i> , realizada em um <i>pool</i> de células do líquido sinovial de equinos – São Paulo – 2007.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	adenosina monofosfato
CAT	Catalase
DAD	doença articular degenerativa
DAG	Diacilglicerol
DCF	2,7-diclorofluoresceína
DCFH-DA	diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína
DNA	ácido desoxiribonucleico
ERO	espécie reativa de oxigênio
FMVZ-USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
FSC	<i>forward scatter characteristic</i>
GAGs	Glicosaminoglicanas
GSH	glutathiona reduzida
GSH-PX	glutathiona peroxidase
GSSG-GR	glutathiona redutase
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HA	Hialuronan
HMPS	hexose monofosfato
IgG	imunoglobulina G
Igs	Imunoglobulinas
IL-1	interleucina-1
IL-10	interleucina-10
IL-1R	receptor de interleucina-1
IL-1ra	antagonista do receptor de interleucina 1
IL-1RtI	receptor de interleucina-1 tipo 1
IL-1RtII	receptor de interleucina-1 tipo 2
IL-4	interleucina-4
IL-6	interleucina-6
IRAP	proteína antagonista de receptor da interleucina-1

IRAP®	Produto comercializado pelo laboratório Orhtogen Therapeutics GmbH, Dusseldorf, Alemanha
JAKs	Janus tirosina quinase
LPS	Lipopolissacarídeos
MEC	matriz extracelular
mL	Mililitro
MPN	metaloproteinases neutras
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo
NF-k β	fator nuclear k β
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintase
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	ânion superóxido
OA	Osteoartrite
OAE	osteoartrite eqüina
⁻ OH	Hidroxila
ONOO ⁻	peróxido nítrico
PBS	solução tamponada de fosfato
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PGs	Prostaglandinas
PKC	proteína quinase
PMA	12-miristato 13-acetato de forbol
PTK	enzima tirosina quinase
q.s.p.	quantidade suficiente para
QS	queratam sulfato
rpm	rotações por minuto
SC	crondroitim sulfato
SLPI	fator inibidor da secreção de protease leucocitária
SOD	superóxido dismutase
SSC	<i>side scatter characteristic</i>

STATs	fatores transcripcionais
TGF- β	fator de crescimento transformador β
TIMPs	inibidores teciduais de metaloproteinases
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1	OSTEOARTRITE	23
2.1.1	ETIOPATOGENIA	24
2.2	O LÍQUIDO SINOVIAL	27
2.3	A CARTILAGEM ARTICULAR	30
2.3.1	A MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)	31
2.3.1.1	COMPONENTES ESTRUTURAIS	32
2.4	O METABOLISMO DA CARTILAGEM ARTICULAR	36
2.5	A INTERLEUCINA -1 (IL-1)	37
2.6	OS RECEPTORES DA INTERLEUCINA-1 (IL-1R)	40
2.7	ANTAGONISTAS DA INTERLEUCINA –1	43
2.7.1	O IL-1RA	45
2.7.1.1	APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS DO IL-1RA	47
2.8	A PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO (EROS)	51
2.9	MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE OXIDATIVA	54
3	OBJETIVOS	57
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	57
4	MATERIAL E MÉTODOS	58
4.1	ANIMAIS.....	58
4.2	EXAME CLÍNICO UTILIZADO PARA A ESCOLHA DOS ANIMAIS.....	58
4.3	COLHEITA DO LÍQUIDO SINOVIAL	58
4.4	PROCESSAMENTO DO LÍQUIDO SINOVIAL	59
4.5	OBTENÇÃO DA PROTEÍNA ANTAGONISTA DO RECEPTOR DA INTERLEUCINA –1 (IRAP)	59
4.6	PREPARAÇÃO DO PLASMA	62
4.7	DROGAS E REAGENTES.....	62
4.8	PREPARO DAS AMOSTRAS PARA REALIZAÇÃO DO ENSAIO	63
4.9	AVALIAÇÃO DO <i>BURST</i> OXIDATIVO.....	63

4.10	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	64
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	65
5	RESULTADOS	66
6	DISCUSSÃO	91
7	CONCLUSÃO	100
	REFERÊNCIAS	101

1 INTRODUÇÃO

A crescente participação de eqüinos nas mais variadas modalidades atléticas vem acompanhada de aumento na incidência de enfermidades inflamatórias em seu esqueleto apendicular, especialmente nas articulações.

Proporcionalmente crescente é a procura por opções terapêuticas que venham abreviar o curso destas enfermidades, culminando com a resolução do processo inflamatório e com o menor número possível de seqüelas associada a ele. Idealmente, estas opções terapêuticas seriam desprovidas dos efeitos colaterais comumente associados ao emprego dos antiinflamatórios não esteroidais e esteroidais, que muitas vezes tornam seu uso proibitivo; ainda, seriam compatíveis com o controle anti- dopagem a que estes animais são submetidos na maioria dos eventos hípicas.

Atualmente, acredita-se que os processos patológicos subjacentes as artropatias representem uma falha na manutenção do mecanismo homeostático normal da cartilagem articular; em última instância, esta homeostase poderia ser definida como um balanço entre processos anabólicos e catabólicos da cartilagem em face ao estresse a ela imposto.

As citocinas, componentes essenciais da comunicação intercelular, são as responsáveis pelo orquestramento dos eventos moleculares envolvidos nos processos anabólicos (síntese e constituição) e catabólicos (*turnover*) da matriz extracelular da cartilagem articular. Assim sendo, a definição de sua estrutura, de suas funções e interações descortina um novo horizonte para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas onde drogas seriam capazes de modular o metabolismo articular *in vivo*, ou, em outras palavras, seriam capazes de restabelecer a homeostase tecidual.

A identificação das principais citocinas inflamatórias abriu um novo leque de opções para o tratamento das enfermidades inflamatórias articulares. Além do potencial farmacológico, o estudo da natureza deste controle regulatório peptídico nos tecidos normais levou a importantes conclusões a respeito da etiopatogenia da osteoartrite nos eqüinos.

Após sua interação com receptores de membrana específicos, as citocinas induzem mecanismos de sinalização pós-receptor que dão início às alterações na expressão de genes, ditando um padrão de operação para o maquinário celular.

A interleucina-1, um dos principais destes fatores peptídeos regulatórios, após ligar-se aos receptores específicos nos condrócitos e sinoviócitos, leva a um aumento na liberação de ácido aracdônico livre, que pode ser subsequente transformado em metabólitos da

lipoxigenase e da cicloxigenase. Ainda, modula a ativação da fosfolipase e eleva a concentração intracelular de AMP cíclico; este, entre outros processos metabólicos, ativa a produção de proteinases que, por sua vez, levam à degradação da matriz extracelular da cartilagem articular.

Neste contexto, onde a tônica é a modulação dos processos catabólicos e anabólicos, a descoberta de antagonistas naturais ou análogos sintéticos com a capacidade de bloquear os mediadores dos processos degenerativos é de grande relevância. No caso da interleucina-1 existem três métodos conhecidos de inibição, que envolvem a perturbação da ligação desta citocina com seu receptor.

O primeiro é através da introdução de um gen que expresse a proteína de interesse, no caso o antagonista do receptor da interleucina-1, através de um vetor viral. No segundo utiliza-se receptores solúveis; este também é um método natural onde os receptores são liberados da membrana celular e se ligam a interleucina-1, evitando que ela se ligue ao receptor acoplado à membrana. O terceiro método de inibição é através de um antagonista natural do receptor de interleucina-1. Esta molécula se liga ao receptor de interleucina-1 na membrana celular, mas, ao contrário da interação da interleucina -1 com este receptor, esta ligação não resulta em nenhuma resposta biológica; por isto ela é considerada um antagonista puro. Nesta linha terapêutica, existe atualmente um produto comercial para uso em eqüinos.

Pela conveniência e facilidade de execução, esta última opção terapêutica constitui-se em alvo de estudo neste trabalho, onde a avaliação dos efeitos antiinflamatórios do antagonista puro do receptor de interleucina-1, denominado IRAP, será feita através do emprego da citometria de fluxo, em líquido sinovial de eqüino.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Visando facilitar a leitura, a revisão de literatura foi apresentada em tópicos sequenciais, a saber: osteoartrite, o líquido sinovial, a cartilagem articular, o metabolismo da cartilagem articular, a interleucina-1, os receptores de interleucina-1, antagonistas da interleucina-1.

2.1 OSTEOARTRITE

A osteoartrite eqüina (OAE) engloba várias entidades, sendo o termo empregado para descrever qualquer disfunção articular. Também chamada de doença articular degenerativa (DAD), a osteoartrite equina pode ter início a partir de algum evento predisponente, tal como trauma agudo ou crônico, sépsis ou osteocondrose ou desenvolver-se como resultado de esforços repetidos naqueles indivíduos que desempenham função atlética. Apesar da etiologia, a característica comum a todos estes processos, e que os define em essência, é a degeneração da cartilagem articular; esta é a via comum através da qual a inflamação sinovial resulta em osteoartrite.

Apesar de exibir baixa taxa metabólica, baixa celularidade, e receber vascularização e inervação por vias indiretas, a cartilagem articular é um tecido vivo que se adapta às forças que incidem sobre ele, organizando sua estrutura de forma a desempenhar com a maior eficiência possível suas funções primordiais. Constitui-se em tecido capaz de absorver e transmitir cargas geradas pela coluna óssea e acomodar as forças de tensão que resultam do movimento dos segmentos ósseos adjacentes.

Esta adaptação da cartilagem articular ao exercício está bem estabelecida nos eqüinos e é resposta fisiológica a um estímulo, resultando em tecido cartilágneo capaz de suportar maiores estresses biomecânicos (HINCHKIFF et al., 2004).

Quando os eventos anabólicos e catabólicos responsáveis por este remodelamento não estão em sintonia, o stress imposto pelo exercício deixa de ser estímulo para geração da resposta fisiológica e passa a incidir como sobrecarga sobre os tecidos articulares, resultando em lesões. Quando a capacidade de adaptação da cartilagem articular é suplantada observa-se

a instalação de alterações estruturais na mesma. A sobrecarga articular e a gênese da osteoartrite estão correlacionadas em humanos e também nos eqüinos.

A dor, quando manifesta, indica que o limite de resistência da cartilagem foi ultrapassado; é um evento importante no processo de treinamento de qualquer eqüino atleta, uma vez que as claudicações por ela induzidas são a maior causa de morbidade (HINCHCKIFF et al., 2004) e a principal etiologia da queda de performance nos cavalos afetados.

Dor e disfunção articular são os principais sinais clínicos da OAE (MCILWRAITH; TROTTER, 1996). Levando-se em consideração o fato da cartilagem articular ser desprovida de inervação, podemos prever que quando os processos degenerativos elicitam dor eles já tenham atingido certa profundidade na espessura deste tecido; eles são, desta forma, inicialmente silenciosos, explicando o freqüente atraso na detecção desta enfermidade em seus primeiros estágios.

Em resumo, a OAE é uma doença degenerativa da articulação, onde ocorrem alterações morfológicas como erosão da cartilagem, formação de osteófitos peri-articulares, remodelamento da ossatura subcondral e inflamação sinovial.

Desta forma a manutenção ou a restauração da função normal das articulações é alvo de constante atenção por parte dos veterinários. A inflamação aguda é uma resposta necessária e apropriada para dar início aos processos de reparação após a injúria tecidual, mas a regulação inadequada desta resposta pode levar a danos teciduais excessivos ou à inflamação crônica.

2.1.1 ETIOPATOGENIA

Nos humanos a OA é uma enfermidade principalmente do idoso; nos eqüinos, por outro lado, o paciente típico é jovem e a degradação da cartilagem articular afeta cartilagem nova. Isto não quer dizer que nos eqüinos mais velhos as alterações características do envelhecimento da cartilagem não sejam observadas. Comum entre os pacientes de ambas as espécies é o papel decisivo desempenhado pelo engajamento destes indivíduos em modalidades atléticas.

O fato relevante é que o significado clínico da doença não foi ainda completamente esclarecido, sendo necessário diferenciarmos as alterações degenerativas que acontecem no

indivíduo idoso daquelas que caracterizam a osteoartrite, tal qual as definidas anteriormente. As teorias sobre as causas da OAE podem ser comparadas com as da osteoartrite humana.

A primeira teoria é baseada no papel desempenhado por forças físicas e pela falência do biomaterial da cartilagem articular quando submetido a elas; a segunda atribui a maior parte da etiologia da doença à ineficiência das respostas dos condrócitos nos processos de reparação e degradação frente aos insultos e a terceira considera o remodelamento ósseo, as respostas sinoviais, as microfraturas, as alterações vasculares e outros fatores extra-articulares à cartilagem como problemas primários, sendo as alterações da cartilagem articular, secundárias.

A despeito da multiplicidade de teorias, há consenso na observação de que a degeneração da cartilagem articular é o evento primordial e ocorre como reflexo da desorganização da matriz extracelular que a compõe; importantes vias bioquímicas são fatores centrais nesta destruição (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

Apesar da ênfase no envolvimento direto e papel preponderante da destruição da cartilagem articular no desenvolvimento da OAE, a concomitante inflamação da membrana sinovial contribui de maneira vital para o evento fisiopatológico central, que é a depleção da matriz extracelular. Existe uma interação inegável entre a membrana sinovial e a cartilagem articular nesta fase inflamatória, que potencializa a degradação da mesma; sinovite, capsulite e destruição de cartilagem articular são eventos intimamente relacionados e qualquer uma destas condições pode iniciar ou exacerbar as outras (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

A sinovite, assim como a capsulite, é uma alteração comumente observada no início do curso da osteoartrite e está presumivelmente associada à ocorrência de trauma repetido. As alterações morfológicas da sinóvia incluem hipertrofia e hiperplasia do epitélio de revestimento e infiltração de células mononucleares no tecido subjacente. (PELLETIER et al., 1997). Ainda, acredita-se que a sinovite geralmente ocorra em associação com dano à cápsula fibrosa, podendo levar à instabilidade articular. A injúria da membrana sinovial é importante por ela se constituir em fonte potencial de liberação direta de enzimas lisossomais, particularmente metaloproteinases neutras (MPN), de prostaglandina E₂ (PGE₂), de liberação de espécies reativas do oxigênio (EROs) e de citocinas como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e, especialmente, de interleucina 1 (IL-1).

As citocinas, por sua vez, induzem a liberação de metaloproteinases (MPNs) pelos condrócitos e sinoviócitos, e estas, na condição de enzimas proteolíticas, atuam sobre os principais constituintes da matriz extracelular: colágeno e proteoglicanas (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

As MPNs são capazes de digerir todos os componentes essenciais da matriz extracelular, depletando a cartilagem de substância. Na cartilagem sadia a atividade das enzimas proteolíticas é controlada por alguns mecanismos, sendo um dos principais a ocorrência natural de proteínas inibitórias desta atividade enzimática; os TIMPs (inibidores teciduais de metaloproteinases) são os mais importantes efetores desta função (STASHAK, 2002). São sintetizados por sinoviócitos, condrócitos e células endoteliais e inativam as MPNs ligando-se a elas em um complexo não covalente. Estes inibidores contribuem para a longevidade da matriz extracelular, sendo o equilíbrio da relação entre a síntese de MPNs e de TIMPs um determinante importante da taxa de degradação da matriz (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

Além de promover a liberação de MPNs, a interleucina-1 apresenta outros efeitos deletérios sobre o metabolismo da matriz da cartilagem articular; esta citocina, produto não somente das células mononucleares mas também dos sinoviócitos e condrócitos, tem a habilidade de suprimir a síntese de colágeno tipo II (característico da cartilagem hialina) enquanto aumenta a síntese de colágeno tipo I (característico dos fibroblastos) (CARON et al., 1996).

Ainda, a perda do conteúdo de proteoglicanas (especialmente do Agrecan) é um componente importante do desenvolvimento da OAE em suas fases mais precoces e também resulta da ação da IL-1; ela inibe sua síntese, comprometendo as propriedades estruturais e mecânicas da cartilagem articular, pelas quais as proteoglicanas são responsáveis (PLATT; BAYLISS, 1994).

A acelerada reabsorção da matriz extracelular, que caracteriza estas fases iniciais da doença, é concomitante com uma falta de regulação do metabolismo das proteoglicanas, de forma que o catabolismo suplanta as tentativas dos condrócitos de sintetizar este componente estrutural de forma eficiente, e recompor novamente a substância da matriz (PLATT; BAYLISS, 1994).

Assim, a Interleucina -1 contribui tanto para a redução das atividades anabólicas como para o aumento das atividades catabólicas nas articulações acometidas, constituindo-se em um dos principais fatores na fisiopatogenia da OAE (CARON et al., 1996).

Ela é a citocina mais abundantemente sintetizada pelos condrócitos articulares, leucócitos e pela sinóvia das articulações osteoartíticas (PELLETIER et al., 1997) e sua concentração está aumentada no líquido sinovial destas articulações (ALWAN et al., 1991).

2.2 O LÍQUIDO SINOVIAL

O líquido sinovial é um ultrafiltrado do plasma; a maior parte de seus íons e moléculas também estão presentes nele, com exceção do hialuronan. Grandes proteínas são geralmente excluídas do espaço intra sinovial.

O fluido sinovial contém células mononucleares (células de revestimento sinovial, monócitos e linfócitos) perfazendo 90% da população celular e leucócitos polimorfonucleares representando 10% da população total de células. O líquido sinovial normal contém menos de 500 células nucleadas/ μ l (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

O líquido sinovial é o meio através do qual os nutrientes chegam à cartilagem articular e aos ligamentos intra-articulares.

O líquido sinovial é produzido pela sinóvia ou membrana sinovial, que é a porção mais interna da cápsula articular; a íntima, por sua vez, é a camada mais interna desta membrana sinovial, tendo de 1 a 4 sinoviócitos de espessura e não possuindo lâmina basal. A íntima é a delicada barreira entre o fluido intravascular e intersticial da sub íntima e o líquido sinovial. A ausência da membrana basal na íntima e a proximidade dos capilares em relação à sua superfície facilitam a troca de solutos (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

O endotélio evita que moléculas grandes saiam dos capilares sinoviais. A barreira sinovial em relação à permeabilidade a moléculas pequenas é mantida pelo estreito espaço existente entre os sinoviócitos e pela composição da matriz extracelular. O hialuronan também funciona como uma barreira para a troca de pequenas moléculas.

Moléculas menores que 10kDa geralmente estão em equilíbrio entre o fluido sinovial e o plasma e cruzam a sinóvia por simples difusão. O transporte de glicose para o fluido sinovial é uma exceção, uma vez que ela entra em articulações normais mais rapidamente que outras pequenas moléculas, provavelmente como resultado de uma difusão facilitada (mais do que em função de transporte ativo). Moléculas lipofílicas, como oxigênio e dióxido de carbono, difundem-se livremente para dentro e para fora do líquido sinovial, uma vez que podem se infiltrar através dos sinoviócitos, bem como por entre eles.

O hialuronan é a única glicosaminoglicana não sulfatada e que não possui um core protéico; a viscosidade do líquido sinovial se deve à sua presença. O líquido sinovial equino normal contém em média 0,5mg/mL de hialuronan. Sua síntese ocorre na membrana plasmática e ele é liberado para o espaço extracelular durante o processo de alongamento de sua molécula; a determinação do comprimento de cadeia, que presumivelmente afeta a

viscosidade do líquido sinovial, e o tamanho dos agregados de proteoglicanas no interior da cartilagem articular não são conhecidos.

Em solução, o hialuronan adota uma configuração de mola enrijecida, com alta afinidade por água; na matriz, ele parece agir como uma peneira: quanto mais concentrado estiver, mais inibida estará a difusão (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

Um outro produto importante das células de revestimento sinovial é uma glicoproteína denominada lubricina. Ela é a maior responsável pelas propriedades de lubrificação do líquido sinovial uma vez que adere à superfície da cartilagem articular e à membrana sinovial, reduzindo a tensão superficial, tracionando as superfícies articulares contíguas em direções opostas e prevenindo a fusão. Esta função é conhecida como “lubrificação de fronteiras” e é dependente das características bioquímicas da molécula de lubricina (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

O volume de líquido sinovial presente na cavidade articular é determinado pela exsudação de plasma sanguíneo dos capilares através do interstício da subíntima da membrana sinovial. Conforme comentado anteriormente, a ausência de uma membrana basal entre as células de revestimento da membrana sinovial e a camada subíntima, resulta num movimento praticamente sem resistência do filtrado capilar através do tecido intersticial. Este movimento é limitado apenas pela presença do colágeno intersticial do tipo I e III, pelas proteoglicanas, glicosaminoglicanas, pelo colágeno tipo IV da membrana basal e pelo glicocálix dos capilares articulares.

O excesso de líquido sinovial deixa a cavidade articular através do interstício da subíntima para vasos linfáticos ou vênulas dotadas de válvulas, que previnem o refluxo para dentro da articulação. A ação de bombeamento exercida pela movimentação articular remove o excesso de líquido sinovial e cria uma pressão negativa dentro da cavidade articular enquanto a articulação se encontra em posição de relaxamento (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

Durante um episódio inflamatório, o extravasamento de líquido sinovial para dentro da cavidade articular supera seu *clearance* pelas vênulas e vasos linfáticos, uma vez que o endotélio encontra-se permeável e o número de capilares funcionais, diminuído. O resultado final destes eventos é o edema da membrana sinovial, enrijecimento da articulação com prejuízo da mobilidade e efusão de líquido sinovial com escape de proteína para dentro da cavidade articular (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

Além do aumento da pressão intra-articular, a efusão na cavidade sinovial também resulta em incremento na pressão sobre a ossatura subcondral; vários estudos documentam a

diminuição do fluxo sanguíneo como resultado da efusão articular neste segmento, resultando no aparecimento de áreas focais de necrose (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

Condições de acidez, hipóxia e hipercapnia associadas ao aumento do metabolismo anaeróbio e à produção de ácido láctico foram detectadas tanto no fluido sinovial como no efluxo venoso da ossatura subcondral. Uma vez que é o líquido sinovial o responsável pelo suprimento de oxigênio, glicose e outros pequenos solutos para a nutrição dos tecidos articulares e, também, o efetor da remoção de subprodutos do metabolismo destes tecidos, a efusão articular, ao prejudicar estes processos de nutrição e drenagem, cria um cenário de isquemia local na membrana sinovial e condições afins na cartilagem articular. Somado a isso, a privação de nutrientes para os condrócitos (metabolicamente sensíveis por natureza) e a possibilidade de ativação de enzimas acidofílicas degradativas na matriz pericelular resultante da queda de pH pode, subitamente, alterar a homeostase da matriz da cartilagem articular.

Ainda, uma vez que os componentes do líquido sinovial são importantes para a manutenção de suas propriedades de lubrificação, a presença de efusão e a destruição do hialuronan e da lubricina afetam o desempenho desta função, podendo-se constatar, clinicamente, perda da viscosidade do líquido sinovial (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

Dentro deste raciocínio, o fluido sinovial deixa de ser, nas articulações osteoartros, uma fonte de elementos nutritivos, meio de remoção dos subprodutos do metabolismo e provedor de estabilidade biomecânica para as estruturas articulares, para se converter em meio rico em produtos inflamatórios como prostaglandinas, metaloproteinases, citocinas, e espécies reativas do oxigênio (LAURINDO et al., 1997; BERTONE et al., 2001)

A prostaglandina E_2 (PGE_2) é o prostanóide mais abundantemente sintetizado nos tecidos sinovial e articular, estando associada a inflamação sinovial, erosão óssea e depleção da matriz cartilágnea. Além disto, ela modula a liberação de metaloproteinases neutras que degradam a cartilagem, como as collagenases e a estromelisina (TING et al., 2002).

As metaloproteinases de matriz são enzimas proteolíticas, formando um grupo de endopeptidases zinco-dependentes, centralmente envolvidas no *turnover* fisiológico normal da matriz extracelular. Elas podem ser divididas em três sub-grupos: as collagenases (MMP1 e 8), as collagenases/gelatinases do tipo IV (MMP 2 e 9) e as estromelisinases/proteoglicanases (MMP 3 e 10). Na OAE elas estão implicadas na degradação de moléculas da matriz da cartilagem articular (CLEGG et al., 1997). São secretadas como pró-enzimas latentes e, posteriormente ativadas no meio extracelular (STASHAK, 2002).

Estudos demonstram a presença de interleucina-1 no líquido sinovial de articulações de equinos com osteoartrose e sua ausência em articulações saudáveis (MORRIS et al., 1990; ALWAN et al., 1991).

A descoberta de que o tecido sinovial seria capaz de produzir um fator (no caso, a interleucina-1) que induzisse a falência da cartilagem articular pela degradação de sua matriz extracelular, despertou um grande interesse pelas interações que ocorrem entre estes tecidos sinoviais e os condrócitos, como fatores possivelmente incrimináveis na etiopatogenia da OAE (MAY et al., 1992b).

2.3 A CARTILAGEM ARTICULAR

A cartilagem articular é do tipo hialino e recobre a placa subcondral dos segmentos ósseos que formam as articulações diartrodiais; é um tecido conjuntivo altamente especializado que permite, simultaneamente, mobilidade e sobrecarga de peso, com atrito desprezível. Nos adultos a cartilagem é avascular, não possui vasos linfáticos e não é innervada, recebendo sua nutrição basicamente do líquido sinovial (PLATT; BAYLISS, 1994; ROSS; DYSON, 2003).

É constituída por água, colágeno e proteoglicanas, presentes nas respectivas proporções de 65% a 80%, 10 a 30% e 5 a 10% do seu peso (ROSS; DYSON, 2003). Uma população esparsa de células, os condrócitos, está distribuída na extensa matriz extracelular, contribuindo em 2% do seu volume. Os condrócitos sintetizam, organizam e regulam a deposição da complexa matriz extracelular cartilaginosa de maneira altamente eficiente; em cada estágio de crescimento e desenvolvimento destas células as taxas relativas de síntese e degradação de matriz extracelular são controladas de forma organizada para resultar em crescimento, remodelamento ou equilíbrio.

As propriedades físicas da cartilagem articular dependem da estrutura e organização das macromoléculas na matriz extracelular, que é composta principalmente, como visto, por colágenos e proteoglicanas. Estes dois constituintes da matriz cartilaginosa têm estrutura e taxa de *turnover* bastante diferentes, refletindo os papéis distintos que desempenham na articulação normal e as dificuldades de manter em sincronia os processos de síntese e degradação nos quais estão envolvidos.

O colágeno forma uma densa rede fibrilar que é entremeada com uma alta concentração de proteoglicanas. Estas, como resultado de suas cadeias polianiónicas de glicosaminoglicanas, criam uma alta pressão oncótica de absorção de água; a água que é drenada para dentro do tecido expande a malha de colágeno e é este balanço entre a tensão na rede de colágeno e a pressão osmótica de edemaciamento conferida pelas proteoglicanas que imprime as características biomecânicas da cartilagem articular. Estas propriedades são criticamente dependentes da integridade da rede de colágeno e da síntese e retenção de altas concentrações de proteoglicanas no interior da matriz extracelular.

2.3.1 A MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)

A matriz extracelular da cartilagem articular é secretada pelos condrócitos e constitui-se no meio onde as células crescem, movem-se e se diferenciam; ela se acomoda entre as células formando uma malha nos espaços que as rodeiam. Esta proximidade propicia uma interação única entre os condrócitos e a MEC adjacente; ela pode ser facilitada pela presença de um cílio que sai de cada condrócito e se estende para o interior da matriz funcionando como um sensor que registra alterações em sua composição como, por exemplo, perda de proteoglicanas ou colágeno e aumento ou diminuição na concentração de hialuronan. Estas informações são, posteriormente, devolvidas para a célula.

A interação entre o espaço pericelular e a matriz territorial com a membrana celular do condrócito também pode incluir a transmissão de sinais mecânicos por mudanças na compressão ou tensão da matriz. Também é sugerido que as forças registradas pelos condrócitos ditem sua forma e então estimulem alterações na bioquímica celular e metabolismo da MEC (STASHAK, 2002).

A matriz extracelular apresenta várias funções, entre elas a de sequestrar água - que confere turgor aos tecidos moles- e minerais, que dão rigidez aos tecidos esqueléticos; age como reservatório de fatores de crescimento que controlam a proliferação celular e são de fundamental importância para a interação célula-a-célula. Ainda, fornece substrato para a aderência, migração e proliferação das células, modulando diretamente sua forma e a função.

Três grupos de macromoléculas, que encontram-se fisicamente associadas, constituem a MEC: o primeiro é o das proteínas estruturais fibrosas, como o colágeno e as elastinas; o

segundo é o das glicoproteínas adesivas e o terceiro é o das proteoglicanas e do ácido hialurônico (KUMAR et al., 2005).

O arranjo estrutural das fibras de colágeno, proteoglicanas e condrócitos na matriz extracelular da cartilagem articular produz um padrão complexo de movimentação de solutos. Os componentes que mais afetam a movimentação de solutos são as proteoglicanas. Estando elas entremeadas às fibras de colágeno, sua expansão é restringida, de sorte que a matriz age como uma fina peneira através da qual pequenas e grandes moléculas tentam se mover. As proteoglicanas restringem a difusão de solutos grandes, sem carga, mas não afetam a difusão de solutos pequenos, sem carga. A remoção das PGs aumenta o influxo de grandes moléculas na matriz e isto sugere que sua remoção pode também aumentar a saída de grandes moléculas da matriz. Por isso, propôs-se que a marcada perda de grandes moléculas de proteoglicanas do tipo Agrecan e a síntese de novos monômeros de proteoglicanas pela matriz na OAE é provavelmente resultado direto da aumentada mobilidade destas macro-moléculas, a medida que os componentes da matriz continuam a se degradar (STASHAK, 2002).

2.3.1.1 COMPONENTES ESTRUTURAIS:

a) O colágeno

O colágeno é a proteína mais abundante do reino animal, provendo um arcabouço extracelular para todos os organismos multicelulares. Ele é composto de uma hélice tripla de três cadeias alfa polipeptídicas, tendo uma sequência de repetição de gli-x-y.

O colágeno do tipo II é o colágeno mais abundante encontrado na cartilagem articular, mas não é o único. O colágeno do tipo IX representa 10% das proteínas colágenas da cartilagem e sua participação na composição da matriz extracelular decresce em 1% nos adultos. Ele, juntamente com o colágeno do tipo XI, contribui significativamente na organização e estabilidade mecânica da rede de fibras de colágeno tipo II (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

O colágeno tipo II é fibrilar (forma fibrilas) e é sintetizado a partir de procolágeno, uma molécula precursora derivada do pré-procolágeno, que é transcrito a partir de gens colágenos. Após a hidroxilação de resíduos da prolina e lisina e da glicosilação da lisina, três cadeias de procolágeno se torcem uma em redor da outra para formar a tripla hélice. O

procolágeno é secretado da célula e cindido por proteases para formar a unidade básica das fibrilas. A formação das fibrilas de colágeno é associada à oxidação de resíduos específicos de lisina e hidroxilisina pela enzima extracelular lisil oxidase; isto resulta na ligação (*cross linking*) entre as cadeias de moléculas adjacentes, que estabilizam este arranjo característico do colágeno. Este fenômeno de *cross linking* é o maior responsável pela força tênsil do colágeno (KUMAR et al., 2005).

O colágeno de tripla hélice apresenta uma rigidez característica e também resistência ao ataque proteolítico. Sua degradação se torna mais complicada quando ele já está integrado à MEC, pois as ligações intermoleculares entre as fibrilas poliméricas de colágeno os torna muito mais resistentes à degradação do que os colágenos solúveis. Apesar disso, existe um *turnover* de colágeno que, mesmo lento, permite seu remodelamento e reparação durante a vida do tecido cartilágneo (KUMAR et al., 2005).

Vários sistemas foram estudados *in vitro* e nestas condições enzimas como a collagenase e a estromelisina são capazes de degradar substrato colágeno purificado; contudo existem poucas evidências que impliquem tais sistemas nos mecanismos de *turnover in vivo*. Especula-se que as ligações entre as moléculas de colágeno devam ser clivadas antes que as porções em hélice possam ser atacadas *in vivo*. Proteinases ativas em pH ácido são capazes de ação depolimerase e também cindem os peptídeos de extensão não helicoidais do colágeno tipo II. Estas enzimas podem ser funcionais *in vivo*, atuando nos espaços pericelulares onde o pH local é ácido como resultado da liberação de produtos do metabolismo celular dos condrócitos, tais como o ácido láctico. A porção helicoidal da molécula de colágeno tipo II é clivada através das três subunidades, em sítio específico, pela collagenase (KUMAR et al., 2005).

b) As Proteoglicanas (PGs)

Uma proteoglicana é definida como uma molécula que tem um core protéico ao qual, no mínimo, uma cadeia de glicosaminoglicana (GAG) está covalentemente ligada.

As propriedades biomecânicas da cartilagem articular normal e sua capacidade de resistir ao uso são devidas às altas concentrações de proteoglicanas, cujas moléculas encontram-se entremeadas e contidas pela densa rede de fibras de colágeno.

As PGs da matriz extracelular da cartilagem articular se encaixam em duas principais categorias: a das grandes proteoglicanas de agregação (por exemplo o Agrecan) e a das pequenas proteoglicanas (por exemplo o decorin, o biglican e a fibromodulina).

As PGs são os componentes mais dinâmicos da cartilagem articular e sua biossíntese envolve a translação do gen transcrito para a proteína do core de Agrecan no retículo endoplasmático rugoso e sua subsequente transferência para o Complexo de Golgi, onde extensiva modificação pós translacional resulta na produção da molécula completa de PG (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

O *turnover* das proteoglicanas na cartilagem articular não artrítica é um processo conservativo que permite uma renovação estável dos componentes teciduais sem perturbar as características funcionais da matriz extracelular. Ele é, comparativamente, muito mais rápido que o do colágeno. A liberação de PGs e sua mobilização com o transporte para fora da matriz é considerada a via mais importante de catabolismo. Foi demonstrado que os condrócitos são os responsáveis pelo *turnover* da matriz que os circunda, e que os grandes fragmentos de PGs liberados perderam sua capacidade de formar agregados.

Várias proteinases capazes de degradar os componentes da matriz extracelular da cartilagem articular foram identificadas *in vitro*; elas são sintetizadas como moléculas precursoras inativas que são, posteriormente, convertidas em proteinases ativas. Esta conversão parece ser uma etapa crucial no processo degradativo. Os mecanismos de ativação ainda não estão claros, mas estudos *in vivo* apontam para a importância da geração de plasmina a partir do plasminogênio, mediada pelo ativador celular de plasminogênio neste processo. As proteinases são reguladas no estágio de síntese também pela presença e produção de inibidores potentes das enzimas ativas, como os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) e as alfa-macroglobulinas. A síntese de inibidores de proteinases é cuidadosamente controlada pelos mesmos mecanismos que regulam a produção das próprias proteinases sob condições fisiológicas normais. A disponibilidade de proteinase ativada, no estado fisiológico, é portanto rigidamente regulada pelo condrócito (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

b1) As Grandes Proteoglicanas de Agregação

As grandes proteoglicanas de agregação de alto peso molecular são as espécies mais abundantes na cartilagem articular. Elas são compostas de um centro protéico de massa

molecular de 225 kDa ao qual um grande número de cadeias de GAGs está covalentemente ligado. As glicosaminoglicanas constituintes, principalmente o queratam sulfato (QS) e o condroitim sulfato (SC), são todas sintetizadas sobre o núcleo protéico durante o processamento pós translacional no aparato de Golgi do condrócito. Uma vez sintetizado, o monômero de proteoglicana é rapidamente secretado para a matriz pericelular, onde ele se agrega, em condições normais, com o hialuronan (HA) através da região de ligação do HA do core protéico. Após serem secretados, os monômeros passam por um período de maturação estrutural que dura várias horas, antes de se associar com o hialuronan para formar os agregados supramoleculares. Este hiato permite aos monômeros recém sintetizados um período de mobilidade dentro da matriz extracelular antes de sua imobilização dentro dos agregados. A ligação não covalente entre o monômero de proteoglicana e o hialuronan requer pelo menos 5 unidades dissacarídicas repetidas de HA, permitindo que muitos monômeros se liguem a uma única molécula de HÁ (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

b.1.1) O core protéico

O core protéico pode ser dividido em vários domínios distintos, cada um com uma função particular, e muitas das quais são ainda desconhecidas.

b.1.2) As glicosaminoglicanas (GAGs)

As principais GAGs encontradas na cartilagem são o 4-sulfato de condroitina, 6-condroitim sulfato, o queratam sulfato e o hialuronan. Elas consistem de longas cadeias lineares de unidades dissacarídicas repetidas de hexosamina (glucosamina ou galactosamina) que se alternam com outro resíduo de açúcar (ácido glucurônico, ácido idurônico ou galactose). A proporção de cada GAG varia de acordo com o tipo e a idade da cartilagem.

Vale salientar novamente que o hialuronan é a única GAG não sulfatada. É uma molécula longa, sem cadeias, que consiste de 200 a 10000 unidades dissacarídeas repetidas de ácido glucurônico ligado a N acetilglucosamina, com uma massa molecular resultante de 1×10^5 a 1×10^6 kDa.

O hialuronan representa apenas uma pequena porcentagem das glicosaminoglicanas da cartilagem, mas desempenha um papel especial como sustentáculo do eixo agregado de proteoglicana (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

b2) As Pequenas Proteoglicanas

As pequenas proteoglicanas não agregantes constituem de 1 a 4% da massa total de PGs presentes na cartilagem articular; elas são macromoléculas multifuncionais que se ligam a colágenos, fatores de crescimento, heparina e uma variedade de outras macromoléculas. Três pequenas PGs são encontradas na cartilagem articular e todas são membros de uma família de glicoproteínas ricas em leucina. As proteínas do centro destas PGs são distintas mas apresentam 55% de homologia, sendo o tamanho aproximado do core de 38kDa . Elas são o decorin, as biglicanas e a fibromodulina (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

O decorin pode interagir com o colágeno e desempenhar um papel importante na regulação do espaçamento inter fibrilar e no *cross linking*. Ela também se liga ao fator de crescimento TGF- β , que é encontrado na cartilagem e pode inibir sua atividade mitogênica.

O papel das biglicanas não é bem conhecido, mas pode envolver interação com outras moléculas da matriz ou a interação entre as membranas celulares e a matriz. Sua estrutura é semelhante a do decorin, mas ela não é capaz de se ligar ao colágeno, apesar de estar bem ligada à matriz (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

As fibromodulinas podem se ligar a fibrilas de colágeno e inibir a formação de fibras. Provavelmente desempenham papel na estabilização do espaço interfibrilar por recobrir as fibrilas de colágeno e alterar suas propriedades de superfície, prevenindo, desta forma, que as fibrilas de colágeno cresçam por inclusão de mais moléculas de colágeno ou por fusão de fibrilas adjacentes (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

2.4 O METABOLISMO DA CARTILAGEM ARTICULAR

Há uma estimativa, no cão, de que o tempo de *turnover* do colágeno seja de 120 anos e no homem de 350 anos. Por outro lado o tempo de *turnover* do conteúdo total de proteoglicanas na cartilagem do cão adulto é de aproximadamente 300 dias (STASHAK,

2002). A disparidade nas taxas de renovação destes componentes da matriz extracelular da cartilagem articular certamente também ocorre na espécie equina e aponta para uma das mais prováveis etiologias da OAE: a falta de sincronia entre os processos anabólicos e catabólicos do tecido articular e também a falta de sincronia entre os processos de reposição de seus diversos constituintes (STASHAK, 2002).

Em última análise, na OAE os eventos responsáveis pela renovação e remodelação da matriz extracelular não se traduzem na manutenção da homeostase da cartilagem articular. No tecido normal, a manutenção desta homeostase e a organização dos eventos moleculares envolvidos na síntese, assentamento e *turnover* da MEC da cartilagem articular requer uma regulação meticulosa de múltiplos mecanismos moleculares pelos condrócitos.

São as citocinas as ferramentas que possibilitam este controle, promovendo a comunicação entre as células. Elas, que são também chamadas de fatores regulatórios peptídicos, possuem efeitos sobre os condrócitos e representam um grande grupo de moléculas que tem algumas características em comum: 1) baixa massa molecular, geralmente menor que 80kDa; 2) ação curta ou intermediária e 3) interação com receptores de alta afinidade na superfície da célula (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

Muitos destes peptídeos têm efeitos em vários tipos de células e induzem uma variedade de efeitos biológicos, podendo influenciar células à distância de onde foram originalmente produzidas (efeito exócrino), tendendo, porém, a agir localmente sobre as células adjacentes (efeito parácrino) ou até na mesma célula que os secretou (efeito autócrino). Podem ainda ser seqüestrados sob a forma biologicamente inativa pelas glicosaminoglicanas da matriz (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

Após sua interação específica com os receptores de membrana, as citocinas induzem mecanismos de sinalização pós receptores que desencadeiam alterações na expressão genética. Os mecanismos de transmissão do sinal recebido não foram ainda completamente definidos.

2.5 A INTERLEUCINA -1 (IL-1)

A interleucina-1 é uma família composta por três diferentes peptídeos, estruturalmente relacionados, frutos da expressão de três gens distintos. São eles os dois agonistas, a

interleucina-1 α e a interleucina-1 β e um antagonista, a proteína antagonista do receptor de interleucina-1 (DHAR et al., 2000).

A citocina interleucina-1 afeta basicamente todos os tecidos e sistemas orgânicos; ela é o protótipo da citocina pró-inflamatória, já que induz a expressão de uma variedade de genes e a síntese de uma série de proteínas capazes de induzir alterações inflamatórias crônicas e agudas. Ela é, ainda, a típica citocina de “alarme” na medida em que age sobre diversas células alvo para induzir ou amplificar uma variedade de mecanismos de defesa, particularmente respostas hematológicas e imunológicas .

A interleucina-1 possui duas propriedades fundamentais: a primeira é o fato de ser um mediador de doenças e a segunda o fato de ser um mediador das defesas orgânicas; contudo, em qualquer uma destas situações, a produção excessiva ou prolongada desta citocina leva a debilitação das funções normais do organismo (DINARELLO, 1991).

A interleucina-1 foi originalmente descrita na década de quarenta como uma proteína termo-lábil encontrada no exsudato granulocítico e que, quando injetada em humanos ou animais, produzia febre; nesta época ela era chamada de pirógeno endógeno e, sabidamente, possuía peso molecular entre 10 e 20 kDa. Atualmente é conhecido seu amplo espectro de atividades tais como a estimulação de linfócitos *in vitro*; estimulação *in vitro* de condrócitos e de sinoviócitos para produzir prostaglandina E2 e metaloproteinases neutras (MAY et al., 1990); inibição da síntese de colágeno tipo II que é característico da cartilagem hialina e aumento da síntese de colágeno do tipo I que é característico das células fibroblásticas; redução da síntese de Agrecan (ALWAN et al., 1991); produção de espécies reativas do oxigênio (LAURINDO et al., 1997) e diminuição da síntese de proteoglicanas (PLATT; BAYLISS, 1994; RICHARDSON; DODGE, 2000).

Muitas células nucleadas são capazes de sintetizar a interleucina-1, tais como os monócitos, linfócitos T, os neutrófilos sanguíneos, a microglia do sistema nervoso, astrócitos, células endoteliais, células da musculatura lisa, fibroblastos, células do revestimento sinovial, células dendríticas da derme, células dos epitélios intestinal, gengival e cervical, células dos gânglios linfáticos e células maternas placentárias (DINARELLO, 1991) e condrócitos (CARON et al., 1996).

As células sinoviais das articulações acometidas por OA sintetizam várias citocinas pró-inflamatórias, mas a mais abundante é a interleucina-1 (PELLETIER et al., 1997) e níveis elevados de IL-1 foram encontrados em líquido sinovial de articulações acometidas por uma variedade de lesões, tais como a OAE (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

A IL-1 é um peptídeo com duas formas relacionadas, mas distintas, a IL-1 α e a IL-1 β ; as duas proteínas são sintetizadas como um precursor de 31kDa que é clivado em uma molécula ativa de 17 kDa a 18 kDa e que tem 4 frações ativas. A homologia entre os aminoácidos das duas isoformas é de menos de 30%, apesar de elas demonstrarem atividade biológica similar, devido à integridade estrutural tridimensional da molécula protéica. Ainda existe controvérsia em relação ao receptor ao qual as isoformas se ligam; alguns autores acreditam que as isoformas da interleucina-1 ligam-se ao mesmo receptor, enquanto outros fornecem evidência para a heterogenicidade dos receptores (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

Os estímulos mais comuns para a transcrição de interleucina-1 são a endotoxina, outros produtos microbianos como as exotoxinas de bactérias Gram positivas, vírus, outras citocinas, componentes do complemento, trombina, sais biliares e metabólitos de androgênios (DINARELLO, 1991).

As citocinas, em especial a interleucina-1, são fatores centrais na síntese e liberação de MPNs de matriz pelos condrócitos, reduzem a síntese de colágeno tipo II, reduzem a síntese de Agrecan (CARON et al., 1996). e induzem a produção de PgE2 pelas células sinoviais (DINARELLO, 1991). Além de aumentar a degradação das proteoglicanas ainda suprimem sua biossíntese. Muitos estudos demonstraram que a interleucina-1 é capaz de fomentar processos metabólicos degradativos na cartilagem e em condrócitos mantidos *in vitro*, é capaz de induzir a produção de collagenase, radicais peróxido e interleucina-6. Todos estes fatores estão intimamente associados à degradação da MEC da cartilagem articular (MCILWRAITH ; TROTTER, 1996). Ainda, a IL-1 mostrou aumentar a produção do ativador tissular de plasminogênio e da óxido-nítrico sintetase (TAKAFUJI et al., 2001).

Muito já se falou a cerca do papel pró-inflamatório da Interleucina-1, mas um amplo espectro de ações a ela atribuído é responsável pela reconstituição e reparação da cartilagem articular.

A interleucina-1 induz, através da membrana celular (nos condrócitos especificamente), uma sinalização intracelular afetando eventos da transcrição que regulam os processos de diferenciação celular, além dos processos homeostáticos de degradação e reparação da cartilagem.

Os condrócitos são importante fonte de fatores de crescimento que agem de maneira autócrina, influenciando uma gama de processos que incluem proliferação, diferenciação e função secretória. Por exemplo, o fator de crescimento transformador β (TGF β), um destes fatores de crescimento, tem sua expressão regulada pela interleucina-1 e participa do

crescimento e diferenciação dos condrócitos. Isto contribui diretamente para a reparação da matriz extracelular da cartilagem articular, opondo-se aos efeitos catabólicos classicamente atribuídos à interleucina-1 (TAKAFUJI et al., 2005).

É interessante observar, ainda, que existem notáveis diferenças na resposta metabólica da cartilagem articular madura e a imatura à estimulação pela interleucina-1; a expressão fenotípica dos condrócitos na cartilagem articular eqüina é distintamente modulada durante fases de crescimento e fases de maturação; à medida que o animal envelhece parece que a influencia da interleucina-1 vai da regulação de vias de degradação em direção a regulação da biossíntese e coincide com uma redução na taxa metabólica do condrócito maduro. Alterações nos receptores de membrana para expressão de IL-1 ou alteração no processamento pelo segundo mensageiro do sinal entre a interleucina 1 e seu receptor podem desempenhar um papel na explicação destes fenômenos e estão em estudo (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

2.6 OS RECEPTORES DA INTERLEUCINA-1 (IL-1R)

Os receptores de IL-1 são membros da família de receptores Toll-símile. Esta superfamília de receptores representa um sistema antigo de sinalização que foi inicialmente identificado na *Drosophila melanogaster*. A introdução de um patógeno na *Drosophila* leva à ativação de proteases que clivam um precursor e geram um ligante extracelular de um receptor chamado Toll, cuja porção intracelular é homóloga à cauda citoplasmática do receptor de IL-1 (REED et al., 2004).

Uma característica comum a toda esta família de receptores é que a sinalização é iniciada através do recrutamento de proteínas tirosina-quinases e outras proteínas citosólicas para o receptor. Apesar da maioria dos receptores de interleucinas não terem atividade quinase intrínseca, eles possuem uma família de proteínas Janus-tirosina-quinases (JAKs) associadas com sua cauda citoplasmática. Depois da interação do ligante com seu receptor, as JAKs associadas ao receptor são ativadas. Uma família de fatores transcricionais (STATs) são, por sua vez, ativadas pela fosforilação da tirosina pelas JAKs ativadas, permitindo que as STATs dimerizem. Após sua dimerização as STATs translocam para o interior do núcleo e se ligam à seqüência de DNA, que elas reconhecem através de um domínio de ligação do DNA. Subsequentemente, a ligação das proteínas STATs ao DNA modula a expressão genética.

Em adição às JAKs e STATs outros fatores transcricionais podem ativar múltiplos genes envolvidos na resposta inflamatória e na apoptose; um deles, o fator nuclear K β (NF- κ B), regula muitas citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-1 (REED et al., 2004).

Os receptores de interleucina-1 (IL-1R) são específicos, uma vez que não reconhecem outras citocinas, mas na interação interleucina-receptor não há distinção entre as formas IL-1 α e a IL-1 β , que competem entre si pela ligação ao sítio. Em geral a ligação se relaciona com a capacidade da célula de responder a IL-1.

Algumas células expressam números excepcionalmente altos de receptores (5 a 20000). No geral, contudo, as células expressam poucos receptores (100 a 200 por célula) e este baixo número de receptores expressos nas células responsivas representa um dos aspectos fundamentais da biologia da interleucina-1. É provável que uma baixa ocupância de receptores seja suficiente para desencadear eventos intracelulares; esta explicação é reforçada pela observação de que menos de 5% de ocupância dos receptores desencadeia a fosforilação dos IL-1RtI restantes e induz uma resposta biológica (MALYAK et al., 1993).

Existem algumas proteínas que se ligam a IL-1 e entre elas, duas, com particular peso molecular, eram proeminentes; atualmente demonstrou-se que elas são produtos genéticos distintos e são reconhecidas como as duas principais moléculas de receptor de IL-1. A p80IL-1R, ou receptor do tipo I, é chamada de IL-1RtI e a p68 é o IL-1RtII e é chamada de receptor do tipo II. Apesar de haver pouca especificidade entre espécies em relação aos efeitos biológicos da IL-1, as respostas biológicas que envolvem células que expressam primariamente o receptor tipo II parecem ser mais espécie-específicas do que as repostas das células que expressam o receptor tipo I (DINARELLO, 1991).

Com base na dedução da seqüência de aminoácidos do IL-1RtI e do IL-1RtII equino sabe-se que eles demonstram, respectivamente, 77% e 70% de homologia com os receptores humanos, 64% e 60% de similaridade com a seqüência de receptores do camundongo e 63% e 57% de similaridade em relação aos receptores dos tipos I e II do rato (KIRISAWA et al., 2006).

O IL-1RtI é encontrado em queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais, hepatócitos, células de revestimento sinovial e condrócitos. Ele pertence a superfamília das Imunoglobulinas (Igs) e possui um segmento extracelular que contém três domínios homólogos para Igs além de vários locais para glicosilação; existe uma única porção transmembrânica de aproximadamente 21 aminoácidos e uma região citosólica.

Esta região citosólica não possui homologia com nenhuma proteína-quinase conhecida, mas os resíduos serina/treonina são fosforilados logo após a ligação da IL-1 aos domínios extracelulares (DINARELLO, 1991).

Após a ligação da IL-1 com o receptor ela é internalizada e não é degradada, sendo encontrada no núcleo após várias horas. Apesar desta translocação implicar na existência de um sítio nuclear para a atividade biológica da IL-1, respostas biológicas, tais como rápidas mudanças no metabolismo do ácido aracdônico, acontecem em poucos minutos e são distintas das propriedades ligadas a crescimento e expressão genética da interleucina-1 (DINARELLO, 1991).

O IL_1RtI parece ser o responsável pela quase totalidade da atividade biológica da IL-1, mas os dois receptores cooperam na ligação e na transdução do sinal em algumas células (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

O IL-1RtII é encontrado nas células B, neutrófilos e células da medula óssea. Também é um membro da superfamília Ig com três domínios Ig-semelhantes no segmento extracelular, existindo 28% de homologia entre os aminoácidos das porções extracelulares dos receptores do tipo I e II. O segmento transmembrânico é altamente homólogo; contudo, uma importante diferença entre o tipo I e o tipo II de receptores é a porção citoplasmática truncada do tipo II. Este domínio citoplasmático encurtado pode explicar o menor peso molecular deste receptor e pode explicar as diferenças na transdução de sinais reportadas para IL-1 nas células B (DINARELLO, 1991).

Além de ser um produto genético distinto, com diferente peso molecular, o receptor do tipo II difere do receptor do tipo I nas afinidades de ligação, taxas de atividade e repouso, regulação da expressão de superfície e tipo de sinal transduzido. Por exemplo, a 37°C 60 a 70% dos receptores do tipo I são internalizados dentro de 5 minutos e permanecem no interior da célula por 12 horas, sendo apenas uma pequena porção degradada. A IL-1 ligada aos IL-1RtII, por outro lado, permanece na superfície por até 60 minutos, é pobremente internalizada e é encontrada no fluido extracelular em forma degradada. A meia-vida dos receptores tipo II nas células B é mais curta (2 horas) do que a do receptor tipo I nas células T (5 a 12 horas) (DINARELLO, 1991).

Apesar de ser geralmente aceito que o IL-1RtI reconhece as formas IL-1 α e IL-1 β igualmente, existe ampla evidência de que dependendo da célula ou da espécie animal as duas formas de IL-1 tem locais de ligação diferentes no IL-1R. Em geral a IL-1 α se liga melhor ao

receptor do tipo I a IL-1 β ao receptor do tipo II. Ainda, estudos demonstram marcadas diferenças nas respostas biológicas para cada uma das interleucinas -1 (DINARELLO, 1991).

Uma série de eventos bem estabelecida sucede a ligação da IL-1 a qualquer um dos tipos de receptores. Eles são: ligação, ativação da proteína GTP-ligante, aumento da atividade GTPase, ativação da adenilato-ciclase, síntese de AMP cíclico, ativação da proteína-quinase A e ligação dos fatores transcricionais ao NF-Kb (DINARELLO, 1991).

Existe evidência que a ligação da IL-1 com o IL-1RtI associada à proteína G ativa a fosfolipase C, que, por sua vez, induz rápida hidrólise de fosfolípides. Esta hidrólise leva a produção de diacilglicerol (DAG) que ativa proteína-quinases e, em última análise, leva a liberação de ácido aracdônico. O ácido aracdônico é metabolizado em prostaglandinas, o que explicaria o rápido- porém breve- aumento de PGE2 que é observado e a capacidade da IL-1 de aumentar a temperatura corpórea (DINARELLO, 1991).

Um outro efeito marcante que se segue à ligação da IL-1 a seus receptores é a modulação de processos mórbidos ou fisiológicos através da *upregulation* ou *downregulation* dos seus e de outros receptores; por exemplo, ela aumenta a ligação dos opióides aos seus receptores e diminui a expressão de superfície de seu próprio receptor tipoI, pela acelerada degradação do RNA m (DINARELLO, 1991).

2.7 ANTAGONISTAS DA INTERLEUCINA -1

Na cartilagem normal a homeostase é governada pelo equilíbrio entre os processos catabólicos e anabólicos. Teoricamente, a degradação da cartilagem associada à doença envolve um desequilíbrio onde o catabolismo dos componentes da matriz extracelular excede o anabolismo. Várias evidências sugerem que a atividade da interleucina-1, fundamental na regulação destes processos, seja controlada tanto pela alteração em sua produção como pela alteração nos níveis endógenos dos inibidores de sua atividade (MAY et al., 1992a).

Inibidores da atividade da interkeucina-1 devem ser parte dos mecanismos homeostáticos normais que regulam os efeitos da IL-1 nas funções de células inflamatórias e imunes. Contudo, pouco se sabe a respeito da regulação da produção destes inibidores e quais seriam os mecanismos intracelulares que influenciariam uma célula a produzir mais inibidor e menos IL-1 (AREND et al., 1989)

Na cartilagem articular acometida por osteoartrite, por exemplo, os condrócitos apresentam maior sensibilidade à estimulação da síntese de MPNs pela IL-1 do que as células normais; ainda, verifica-se aumento na densidade dos receptores para IL-1 nos condrócitos desta cartilagem alterada. O aumento da expressão dos receptores nas células de cartilagem afetadas pela AO pode explicar este aumento de sensibilidade; elas chegam a ter o dobro do número de locais para a ligação nos receptores quando comparadas aos condrócitos normais (MARTEL-PELLETIER et al., 1992).

Dado o impacto dos eventos desencadeados pela ligação da interleucina-1 a seu receptor, especial atenção foi dada aos eventos fisiológicos através dos quais ocorreria a regulação desta ligação nos tecidos hígidos. Esta regulação pode ocorrer através de mecanismos e fatores que antagonizam os efeitos da IL-1 e estes possuem, inegavelmente, aplicação prática nas enfermidades mediadas por ela.

Fatores de ocorrência natural com ação inibitória sobre a atividade da IL-1 podem ser lipoproteínas, lipídeos e a alfa-2 macroglobulina, mas estas moléculas também inibem outras citocinas como a IL-2 e a IL-6. Contudo, existem polipeptídeos que inibem especificamente a interleucina-1; eles foram detectados, por exemplo, no soro de voluntários humanos injetados com endotoxina bacteriana; na urina de pacientes febris; no plasma, após hemodiálise; no supernadante de monócitos humanos aderidos a superfícies cobertas por Ig-G e na urina de pacientes com leucemia monocítica. Neste último caso, este fator era uma proteína de peso molecular entre 23 e 25kDa, que agia como um inibidor natural da IL-1 bloqueando a capacidade da interleucina-1 de estimular a produção de PGE2 pelas células sinoviais, entre outras propriedades (DINARELLO, 1991).

Sua atividade inibitória também prevenia a proliferação de células T induzida por mitógenos devida a IL-1, mas não a IL-2 e bloqueava a ligação da IL-1 aos receptores nas células T e fibroblastos; também não afetava a ligação do TNF- α ou da IL-2 aos seus receptores.

Ainda, este inibidor da interleucina-1 não se ligava propriamente a interleucina-1, portanto não era um receptor solúvel; receptores solúveis para IL-1 ainda não foram encontrados naturalmente.

O agente em questão era um inibidor competitivo da interação IL-1 – IL-1R, um antagonista do receptor da interleucina-1, o IL-1ra (DINARELLO, 1991).

2.7.1 O IL-1RA

A existência de um antagonista natural do receptor da IL-1 sugere que o organismo construa sua própria resposta em relação à inflamação e que a síntese do IL-1ra é uma parte natural da resolução de processos mórbidos.

Os conhecimentos básicos sobre o IL-1ra vêm de estudos realizados na espécie humana (DINARELLO, 1991), mas as similaridades estruturais entre o IL-1ra humano e o eqüino, o do coelho e o do rato sugerem que o IL-1ra do cavalo compartilha funções biológicas básicas com aquelas exibidas pelo antagonista das outras espécies (KATO et al., 1997). O grau de preservação do gen do IL-1ra pode indicar seu papel vital na regulação das proteínas agonistas, as quais exibem redundância biológica em muitos aspectos.

Atualmente o IL-1ra é o único antagonista de receptor puro descrito para os hormônios e citocinas conhecidas, sendo uma proteína com atividade biológica peculiar (HOWARD et al., 1998).

Este antagonista do receptor da interleucina-1 é um polipeptídeo de aproximadamente 17kDa; a sequência de aminoácidos mostrou 23,8% de homologia em relação a IL-1 β e 26,3% em relação a IL-1 α (KATO et al., 1997).

O antagonista do receptor bloqueia virtualmente todas as respostas biológicas antecipadas com a adição de IL-1 a uma cultura de células; também bloqueia a capacidade da interleucina -1 de ativar uma proteína-quinase nos fibroblastos, que é um evento bastante precoce após a ligação da IL-1 ao receptor. Ele bloqueia a atividade da interleucina-1 *in vivo* e *in vitro* e, por consequência, a síntese de PGE2 pela sinóvia induzida pela IL-1, além da síntese de colagenase pelos condrócitos (DINARELLO, 1991).

Ele compete especificamente com a IL -1 pela ocupação dos receptores de superfície, mas é incapaz de desencadear as respostas típicas da IL-1. Uma explicação para a inabilidade do IL-1ra de estimular a ativação da proteína-quinase (como faz a IL-1) e de se internalizar (como faz a IL-1) após a ligação com o receptor, para iniciar a transdução do sinal, vem da comparação das estruturas envolvidas no complexo receptor-ligante.

Ao contrário da IL-1 o IL-1ra tem um sinal peptídico clássico e é secretado no compartimento extracelular, enquanto numa mesma cultura de células apenas 50% da IL-1 β e menos de 10% da IL-1 α é secretada.

A afinidade do antagonista pelo receptor existente nas células é semelhante à da IL-1 α e IL-1 β e a ocupância dos dois tipos de receptores pelo agonista bloqueia a ligação da IL-1, sem transdução do sinal pelo núcleo.

Um excesso de 10 a 100 vezes de antagonista (IL-1ra) é necessário, *in vitro*, para inibir 50% das respostas nas células que expressam estes receptores (BRESNIHAN et al., 1998); isto é consistente com a presença de um grande excesso de receptores na superfície das células responsivas a IL-1, comparado com o número de receptores que deve ser ocupado para desencadear a resposta biológica a IL-1.(DINARELLO, 1991; KATO et al., 1997). Isto explica porque a presença aparentemente paradoxal de IL-1ra no líquido sinovial de articulações não inibe, necessariamente e/ou totalmente, os sinais da inflamação. A relação entre a quantidade de IL-1 e de seu antagonista é que é o fator decisivo na resposta biológica resultante dos tecidos.

Ainda em relação à resposta biológica, estudos realizados por Campion e col, (HENDERSON; PETTIPHER, 1985) sugerem que a frequência da administração do IL-1ra é mais importante do que a dose, atribuindo um papel essencial para a prolongada expressão protéica do gen do antagonista através da transferência genética. No entanto, trabalhos atuais demonstram que a concentração média deste antagonista no líquido sinovial de articulações tratadas com IL-1ra aumentava significativamente em relação a um grupo placebo, e se mantinha elevada por mais de um mês após o início desta observação (FRISBIE et al., 2007).

O IL-1ra também bloqueia a produção de IL-1 induzida pela própria IL-1, TNF e IL-6 por monócitos; contudo 50% da inibição é observada em taxas equimolares, enquanto que com um excesso de 10 vezes na concentração molar do antagonista em relação a IL-1 a inibição é completa.

O efeito do IL-1ra nos modelos empregando animais de doenças como o choque séptico, a colite induzida por imunocomplexos, a diabetes e a artrite reagudizante é da mesma natureza.

Em relação às respostas imunes específicas e defesas naturais, mais estudos são necessários para examinar os efeitos do IL-1ra nos animais de diferentes constituições genéticas através de tratamentos de longo prazo com espécies homólogas do IL-1ra. Contudo, o bloqueio de curta duração da IL-1 endógena não prejudica a função imunológica em humanos.

Nos mecanismos de defesa, a IL-1 aumenta a resistência não específica à infecção e à inflamação e especulou-se que seu bloqueio pelo antagonista pudesse, assim, afetar negativamente o curso de algumas doenças. O IL-1ra produzido endogenamente

provavelmente contribui para limitar a severidade das enfermidades, mas pode ser inadequado em infecções de grande magnitude e na inflamação aguda. Este efeito parece estar relacionado à dosagem de IL-1ra administrada, estando as maiores concentrações associadas aos efeitos deletérios.

O IL-1ra é naturalmente sintetizado em animais com sepsis e em humanos com uma variedade de doenças inflamatórias e infecciosas; o equilíbrio entre a produção de interleucina-1 e do antagonista de seu receptor pode ser crítico em várias doenças. A expressão genética e síntese protéica de ambos, agonista e antagonista de receptor, são reguladas diferentemente (por exemplo, a IL-1 β é transcrita e sintetizada nas células antes que o IL-1ra) e os efeitos da falta de sincronia e equilíbrio entre estes eventos tem sido estudados em humanos. Eles são provável fator contribuinte na fisiopatologia de vários processos mórbidos.

2.7.1.1 APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS DO IL-1RA

Especialmente na década de noventa, vários pesquisadores estudaram formas de dar aplicabilidade terapêutica à descrição do antagonista natural do receptor de interleucina-1.

A clonagem do IL-1ra abriu novas perspectivas neste campo, tendo sido realizados estudos com IL-1RtI e IL-1RtII recombinantes solúveis (DINARELLO, 1991). Estes estudos permitiram a clonagem dos cDNAs do IL-1RtI e IL-1RtII e um maior conhecimento sobre a estrutura destas moléculas, sendo ambas capazes de se ligar a IL-1 α e IL-1 β e também de bloquear a atividade da IL-1 *in vivo* e *in vitro*. Contudo estes receptores solúveis têm baixa atividade bloqueadora contra a IL-1 α e IL-1 β (KIRISAWA et al., 2006).

Como outra possibilidade, a administração da proteína IL-1ra em artrite experimental mostrou capacidade de inibir a produção de PGE₂ pelos condrócitos e células sinoviais e a produção de collagenase pelas células ativadas pela IL-1 (AREND et al., 1990). A administração intravenosa de IL-1ra mostrou efeitos protetores nos tecidos articulares depois da administração intra-articular de IL-1 (HENDERSON et al., 1991).

Para evitar a necessidade de administração diária e para manter níveis mais consistentes de IL-1ra, pesquisadores exploraram a expressão do gen de IL-1ra como forma de intervenção terapêutica. O equino, por apresentar a osteoartrite em estado natural, foi uma

das espécies escolhidas para usar avaliar o emprego potencial da transferência genética como modalidade terapêutica. Esta forma de terapia está em constante evolução na medida em que os conhecimentos sobre o curso da doença que ela pretende modificar também estão. A flexibilidade dos sistemas de administração para a expressão de novas seqüências genéticas, somada à crescente compreensão destas seqüências e de seu papel biológico, também implica em constante investigação,(FRISBIE; MCILWRAITH, 2000).

Através da engenharia genética, um adenovírus ou um retrovírus seriam utilizados para introduzir genes capazes de codificar a expressão de proteínas de interesse, no caso o IL-1ra, em articulações afetadas, por períodos prolongados. Existem várias estratégias para a transferência de genes, e novas metodologias continuam a ser desenvolvidas. É necessário considerar a melhor estratégia para cada doença. Terapias sistêmicas e locais têm as suas vantagens e desvantagens. As primeiras permitem que os produtos genéticos secretados tenham acesso à circulação sistêmica e que a produção genética atinja todas as articulações. Contudo, se este produto for uma proteína, o acesso às articulações pode ser limitado. As terapias locais podem implicar na necessidade de múltiplas injeções no caso de várias articulações estarem acometidas, como acontece com a terapia à base de corticóides.

No entanto, as principais vantagens da terapia local em relação à sistêmica são a probabilidade de efeitos colaterais indesejados serem mínimos na primeira, uma vez que os produtos genéticos são sintetizados no compartimento intra-articular, e as concentrações mais altas das proteínas de interesse serem observadas particularmente nas áreas afetadas. Ainda, órgãos não discriminados como alvos terapêuticos receberão menos exposição.

A sinóvia é atrativa como órgão alvo pela sua grande superfície de área e seu contato direto com todo o espaço articular. Apesar da cartilagem articular ser um outro órgão alvo em potencial dentro da articulação, a falta de penetração pelo vetor através da matriz extracelular tem sido citada como uma limitação para a eficiência da transdução, podendo restringir seu uso até que vetores mais especializados sejam adotados para este propósito (FRISBIE; MCILWRAITH, 2000). Além da localização protegida dos condrócitos no interior da matriz extracelular, as baixas taxas de biossíntese e proliferação destas células reduzem sua aplicabilidade nas terapias de transferência genética (MCNEIL et al., 1985).

Na terapia genética local, dois métodos de transferência de genes para a articulação são de especial interesse: o *ex vivo* e o *in vivo*. A transferência genética *ex vivo* se refere à coleta, preservação e modificação genética *in vitro* de células, seguida por sua transplantação de volta para o paciente. A transferência genética *in vivo* se refere à aplicação direta do vetor nos órgãos alvo.

Os sistemas de transferência *ex vivo* foram extensivamente pesquisados em ratos e coelhos e mostraram transferir gens com eficiência para as células de revestimento sinovial utilizando vetores retrovirais, um dos mais frequentemente utilizados. Neles, células sinoviais são cirurgicamente removidas do paciente e utilizadas como fonte de sinoviócitos. Estes são cultivados em meios específicos e, a seguir, são infectados por um vetor viral capaz de codificar um gen de interesse. Estas células infectadas são, então, devolvidas para o paciente por meio de uma injeção intra-articular. Este método mostrou ser capaz de induzir a produção de proteínas marcadas e de quantidades significativas de IL-1ra biologicamente ativa em ratos e coelhos. Níveis de IL-1ra foram detectados em articulações contendo sinoviócitos transduzidos por aproximadamente 5 semanas, apesar dos níveis estarem decaindo rapidamente nesta fase. (FRISBIE; MCILWRAITH, 2000)

A transferência genética usando o método *ex vivo* evita que partículas virais sejam introduzidas na articulação (limitando a sensibilização ao vetor) e permite que todas as manipulações genéticas ocorram fora do organismo (testes de segurança podem ser feitos antes da reintrodução das células de volta para o paciente). Uma grande limitação para o uso desta metodologia reside no tempo necessário para coleta, cultivo, manipulação e transferência das células transduzidas, somado aos altíssimos custos em que implica (FRISBIE; MCILWRAITH, 2000).

Na transferência genética *in vivo* para o tratamento das doenças articulares o vetor é infectado diretamente na articulação de interesse, constituindo-se numa modalidade terapêutica mais conveniente; ela também não apresenta as limitações técnicas e de custos apresentadas anteriormente com a transferência *ex vivo*. Uma vez que a transferência *in vivo* envolve a introdução direta de vetores no organismo o controle destes vetores é menos rígido, apesar de, até o momento, efeitos colaterais não terem sido exibidos.

O vetor ideal deve possuir três propriedades: habilidade de integrar e manter expressão regulada do gene transduzido; não induzir respostas imunológicas nos órgãos ou organismos-alvo e, por fim, não estar associado com quaisquer repercussões deletérias para o recipiente.

Um grande número de seqüências genéticas de proteínas que exibem propriedades anti-artríticas existe e um outro está sendo desenvolvido. A espécie equina foi escolhida para os estudos iniciais com o antagonista do receptor da interleucina-1 por sua satisfatória caracterização no cavalo, pela abundância de informação histórica sobre seu potencial anti-artrítico em outras espécies e ainda pela extensa documentação e relevância clínica da osteoartrite nos eqüinos. (FRISBIE; MCILWRAITH, 2000)

O papel da super expressão da sequência genética do IL-1ra através da transferência de gens mediada por adenovírus é bem descrita; esta expressão intra-articular do IL-1ra tem efeitos favoráveis, como a *upregulation*, por 28 dias, da expressão do IL-1ra; a significativa melhora nos parâmetros clínicos de dor e atividade da doença; e efeitos benéficos em parâmetros histológicos medidos a partir de membrana sinovial e cartilagem articular, quando comparadas a articulações não transduzidas. (FRISBIE; MCILWRAITH, 2000). Contudo, vetores adenovirais apesar de apresentarem satisfatória eficiência na transdução, exibem expressão transgênica por curtos períodos e, ainda, são alvos de respostas imunes por parte dos tecidos nos quais são inoculados. (FRISBIE et al., 2002)

A utilização de retrovírus, por sua vez, além de laboriosa não demonstrou expressão genética por períodos consideráveis, além de ter custo proibitivo (FRISBIE et al., 2002).

A utilização de gens de proteínas autólogas deve aumentar a eficiência destas técnicas, conforme sugerem trabalhos recentes (FRISBIE et al., 2002).

Ainda, foi descrito um método para produção de IL-1ra a partir da coleta de sangue total em uma seringa especialmente tratada para estimular células monucleares a produzirem citocinas anti-inflamatórias, entre elas o IL-1ra (MEIJER et al., 2003). Em outras palavras, o tratamento físico-químico do sangue total é capaz de induzir à produção de citocinas autólogas. O fato de empregar-se sangue total ao invés de monócitos purificados e a natureza factível do estímulo necessário para produzi-las confere imediata aplicação clínica à técnica.

A seringa contém esferas de vidro tratadas com sulfato de cromo; a interação entre a superfície das esferas de vidro e o sangue total aumenta a produção de IL-1ra e outras citocinas antiinflamatórias. Após a remoção das esferas e centrifugação, o plasma resultante é o material a ser empregado terapeuticamente. A exposição do sangue total às esferas desencadeia um aumento rápido e vigoroso na produção de várias citocinas antiinflamatórias, incluindo o IL-1ra, IL-4 e IL-10. Estas duas últimas são levemente aumentadas após a exposição às esferas de vidro.

O achado de que a expressão do IL-1ra começa com 30 minutos da retirada de sangue, leva à questão de se o antagonista é sintetizado *de novo*; a observação de que com a incubação a concentração do IL-1ra aumenta constantemente, sugere esta síntese *de novo*. Isto foi confirmado pela capacidade da cicloheximide de inibir a acumulação de IL-1ra. A concentração de IL-1ra aumentou 140 vezes durante o período de incubação de 24 horas (MEIJER et al., 2003).

A indução da produção de IL-1ra no sangue total foi tão alta quanto nos cultivos de monócitos purificados expostos a IgG e ocorre sem a indução de IL-1 β ou TNF- α . A

magnitude do aumento da concentração de IL-1ra depende do tipo de vidro utilizado. A incubação com as esferas empregadas por estes autores não leva à morte celular, conforme fica evidenciado pela queda na concentração de glicose e a ausência de produção de IL-1 β e TNF- α . O conteúdo de potássio aumentou apenas ligeiramente, também corroborando para a confirmação da suspeita de que não ocorreu hemólise significativa. Adicionalmente, análise das proteínas indicou que a composição das principais proteínas séricas não se alterou.

Trabalhos recentes avaliaram clinicamente a eficácia deste tratamento frente à criação de um modelo pré-estabelecido de OAE, com grupo placebo, e os resultados foram de melhora estatisticamente significativa nos índices de claudicação; melhora nos testes de flexão; melhora à palpação; menor presença de efusão sinovial; diminuição de hiperplasia da membrana sinovial; tendência à melhora da cartilagem na avaliação imunohistoquímica e na avaliação macroscópica no momento da necropsia. Uma melhora no aspecto radiográfico, associada a diminuição das alterações patológicas na membrana sinovial de articulações osteoartíticas também foi observada após o tratamento com IRAP, quando comparadas com o grupo que recebeu placebo. Ainda mais, outras variáveis incluindo a erosão total da cartilagem, o escore de hemorragia da membrana sinovial e a análise do líquido sinovial parecem indicar melhora nas articulações tratadas com IRAP, porém de forma não significativa (FRIBIE et al., 2007)

2.8 A PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO (EROS)

As células produzem energia reduzindo o oxigênio molecular à água. Durante este processo, pequenas quantidades de formas parcialmente reduzidas do oxigênio são geradas, inevitavelmente, como subprodutos da respiração mitocondrial. Algumas destas formas podem causar danos a lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos e são chamadas de espécies reativas do oxigênio (EROs) ou radicais livres.

A presença constante do oxigênio molecular (que apresenta dois elétrons não pareados) nos organismos aeróbios e sua pronta capacidade de óxido-redução explicam a frequência e a importância das EROs (LAURINDO et al., 1997).

Os radicais livres são espécies químicas que possuem um elétron não pareado na camada orbital externa; a energia criada por esta configuração instável é liberada através de reações com moléculas adjacentes, orgânicas ou inorgânicas e particularmente com moléculas

chaves nas membranas e ácidos nucleicos (KUMAR et al., 2005). Ou seja, na busca de estabilidade estrutural, estas moléculas de configuração instável procuram se combinar com outros átomos ou moléculas, de maneira a adquirir ou perder um elétron. Como a grande maioria das moléculas encontradas *in vivo* não é radical livre, contendo apenas elétrons pareados, sua interação com estes radicais freqüentemente deflagra reações em cadeia e o aparecimento de novos elementos instáveis com elétrons não pareados. Neste processo podem ser danificados não somente componentes de membrana celular como elementos intra e extracelulares, enzimas e ácidos nucleicos, mediadores intercelulares, proteases e tecido conectivo. A única possibilidade de reações terminais ocorre quando dois radicais se encontram, neutralizando-se mutuamente, com o desaparecimento de ambos. Neste caso, combinam seus elétrons não pareados e formam ligações covalentes. São exemplos de EROs o radical ou ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila ($OH^\cdot$) o *oxigen singlet* e, o principal deles, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (LAURINDO et al., 1997).

Entre os radicais oxidativos, considera-se o $OH^\cdot$ o oxidante mais potente em sistemas biológicos, visto que apresenta tempo de atuação extremamente curto (1×10^{-9} segundos) e alta reatividade com uma ampla variedade de moléculas orgânicas (YU, 1994).

As células possuem mecanismos de defesa enzimáticos e não enzimáticos contra as EROs, minimizando seus efeitos indesejáveis nos tecidos e evitando que causem injúrias. O sistema antioxidante enzimático envolve as enzimas SOD, glutathione peroxidase (GSH-PX), glutathione redutase (GSSG-GR) e a catalase (CAT), que são, respectivamente, responsáveis pela remoção do O_2^- , de hidroperóxidos orgânicos e do H_2O_2 . Já o sistema não enzimático abrange, principalmente, as vitaminas E, C e A, a glutathione reduzida (GSH), a ubiquinona, o ácido úrico, a L-cisteína, a fenilalanina e a glicose (YU, 1994).

Contudo, um desequilíbrio entre a produção de EROs e os sistemas de proteção antioxidante resulta num fenômeno conhecido como estresse oxidativo. Esta condição é associada à injúria celular observada em várias condições mórbidas (KUMAR et al., 2005).

Muito embora a cadeia mitocondrial de transporte de elétrons seja o principal local de produção de espécies reativas do oxigênio (fosforilação oxidativa), os fagócitos e neutrófilos podem gerar grandes quantidades destes radicais por meio da ação do complexo enzimático fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) oxidase, localizado na superfície celular, num processo conhecido por explosão respiratória (*burst* oxidativo), posto que é acompanhado por um aumento transitório do consumo de oxigênio em quase 100 vezes (JANEWAY et al., 2004). O processo envolve a ação da enzima proteína-quinase C (PKC), para a qual, a ativação da enzima tirosina-quinase (PTK), cuja expressão está restrita aos

fagócitos, é um elemento chave (WELCH et al., 1996; HODGSON et al., 2006). O *burst* oxidativo compreende uma série de reações bioquímicas de alto consumo de oxigênio, que resulta na produção das EROs.

O produto primário deste sistema de oxidase é o oxigênio reduzido em um elétron, ou seja, O_2^- , que, em sua maior parte, é convertido, pela ação da superóxido dismutase (SOD), em H_2O_2 (BABIOR, 1984). Por meio de via não enzimática, o H_2O_2 é convertido em $^{\cdot}OH$, em uma reação catalisada pelo Fe^{2+} . Por outro lado, dentro do fagolisossomo, a enzima mieloperoxidase (MPO) e o H_2O_2 formam um complexo com o potencial de reagir com íons cloreto, produzindo grande quantidade de agentes antimicrobianos tóxicos, tais como o ácido hipocloroso, que ataca o patógeno diretamente ou reage com compostos intermediários do nitrogênio formando compostos altamente reativos, como as cloraminas (SHEPHERD, 1986).

Segundo Silveira (2004), outras fontes de radicais oxidativos (EROs) incluem: i) peroxissomos, nos quais ocorre a formação de H_2O_2 quando ácidos graxos de cadeias longas são metabolizados via β -oxidação; ii) isquemia, quando a molécula de AMP é continuamente degradada a hipoxantina, podendo ser, em seguida, convertida em xantina e ácido úrico por ação da xantina oxidase, que utiliza o O_2 comoceptor final de elétrons, formando O_2^- ; iii) hemáceas, quando da metabolização de oxihemoglobina- Fe^{2+} em desoxihemoglobina- Fe^{3+} ; iv) por meio do citocromo P450; ou v) na via de formação do ácido araquidônico.

Em macrófagos e neutrófilos não ativados e não estimulados o sistema da oxidase encontra-se latente e dissociado entre o citosol e a membrana celular, não ocorrendo a produção das EROs. A produção se dá devido quando da ativação da oxidase de membrana, a NAD(P)-oxidase, que catalisa a redução do oxigênio molecular na dependência da oxidação da piridina nucleotídeo (MC PHAIL et al., 1985; MASSOCO, 2003).

A atividade do *burst* oxidativo, induzida pela fagocitose ou por estímulos solúveis, causa um aumento no consumo de oxigênio não mitocondrial e gera uma variedade de EROs; nas células fagocíticas elas são importantes para a morte dos microorganismos ingeridos e nas células não fagocíticas o aumento no *burst* oxidativo indica a ativação celular.(RAIDAL et al., 1998)

Contudo, ainda que os fagócitos utilizem o potencial oxidante das EROs na remoção de patógenos, altos níveis destas espécies e de outros radicais livres podem causar efeito deletério no organismo. Este efeito descreve um fenômeno conhecido como estresse oxidativo, no qual lipídios, proteínas e ácidos nucléicos podem sofrer oxidação, comprometendo as principais funções celulares (YU, 1994).

Na articulação, especificamente, o interesse pelas EROs aumentou após o trabalho de

McCord e Fridovich (1969) que relacionou a diminuição da viscosidade do líquido sinovial na artrite reumatóide com a redução similar da viscosidade do líquido sinovial ou do ácido hialurônico, quando este é exposto a sistemas produtores de EROs, *in vitro*. Outros estudos *in vitro* tem confirmado a capacidade lesiva das EROs sobre as macro moléculas dos tecidos conectivo, cartilaginoso e vascular; elas atuam sobre o ácido hialurônico, a matriz extracelular, colágeno, assim como sobre células endoteliais (no 24: 7, 13, 44 ,45, 76,86, 102) (BLAKE et al., 1981; MCNEIL et al., 1985; BURKHARDT et al., 1986; PETROV et al., 2005).

O processo inflamatório articular implica na liberação sequencial de mediadores de fase aguda que vão resultar na agregação plaquetária, infiltração de macrófagos e polimorfonucleares em resposta a sinais quimiotáticos, ativação de células endoteliais e sinoviócitos. . É fundamentalmente a ativação dos polimorfonucleares a responsável pela produção de EROs, apesar de macrófagos, sinoviócitos , linfócitos e células endoteliais também serem capazes de produzi-las (LAURINDO et al., 1997).

Citocinas, como a Interleucina 1 e o fator de necrose tumoral α também são capazes de estimular condrócitos normais a produzirem EROs (TIKU et al, 1990).

2.9 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE OXIDATIVA

A atividade oxidativa de leucócitos pode ser monitorada a partir de ensaios de consumo de oxigênio, *shunt* de hexose monofosfato (HMPS), geração de radicais oxidativos, geração de produtos reduzidos (por exemplo, iodinação protéica ou redução do corante tetrazólio – NBT) ou por ensaios de quimioluminescência (BABIOR, 1978a,b; DECHATELET, 1978; SZEJDA et al., 1984; FLAMINIO et al., 2002; HODGSON et al., 2006). Para tanto, geralmente, faz-se necessário o isolamento destas populações celulares, que pode representar uma fonte de variação entre os ensaios (KAMPEM et al., 2004), e assume-se que as células assim isoladas respondem de maneira homogênea (BASS et al., 1983).

O ensaio ideal para a avaliação da atividade oxidativa de leucócitos deve ser tecnicamente simples e prover resultados quantitativos e qualitativos de um grande número de células individualmente, sem a necessidade de prévio isolamento das populações leucocitárias (VOWELLS et al., 1995). Destarte, métodos fluorescentes são considerados ferramentas promissoras para revelar os papéis biológicos de diversas moléculas e, mais especificamente, para monitorar a produção de EROs em diferentes populações celulares, provenientes de

diferentes tecidos. Soh (2006) realizou ampla revisão acerca dos métodos fluorescentes utilizados para a detecção específica dos diferentes radicais oxidativos.

O citômetro de fluxo é um aparelho utilizado para a avaliação qualitativa e quantitativa de células em suspensão (ROITT et al., 1985). Para tal, baseando-se no uso de radiação laser, fluxo hidrodinâmico, mecanismos ópticos e de recursos de informática, fornece informações a cerca do tamanho relativo das células (*forward scatter characteristic* – FSC) e de sua granulosidade ou complexidade interna (*side scatter characteristic* – SSC), permitindo que as mesmas sejam agrupadas em populações conforme seus parâmetros morfológicos. Ainda, possibilitam a mensuração da fluorescência emitida pelas células individualmente (MCCOY, 1994).

Em resumo, o uso das técnicas de citometria de fluxo facilitou a avaliação *in vitro* da função dos neutrófilos por permitir a rápida avaliação de um grande número de células, uma a uma, sendo esta técnica mais acurada que os métodos convencionais que se baseiam em contagem celulares ou na resposta média de um grupo de células. Subpopulações de células podem ser identificadas e avaliadas, eliminando a necessidade de separação prévia destes grupos celulares; além de demorada, esta separação pode trazer prejuízos à função celular (MCTAGGART et al., 2001).

O princípio básico dos métodos de citometria de fluxo é que as células são carregadas com uma substância precursora não fluorescente que é rapidamente oxidada em um produto fluorescente pelos componentes resultantes do *burst* oxidativo. Após serem carregadas com o precursor, as células são expostas a um estimulante para induzir a resposta do *burst* oxidativo; a diclorofluoresceína (DCFH) é a substância precursora utilizada na maioria dos experimentos.

Já em meados da década de 1960, Brandt e Keston (1965) utilizaram o diacetato de 2,7-Diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) para medir H_2O_2 em soluções aquosas, especialmente em fluidos sobrenadantes de cultivos celulares. Menos de vinte anos depois, Bass et al. (1983) foram os primeiros a aplicar este método à análise, por citometria de fluxo, da geração de H_2O_2 por neutrófilos.

Por ser o grupo diacetato apolar, o DCFH-DA difunde-se através da membrana celular em diferentes tecidos e, no citoplasma, é hidrolizado por esterases, deixando livres as moléculas de DCFH. Por serem, por sua vez, polares, estas moléculas permanecem no interior da célula e tornam-se substratos para o H_2O_2 gerado durante o metabolismo oxidativo. Esta oxidação gera 2,7-diclorofluoresceína (DCF), um produto intracelular altamente fluorescente (BASS et al., 1983; RAIDAL et al., 1998).

A fluorescência produzida pelo DCF é diretamente proporcional à atividade do metabolismo respiratório e parece ser mediada apenas pelo H_2O_2 (HIRABAYASHI et al., 1985). Deste modo, utilizando-se de citometria de fluxo para mensurar a fluorescência de cada célula, o ensaio com DCF pode prover a quantificação da atividade oxidativa em células individuais (BASS et al., 1983).

Ressalta-se que, apesar de resultados divergentes no tocante à especificidade do DCFH pelo H_2O_2 (BASS et al., 1983; RAO et al., 1992; WALRAND et al., 2003; KIM et al., 2006; SOH, 2006), resultados *in vitro* evidenciaram uma baixa especificidade pelos demais radicais (SILVEIRA, 2004).

Os ensaios podem ser realizados após estímulo com ativadores, solúveis ou particulados, da produção de radicais oxidativos (WATSON et al., 1995). Estes estímulos incluem bactérias opsonizadas ou não (como *Staphylococcus aureus* conjugados com iodeto de propídio – SaPI), partículas como *zymosan*, proteínas surfactantes, citocinas, componentes da cascata do complemento, LPS (ou endotoxinas) de *Escherichia coli* ou 12-miristato 13-acetato de forbol (*Phorbol 12-Myristate 13-Acetate* – PMA), um ativador da PKC (HODGSON et al., 2006).

A interação destes ativadores com receptores da membrana plasmática dos fagócitos ou com o citocromo b558, dentro de grânulos citoplasmáticos, induz o aumento do consumo celular de O_2 pelo complexo NADPH oxidase (HODGSON et al., 2006).

Não obstante a ampla variedade de métodos baseados na citometria de fluxo para avaliar simultaneamente a fagocitose e o metabolismo oxidativo de células humanas (SILVEIRA, 2004; SOH, 2006) também já empregados para a avaliação da resposta imune de eqüinos (FLAMINIO et al., 2002; MASSOCO; PALERMO NETO, 2003), somente um estudo foi realizado empregando-o para analisar leucócitos do líquido sinovial de eqüinos (MASSOCO et al., 2006). Este estudo demonstra a viabilidade da técnica de citometria de fluxo em quantificar a produção das EROs proveniente das células do líquido sinovial nesta espécie (MASSOCO et al., 2006).

3 OBJETIVOS

Avaliar os efeitos antiinflamatórios da proteína antagonista de receptor da interleucina-1 (IRAP®) em líquido sinovial de equino.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio pelas células de líquido sinovial de equino, frente diferentes estímulos *in vitro*, ou seja, PMA, LPS, plasma e IRAP.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizadas 92 articulações tíbio-társicas de eqüinos gentilmente cedidos pelo Instituto Butantan – São Paulo, pela Fazenda Santa Rita-Piracaia/S.P., e pelos Serviços de Cirurgia de Grandes Animais e Clínica Médica de Eqüinos do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ –USP).

Para a colheita de sangue foram utilizados 11 eqüinos sadios alojados na Sociedade Hípica Paulista, Clube Hípico de Santo Amaro e Fazenda e Haras Bobeta - São Paulo.

Os animais utilizados no experimento não foram deslocados de suas moradias, ou seja, foram mantidos em cocheiras sob condições naturais de luz, temperatura e umidade, ou a pasto. Receberam como alimento ração balanceada, suplementada com feno de gramínea *coast cross* (*Cynodum dactylum*) ou pastagem; água foi fornecida *ad libitum*. Cada animal foi utilizado apenas uma única vez.

4.2 EXAME CLÍNICO UTILIZADO PARA A ESCOLHA DOS ANIMAIS

Foram escolhidos os animais que não apresentaram histórico de lesões na articulação tíbio-társica, que não demonstraram claudicação após exame físico, e que não eram responsivos ao teste de flexão dos membros posteriores.

4.3 COLHEITA DO LÍQUIDO SINOVIAL

Foram colhidas amostras de 4 mL de líquido sinovial das articulações tíbio-társicas. Para cada ensaio foi necessário aproximadamente 80 mL de líquido sinovial.

O acesso escolhido para a artrocentese foi medialmente à veia safena, logo abaixo do maléolo medial da tíbia, na face dorsomedial do tarso, segundo MOYER (1986), utilizando

agulhas hipodérmicas 40 x 8¹. O local de punção das articulações tíbio-társicas foi preparado assepticamente antes de cada colheita, com o uso de iodopovidona e álcool 70%. O líquido sinovial foi acondicionado em tubos contendo heparina sódica. O transporte foi realizado sob refrigeração em isopor com gelo, e as amostras foram processadas no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Departamento de Patologia Animal da FMVZ – USP.

4.4 PROCESSAMENTO DO LÍQUIDO SINOVIAL

As amostras de líquido sinovial foram centrifugadas por 15 minutos, a 1800 rpm e a 8°C. Os botões celulares obtidos após a centrifugação foram lavados com PBS (solução tamponada de fosfato) estéril, e ressuspensos em 2 mL de PBS. A viabilidade celular foi estimada usando-se o método de exclusão pelo azul de Trypan, utilizando-se 10µL do corante associado a 10µL da amostra preparada. Procedeu-se a contagem de células totais no líquido sinovial utilizando câmara de Neubauer, e o número de células viáveis foi ajustado para 1x10⁶ células/100µL de PBS.

4.5 OBTENÇÃO DA PROTEÍNA ANTAGONISTA DO RECEPTOR DA INTERLEUCINA –1 (IRAP)

Para a obtenção do IRAP foram utilizados seis *Kits* comerciais compostos por uma seringa de 60mL contendo esferas de vidro de 1-3mm (Figura 1), e medicamento tratadas com sulfato de cromo, com heparina de lítio como anticoagulante, e um extensor (Figura 2).

¹ Agulha descartável BD – PrecisionGlide.

Figura 1 – Foto mostrando as esferas de vidro tratadas com sulfato de cromo contidas em seringa de 60mL, para obtenção do IRAP – São Paulo –2007

Figura 2 - Foto exemplificando o *Kit* comercial para obtenção do IRAP, composto de seringa, extensor e tampa – São Paulo –2007

Foram retirados assepticamente 50 mL de sangue da veia jugular direita de seis diferentes eqüinos (Figura 3), alojados na Sociedade Hípica Paulista, Clube Hípico de Santo Amaro e Fazenda e Haras Bobeta - São Paulo – São Paulo. Ato contínuo, este sangue foi incubado a 37°C por 24 horas na própria seringa na posição horizontal (Figura 4). Após centrifugação (15 minutos), o plasma enriquecido por IRAP foi separado do sangue,

esterilizado por meio de filtração em microfiltro millipore 0.22 μ m, e armazenado a -20°C em amostras de 4 ou 2mL até sua utilização.

As amostras de 4mL foram utilizadas nos eqüinos com afecções ligamentares ou articulares, e as amostras de 2mL foram utilizadas no referido experimento.

Figura 3 – Foto do procedimento de retirada de sangue da veia jugular direita de um eqüino para obtenção do IRAP – São Paulo –2007

Figura 4 – Foto da seringa preenchida com sangue pronto para ser incubado a 37°C por 24 horas – São Paulo –2007

4.6 PREPARAÇÃO DO PLASMA

Para a obtenção do plasma foram retirados assepticamente em tubos com heparina de lítio 10 mL de sangue da veia jugular esquerda de oito diferentes eqüinos, também alojados na Sociedade Hípica Paulista, Clube Hípico de Santo Amaro e Fazenda e Haras Bobeta - São Paulo – São Paulo. Este sangue foi igualmente incubado a 37°C por 24 horas e processado conforme descrito anteriormente para a obtenção do IRAP

4.7 DROGAS E REAGENTES

Diacetato 2'7'difluoresceína (DCFH-DA/ *Molecular Probes, Eugene, OR*) – usado como reagente para citometria de fluxo. Este reagente foi mantido congelado (-20°), protegido da luz, e no momento do uso foi diluído em PBS (solução tamponada de fosfato).

PMA-Miristato-acetato de forbol (*Sigma, St Louis, MO*) – foi usado como estímulo para desencadear a produção de espécies reativas do oxigênio (peróxido de hidrogênio) ou o *burst* oxidativo.

LPS – cepa 055:B5 (Sigma, St Louis, MO) – foi utilizado como estímulo para desencadear a produção de espécies reativas do oxigênio (peróxido de hidrogênio) ou o *burst* oxidativo.

4.8 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA REALIZAÇÃO DO ENSAIO

Para a realização do ensaio foi adicionado ao tubo de polipropileno o volume de amostra necessário para se obter 1×10^5 leucócitos, 200 μ L de DCFH-DA (0,3mM), 100 μ L de PMA ou 100 μ L LPS e PBS q.s.p., em tubos com 500 μ L de plasma ou com IRAP.

As amostras foram colocadas em banho-maria para incubação a 37°C por 20 minutos e na sequência foram centrifugadas por 10 minutos, 1200 rpm, a 4 °C. Após desprezar o sobrenadante e ressuspender o botão celular, os eritrócitos foram removidos por lise hipotônica com uma solução de NaCl 0,2% (2 mL) durante 20 segundos. Imediatamente após a lise foi adicionada uma solução de NaCl 1,6% (2 mL) em cada tubo para restaurar a isotonicidade. As amostras foram, então, novamente centrifugadas (1200 rpm por 10 minutos) e os botões celulares obtidos foram ressuspensos adicionando-se aos tubos 300 μ L de PBS, e imediatamente analisados no citômetro de fluxo.

4.9 AVALIAÇÃO DO *BURST* OXIDATIVO

O *burst* oxidativo foi mensurado conforme método proposto por Hasui et al. (1989) utilizando-se a técnica de citometria de fluxo. O *burst* oxidativo, expresso na geração de espécies reativas do oxigênio (especialmente do peróxido de hidrogênio) pelos macrófagos e neutrófilos estimulados, foi monitorado quantitativamente por citometria de fluxo usando-se como reagente o diacetato 2'7' de diclorofluoresceína (DCFH-DA). O DCFH emite fluorescência verde quando combinado com as espécies reativas do oxigênio, permitindo avaliar a capacidade de macrófagos e neutrófilos de desencadear o *burst* oxidativo.

Para tanto foi utilizado um citômetro de fluxo² conectado a um computador³. Foram analisados 10.000 eventos utilizando-se o software *Cell Quest Pro*⁴. As sub-populações celulares foram identificadas por meio das propriedades FSC/SSC das mesmas e mecanicamente separadas⁵ (*sorting*) de tal forma a permitir sua avaliação por microscopia óptica (ROSSETTI, 2006).

Foram coletados os dados de células mononucleares (R1) e polimorfonucleares (R2) presentes no líquido sinovial, excluindo-se as populações de linfócitos por meio da análise com *gates*. Foi avaliada a quantidade de células emitindo fluorescência e a intensidade de fluorescência média obtida após a oxidação, pela produção de espécies reativas do oxigênio, especialmente do peróxido de hidrogênio intracelular, com e sem estímulo *in vitro*, pela adição de PMA, LPS, plasma e de IRAP. Para tal, foi utilizado o programa FloWJo®, versão 7.2.2⁶

Os resultados de fluorescência foram gravados em escala logarítmica e a fluorescência verde do DCFH foi mensurada a 530 ± 30 nm (detector FL-1). A quantificação do *burst* oxidativo foi estimada pela intensidade média de fluorescência/célula pelo DCFH acima do valor basal de 10^1 .

4.10 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Experimento 1 – Avaliar a porcentagem de células emitindo fluorescência e a intensidade de fluorescência média obtida após oxidação, pela produção de Eros intracelular, com a adição de PMA, LPS, e com IRAP obtido de um único equino sobre três diferentes *pools* celulares de líquido sinovial

Experimento 2 - Avaliar a porcentagem de células emitindo fluorescência e a intensidade de fluorescência média obtida após oxidação, pela produção de Eros intracelular, com a adição de PMA, LPS, e IRAP, obtidos de cinco diferentes equinos sobre um *pool* celular de líquido sinovial

² Benton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA

³ Macintosh Apple, CA, USA

⁴ Cell Quest Pro – Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA

⁵ FACSVANTAGE, Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA

⁶ Tree StarTM, Inc., Ashland, OR

Experimento 3 - Avaliar a porcentagem de células emitindo fluorescência e a intensidade de fluorescência média obtida após oxidação, pela produção de Eros intracelular, com a adição de PMA, LPS, e plasmas obtidos de cinco diferentes eqüinos, sobre um *pool* celular de líquido sinovial

Experimento 4 - Avaliar a porcentagem de células emitindo fluorescência e a intensidade de fluorescência média obtida após oxidação, pela produção de Eros intracelular, com a adição de PMA, LPS, plasmas e plasmas enriquecidos com IRAP, obtidos de três diferentes eqüinos, sobre um *pool* celular de líquido sinovial.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram avaliados segundo a normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov; em seguida utilizou-se modelo de análise de variância (One-way ANOVA) para verificar o efeito de grupos e momentos, seguido do teste de Tukey-Kramer.

Para todos os resultados, foram consideradas significantes as análises que apresentaram $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

A partir dos citogramas e histogramas gerados pelo o programa FloWJo®, foi avaliada a porcentagem de células (mononucleares, polimorfonucleares e totais) emitindo fluorescência e a intensidade de fluorescência média obtida após a oxidação, pela produção intracelular de EROs, sem estímulo (Figuras 5 e 6), pela adição de PMA (Figuras 7 e 8), LPS (Figuras 9 e 10), PMA e IRAP (Figuras 11 e 12), LPS e IRAP (Figuras 13 e 14), plasma (Figuras 15 e 16), PMA e plasma (Figuras 17 e 18) e LPS e plasma (Figuras 19 e 20) *in vitro*.

FSC – H: *forward scatter characteristic*; SSC-H: *side scatter characteristic* (em valores arbitrários).

Figura 5 – Citograma de células do líquido sinovial de eqüinos, em ensaio prévio sem estímulo *in vitro*, com a separação em *gates* das populações de interesse: R1- células mononucleares, R2- células polimorfonucleares – São Paulo – 2007

FL1-H: log da intensidade de fluorescência do DCFH (em valores arbitrários). São consideradas células produzindo EROS aquelas com valores superiores a 10.

Figura 6 – Histograma da porcentagem de células do líquido sinovial de eqüinos produzindo EROS, em ensaio prévio sem estímulo *in vitro* – São Paulo – 2007

FSC – H: *forward scatter characteristic*; SSC-H: *side scatter characteristic* (em valores arbitrários).

Figura 7 – Citograma de células do líquido sinovial de eqüinos, em ensaio após adição de PMA *in vitro*, com a separação em *gates* das populações de interesse: R1- células mononucleares, R2- células polimorfonucleares – São Paulo – 2007

FL1-H: log da intensidade de fluorescência do DCFH (em valores arbitrários). São consideradas células produzindo EROs aquelas com valores superiores a 10.

Figura 8 - Histograma da porcentagem de células do líquido sinovial de eqüinos produzindo EROs, após adição de PMA *in vitro* – São Paulo – 2007

FSC – H: *forward scatter characteristic*; SSC-H: *side scatter characteristic* (em valores arbitrários).

Figura 9 – Citograma de células do líquido sinovial de eqüinos, em ensaio após adição de LPS *in vitro* , com a separação em *gates* das populações de interesse: R1- células mononucleares, R2- células polimorfonucleares – São Paulo – 2007

FL1-H: log da intensidade de fluorescência do DCFH (em valores arbitrários). São consideradas células produzindo EROs aquelas com valores superiores a 10.

Figura 10 - Histograma da porcentagem de células do líquido sinovial de eqüinos produzindo EROs, após adição de LPS *in vitro* – São Paulo – 2007

FSC – H: *forward scatter characteristic*; SSC-H: *side scatter characteristic* (em valores arbitrários).

Figura 11 – Citograma de células do líquido sinovial de eqüinos, em ensaio após adição de PMA e IRAP *in vitro*, com a separação em *gates* das populações de interesse:
R1- células mononucleares, R2- células polimorfonucleares – São Paulo – 2007

FL1-H: log da intensidade de fluorescência do DCFH (em valores arbitrários). São consideradas células produzindo EROs aquelas com valores superiores a 10.

Figura 12 - Histograma da porcentagem de células do líquido sinovial de eqüinos produzindo EROs, após adição de PMA e IRAP *in vitro* – São Paulo – 2007

FSC – H: *forward scatter characteristic*; SSC-H: *side scatter characteristic* (em valores arbitrários).

Figura 13 – Citograma de células do líquido sinovial de eqüinos, em ensaio após adição de LPS e IRAP *in vitro*, com a separação em *gates* das populações de interesse: R1- células mononucleares, R2- células polimorfonucleares – São Paulo – 2007

FL1-H: log da intensidade de fluorescência do DCFH (em valores arbitrários). São consideradas células produzindo EROs aquelas com valores superiores a 10.

Figura 14 - Histograma da porcentagem de células do líquido sinovial de eqüinos produzindo EROs, após adição de LPS e IRAP *in vitro* – São Paulo – 2007

FSC – H: *forward scatter characteristic*; SSC-H: *side scatter characteristic* (em valores arbitrários).

Figura 15 – Citograma de células do líquido sinovial de eqüinos, em ensaio após adição de plasma *in vitro* , com a separação em *gates* das populações de interesse: R1- células mononucleares, R2- células polimorfonucleares – São Paulo – 2007

FL1-H: log da intensidade de fluorescência do DCFH (em valores arbitrários). São consideradas células produzindo EROs aquelas com valores superiores a 10.

Figura 16 - Histograma da porcentagem de células do líquido sinovial de eqüinos produzindo EROs, após adição de plasma *in vitro* – São Paulo – 2007

FSC – H: *forward scatter characteristic*; SSC-H: *side scatter characteristic* (em valores arbitrários).

Figura 17 – Citograma de células do líquido sinovial de eqüinos, em ensaio após adição de PMA e plasma *in vitro*, com a separação em *gates* das populações de interesse:
R1- células mononucleares, R2- células polimorfonucleares – São Paulo – 2007

FL1-H: log da intensidade de fluorescência do DCFH (em valores arbitrários). São consideradas células produzindo EROs aquelas com valores superiores a 10.

Figura 18 - Histograma da porcentagem de células do líquido sinovial de eqüinos produzindo EROs, após adição de PMA e plasma *in vitro* – São Paulo – 2007

FSC – H: *forward scatter characteristic*; SSC-H: *side scatter characteristic* (em valores arbitrários).

Figura 19 - Citograma de células do líquido sinovial de eqüinos, em ensaio após adição de LPS e plasma *in vitro* , com a separação em *gates* das populações de interesse: R1- células mononucleares, R2- células polimorfonucleares – São Paulo – 2007

FL1-H: log da intensidade de fluorescência do DCFH (em valores arbitrários). São consideradas células produzindo EROs aquelas com valores superiores a 10.

Figura 20 - Histograma da porcentagem de células do líquido sinovial de eqüinos produzindo EROs, após adição de LPS e plasma *in vitro* – São Paulo – 2007

5.1 Experimento 1 - Avaliar a porcentagem de células emitindo fluorescência e a intensidade de fluorescência média obtida após oxidação, pela produção intracelular de EROs, com a adição de PMA, LPS, e IRAP obtido de um único equino sobre três diferentes *pools* celulares de líquido sinovial.

Neste experimento foi colhido líquido sinovial de 54 articulações tíbio-társicas para a formação de três diferentes *pools* celulares. Já o IRAP foi obtido através do processamento do sangue coletado de um único equino.

Na Tabela 1 estão agrupados os dados referentes à porcentagem média de células mononucleares (R1), polimorfonucleares (R2) e células totais produzindo EROs frente aos estímulos *in vitro*.

Foi possível verificar que tanto a porcentagem média de células mononucleares, polimorfonucleares e células totais produzindo EROs no ensaio sem estímulo, ou com a adição *in vitro* de PMA, LPS, IRAP e PMA e IRAP e LPS não diferiu estatisticamente. Contudo, observa-se que a média do percentual de células envolvidas na produção de EROs na população de células polimorfonucleares e células totais tendeu a ser menor nos ensaios que utilizaram o IRAP.

A Tabela 2 mostra os dados referentes à intensidade média de fluorescência do DCFH em valores arbitrários, verificada por citometria de fluxo, nas células mononucleares, polimorfonucleares e na população de células totais de três *pools* distintos de células de líquido sinovial, frente a vários estímulos.

Nas células mononucleares (R1) observou-se que a fluorescência média foi significativamente maior com a adição de PMA e também com a adição de LPS ($P < 0,05$) em relação ao ensaio sem estímulo.

Foi possível constatar, ainda, que uma diminuição da intensidade de fluorescência média do DCFH ocorreu nos ensaios IRAP e PMA e IRAP e LPS, redução esta estatisticamente significativa em relação aos estímulos de PMA e LPS.

Na população de células polimorfonucleares (R2) não se constatou diferença significativa na fluorescência média ($P > 0,05$), apesar de se observar uma redução média da fluorescência nos ensaios com a adição de IRAP.

O mesmo resultado obtido para as células polimorfonucleares foi obtido nos ensaios com a população total de células do líquido sinovial.

Tabela 1 – Porcentagem (média e desvio padrão) de células totais, células mononucleares (R1) e polimorfonucleares (R2) produzindo EROS, frente à diferentes estímulos *in vitro*, realizada em três *pools* de células do líquido sinovial de equinos – São Paulo – 2007

Estímulos		Sem estímulo (DCFH)	Adição de PMA	Adição de LPS	adição de IRAP e PMA	Adição de IRAP e LPS
Populações celulares						
R1	<i>Pool 1</i>	96,80	98,53	98,01	95,89	93,1
	<i>Pool 2</i>	98,21	98,47	98,47	88,64	89,9
	<i>Pool 3</i>	99,61	100	99,19	99,33	100
	Média	98,22a	99,0a	98,56a	94,62a	94,33a
	DP	1,40	0,87	0,59	5,46	5,16
R2	<i>Pool 1</i>	94,41	87,23	83,74	52,24	65,73
	<i>Pool 2</i>	70,29	65,53	53,02	20,5	15,61
	<i>Pool 3</i>	97,98	98,56	98,52	96,44	97,93
	Média	87,56a	83,77a	78,47a	56,39a	59,76a
	DP	15,06	16,78	23,21	38,14	41,48
Células totais	<i>Pool 1</i>	77,79	76,91	78,29	49,41	37,00
	<i>Pool 2</i>	39,19	49,42	74,06	32,84	21,75
	<i>Pool 3</i>	83,80	90,94	93,30	80,18	96,62
	Média	66,93a	72,42a	81,88a	54,14a	51,79a
	DP	24,21	21,12	10,11	24,02	39,56

DCFH: diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína; PMA: 12-miristato 13-acetato de forbol; LPS: lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*; IRAP: proteína antagonista de receptor de interleucina-1

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $P < 0,05$.

Tabela 2 – Intensidade de fluorescência média (média e desvio padrão de valores arbitrários) de células totais, células mononucleares (R1) e polimorfonucleares (R2) pela produção intracelular de EROs, frente diferentes estímulos *in vitro*, realizada em três *pools* de células do líquido sinovial de eqüinos – São Paulo – 2007

Estímulos		Sem estímulo (DCFH)	Adição de PMA	Adição de LPS	adição de IRAP e PMA	Adição de IRAP e LPS
Populações celulares						
R1	<i>Pool 1</i>	152,24	784,05	169,4	320,06	41,32
	<i>Pool 2</i>	200,91	266,72	237,78	46,45	27,54
	<i>Pool 3</i>	514,15	4524,55	530,6	108,71	252,88
	Média	289,1a	1858,44b	312,59b	158,41a	107,25a
	DP	196,41	2323,36	191,87	143,41	126,31
R2	<i>Pool 1</i>	82,22	189,95	75,27	44,17	24,68
	<i>Pool 2</i>	78,11	46,11	119,95	39,98	19,03
	<i>Pool 3</i>	321,03	1250,87	473,79	102,49	91,63
	Média	160,45a	495,64a	223,00a	62,21a	45,11a
	DP	139,08	657,99	218,33	34,94	40,38
Células Totais	<i>Pool 1</i>	64,80	141,77	63,39	100,50	24,18
	<i>Pool 2</i>	29,07	120,78	92,70	39,70	24,48
	<i>Pool 3</i>	252,3	351,25	308,62	69,78	138,38
	Média	115,39a	204,6a	154,90a	69,99a	62,35a
	DP	119,90	127,43	133,93	30,40	65,85

DCFH: diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína; PMA: 12-miristato 13-acetato de forbol; LPS: lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*; IRAP: proteína antagonista de receptor de interleucina-1
 Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $P < 0,05$.

5.2 Experimento 2 - Avaliar a porcentagem de células emitindo fluorescência e a intensidade de fluorescência média obtida após oxidação, pela produção intracelular de EROs, com a adição de PMA, LPS, e com IRAP, obtidos de cinco diferentes eqüinos sobre um *pool* celular de líquido sinovial.

A Tabela 3 mostra os dados referentes à porcentagem média de células mononucleares, polimorfonucleares e células totais de um pool celular de líquido sinovial produzindo EROs frente à vários estímulos mediante à adição de IRAP obtido através da coleta de sangue de cinco eqüinos distintos.

Nas células mononucleares (R1) nenhum estímulo resultou em diferença no percentil de células envolvidas na produção de EROS.

Na população de células polimorfonucleares (R2) todos os estímulos, a saber, a adição de PMA, LPS, de IRAP e PMA e de IRAP e LPS provocaram aumento estatisticamente significativo na porcentagem de células gerando espécies reativas do oxigênio ($P < 0,05$); contudo, este aumento foi estatisticamente semelhante entre os ensaios realizados com diferentes estímulos.

Em relação a população de células totais pode-se constatar que o percentual de células produzindo EROs foi estatisticamente semelhante ao observado com a ausência e estímulo na maioria dos ensaios, com exceção da adição de IRAP e LPS, que diferiu estatisticamente- para menos- neste percentual.

O ensaio com a adição de IRAP e PMA também mostrou redução no percentual médio de células totais produzindo EROs, estatisticamente semelhante à exibida pelo ensaio IRAP e LPS. Contudo, a redução observada no ensaio IRAP e PMA não diferiu estatisticamente do ensaio sem estímulo.

A observação dos resultados agrupados na Tabela 4 revela que a intensidade de fluorescência média da população de células mononucleares (R1) aumentou de forma estatisticamente significativa e semelhante com a adição dos estímulos PMA e LPS em relação ao ensaio sem estímulo e diminuiu, também de forma estatisticamente significativa, após a adição de IRAP. No caso específico do ensaio IRAP e LPS a redução produziu valor comparável ao da intensidade de fluorescência obtida no ensaio sem estímulo.

Na população de células polimorfonucleares (R2) os estímulos de adição e PMA e LPS causaram aumento estatisticamente significativo na intensidade de produção de EROs em relação ao ensaio sem estímulo. A adição de IRAP e PMA reduziu de maneira estatisticamente significativa a produção média de EROs em relação ao ensaio com estímulo

de PMA. Da mesma forma, o ensaio IRAP e LPS apresentou redução em relação ao ensaio com estímulo LPS e esta redução se traduziu níveis de fluorescência estatisticamente semelhantes aos do ensaio sem estímulo ($P>0,05$).

Na população de células totais houve diferença estatisticamente significativa na intensidade de fluorescência em todos os ensaios em relação ao ensaio sem estímulo, e também aos ensaios entre si. As médias foram maiores com os estímulos PMA e LPS e menores nos ensaios com a adição de IRAP.

Tabela 3 – Porcentagem (média e desvio padrão) de células totais, células mononucleares (R1) e polimorfonucleares (R2) produzindo EROs, frente à adição de PMA, LPS e com cinco amostras distintas de IRAP, *in vitro*, realizada em um *pool* de células do líquido sinovial de equinos – São Paulo – 2007

Estímulos		Sem estímulo (DCFH)	Adição de PMA	Adição de LPS	Adição de IRAP e PMA	Adição de IRAP e LPS
População de células	Amostras de IRAP					
R1	1	100	100	100	100	100
	2	100	100	100	100	100
	3	100	100	100	100	100
	4	100	100	100	100	100
	5	100	100	100	100	100
	Média	100a	100a	100a	100a	100a
	DP	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
R2	1	90,45	96,54	96,70	99,36	98,82
	2	90,45	96,54	96,70	97,41	93,51
	3	90,45	96,54	96,70	97,50	94,97
	4	90,45	96,54	96,70	97,77	99,42
	5	90,45	96,54	96,70	99,40	99,03
	Média	90,45a	96,54b	96,70b	98,29b	97,15b
	DP	0,0	0,0	0,0	1,00	2,71
Células totais	1	88,92	97,42	97,34	83,68	53,96
	2	88,92	97,42	97,34	81,66	37,20
	3	88,92	97,42	97,34	73,28	47,24
	4	88,92	97,42	97,34	73,50	98,12
	5	88,92	97,42	97,34	92,78	65,74
	Média	88,92a	97,42a	97,34a	80,98ab	60,45b
	DP	0,0	0,0	0,0	8,10	23,47

DCFH: diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína; PMA: 12-miristato 13-acetato de forbol; LPS: lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*; IRAP: proteína antagonista de receptor de interleucina-1
 Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $P < 0,05$.

Tabela 4 – Intensidade de fluorescência média (média e desvio padrão de valores arbitrários) de células totais, células mononucleares (R1) e polimorfonucleares (R2) pela produção intracelular de EROs, frente à adição de PMA, LPS e com cinco amostras distintas de IRAP, *in vitro*, realizada em um *pool* de células do líquido sinovial de eqüinos – São Paulo – 2007

Estímulos		Sem estímulo (DCFH)	Adição de PMA	Adição de LPS	adição de IRAP e PMA	Adição de IRAP e LPS
População de células	Amostras de IRAP					
R1	1	124,52	585,19	578,55	289,44	102,21
	2	124,52	585,19	578,55	203,32	67,71
	3	124,52	585,19	578,55	176,16	89,99
	4	124,52	585,19	578,55	188,59	
	5	124,52	585,19	578,55	354,05	231,11
	Média	124,52a	585,19b	578,55b	242,31c	122,75^a
	DP	0,0	0,0	0,0	76,63	73,63
R2	1	68,36	252,68	141,14	120,71	59,14
	2	68,36	252,68	141,14	114,28	34,88
	3	68,36	252,68	141,14	81,82	51,54
	4	68,36	252,68	141,14	78,54	
	5	68,36	252,68	141,14	194,91	99,27
	Média	68,36a	252,68b	141,14c	118,05cd	61,20ae
	DP	0,0	0,0	0,0	46,91	27,32
Células totais	1	93,49	325,11	131,43	49,46	34,48
	2	93,49	325,11	131,43	57,67	25,75
	3	93,49	325,11	131,43	40,60	30,40
	4	93,49	325,11	131,43	39,49	
	5	93,49	325,11	131,43	63,11	37,58
	Média	93,49a	325,11b	131,43c	50,06d	32,05e
	DP	0	0	0	10,37	5,13

DCFH: diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína; PMA: 12-miristato 13-acetato de forbol; LPS: lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*; IRAP: proteína antagonista de receptor de interleucina-1
 Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $P < 0,05$.

5.3 Experimento 3 - Avaliar a porcentagem de células emitindo fluorescência e a intensidade de fluorescência média obtida após oxidação, pela produção intracelular de EROs, com a adição de PMA, LPS, e de plasmas obtidos de cinco diferentes equinos, sobre um *pool* celular de líquido sinovial.

Neste experimento, o efeito antiinflamatório do plasma foi testado; para isto, cinco diferentes amostras de plasma foram empregadas em momentos distintos em um *pool* de líquido sinovial, frente a vários estímulos.

Observou-se, então, na Tabela 5 que o percentual de células mononucleares (R1) produzindo EROs foi estatisticamente semelhante àquele observado nos ensaios de adição de plasma, de PMA, de LPS e de plasma e PMA, quando comparado ao obtido no ensaio sem estímulo. Já no ensaio onde o estímulo foi o plasma e o LPS a redução no percentil de células gerando EROs foi estatisticamente significativa em relação a maioria dos ensaios, sendo a única exceção o ensaio com adição de plasma, onde a redução também ocorreu, mas foi estatisticamente semelhante.

Na população de células polimorfonucleares (R2) os mesmos resultados obtidos na população de células mononucleares (R1) foram observados em relação ao percentual de células produzindo EROs em todos os ensaios.

Em relação ao percentual de células totais ativamente engajadas na produção de EROs a maioria dos estímulos resultou em números estatisticamente semelhantes aos observados no grupo sem estímulo, com exceção do ensaio com o estímulo plasma e LPS, que produziu porcentagem média estaticamente menor de células gerando EROS.

No ensaio com estímulo plasma e LPS o percentual foi estatisticamente semelhante ao verificado nos ensaios com plasma, plasma e PMA e ausência de estímulo.

A análise da Tabela 6 mostra a intensidade de fluorescência média na população de células mononucleares (R1), que, em relação à das células de líquido sinovial sem estímulo, diminui de maneira significativamente estatística com a adição de plasma. Apenas a adição de PMA causou aumento estaticamente significativo na emissão de fluorescência em relação a todos os ensaios.

Os estímulos PMA e LPS quando comparados, respectivamente, com os ensaios plasma e PMA e plasma e LPS levaram a produção de intensidade fluorescência significativamente maior, sugerindo que o plasma exerce efeito antiinflamatório sobre as células de líquido sinovial ativadas. Ainda, a adição dos estímulos plasma e LPS resultou em

intensidade de fluorescência de ordem estatisticamente semelhante à observada com o ensaio de plasma.

Na população de células polimorfonucleares (R2) a maioria dos estímulos causou diferença estatisticamente significativa na fluorescência média em relação ao ensaio sem estímulo.

Em relação aos estímulos PMA comparado com o estímulo plasma e PMA e LPS comparado com o estímulo plasma e LPS houve diminuição estatisticamente significativa nos ensaios que incluíam o fator plasma. Como foi observado na população de células mononucleares, a adição do estímulo plasma e LPS resultou em intensidade de fluorescência estatisticamente semelhante em relação à observada com o ensaio de plasma somente.

Na população de células totais os resultados estatísticos da emissão média de fluorescência são semelhantes aos da população de células polimorfonucleares frente aos estímulos utilizados.

Tabela 5 – Porcentagem (média e desvio padrão) de células totais, células mononucleares (R1) e polimorfonucleares (R2) produzindo EROs, frente à adição de PMA, LPS e cinco diferentes amostras de plasma *in vitro*, realizada em um *pool* de células do líquido sinovial de eqüinos – São Paulo – 2007

Estímulos		Sem estímulo (DCFH)	Adição de plasma	Adição de PMA	Adição de LPS	adição de plasma e PMA	Adição de plasma e LPS
População de células de plasma							
R1	1	99,61	97,67	100,00	99,19	98,57	91,96
	2	99,61	98,95	100,00	99,19	100,0	100,0
	3	99,61	98,94	100,00	99,19	99,63	96,81
	4	99,61	96,77	100,00	99,19	99,63	96,81
	5	99,61	96,84	100,00	99,19	99,63	96,81
	Média	99,61a	97,83ab	100a	99,19a	99,49a	96,47b
	DP	0,0	1,07	0,0	0,0	0,54	2,88
R2	1	97,98	97,69	98,56	98,52	98,08	88,72
	2	97,98	93,49	98,56	98,52	97,44	96,62
	3	97,98	91,05	98,56	98,52	96,16	94,34
	4	97,98	96,83	98,56	98,52	98,03	95,53
	5	97,98	92,14	98,56	98,52	87,79	85,41
	Média	97,98a	94,24ab	98,56a	98,52a	95,5ab	92,12b
	DP	0,0	2,90	0,0	0,0	4,38	4,83
Células totais							
	1	83,80	85,64	90,94	93,30	78,80	64,82
	2	83,80	85,06	90,94	93,30	91,32	81,46
	3	83,80	88,00	90,94	93,30	87,60	85,06
	4	83,80	91,06	90,94	93,30	92,38	86,26
	5	83,80	83,62	90,94	93,30	74,62	67,70
	Média	83,8ab	86,68ab	90,94a	93,3a	84,94ab	77,06b
	DP	0,0	2,91	0,0	0,0	7,86	10,07

DCFH: diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína; PMA: 12-miristato 13-acetato de forbol; LPS: lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*; IRAP: proteína antagonista de receptor de interleucina-1
 Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $P < 0,05$.

Tabela 6 – Intensidade de fluorescência média (média e desvio padrão de valores arbitrários) de células totais, células mononucleares (R1) e polimorfonucleares (R2) pela produção intracelular de EROs, frente à adição de PMA, LPS e cinco diferentes amostras de plasmas *in vitro*, realizada em um *pool* de células do líquido sinovial de eqüinos – São Paulo – 2007

Estímulos		Sem estímulo (DCFH)	Adição de plasma	Adição de PMA	Adição de LPS	adição de plasma e PMA	Adição de plasma e LPS
População de células							
R1	Amostras de plasma						
	1	514,15	113,66	4524,55	530,6	191,53	62,79
	2	514,15	84,91	4524,55	530,6	494,64	55,67
	3	514,15	103,67	4524,55	530,6	204,18	91,95
	4	514,15	169,67	4524,55	530,6	213,79	81,65
	5	514,15	88,78	4524,55	530,6	237,38	69,83
	Média	514,15a	112,38b	4524,55c	530,6a	268,30d	72,38b
	DP	0,0	34,17	0,0	0,0	127,63	14,55
R2	1	321,03	79,53	1250,87	473,79	97,19	38,6
	2	321,03	47,58	1250,87	473,79	215,21	50,16
	3	321,03	84,6	1250,87	473,79	76,26	70,33
	4	321,03	89,71	1250,87	473,79	150,42	86,17
	5	321,03	86,48	1250,87	473,79	195,41	85,24
	Média	321,03a	77,58b	1250,87c	473,79d	146,90e	66,1b
	DP	0,0	17,17	0,0	0,0	60,19	21,20
Células totais							
	1	252,30	47,69	351,25	308,62	61,78	34,56
	2	252,30	37,61	351,25	308,62	111,27	34,68
	3	252,30	53,87	351,25	308,62	74,19	43,42
	4	252,30	65,80	351,25	308,62	81,99	47,14
	5	252,30	49,50	351,25	308,62	109,64	44,63
	Média	252,3a	50,89b	351,25c	308,62d	87,77e	40,89b
	DP	0,0	10,24	0,0	0,0	21,93	5,87

DCFH: diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína; PMA: 12-miristato 13-acetato de forbol; LPS: lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*; IRAP: proteína antagonista de receptor de interleucina-1

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $P < 0,05$.

5.4 Experimento 4 - Avaliar a porcentagem de células emitindo fluorescência e a intensidade de fluorescência média obtida após oxidação, pela produção intracelular de EROs, com a adição de PMA, LPS, plasmas e com IRAP, obtidos de três diferentes eqüinos, sobre um *pool* celular de líquido sinovial.

Para este experimento o plasma e o IRAP foram obtidos a partir da colheita de sangue de três eqüinos, tendo sido o potencial antiinflamatório de ambos testado sobre um mesmo *pool* de células de líquido sinovial e comparado entre si.

Na Tabela 7 demonstra-se que não houve diferença estatística na porcentagem média de células mononucleares (R1) produzindo EROs entre os ensaios.

Na população de células polimorfonucleares (R2) a adição de plasma, por si só, levou a um aumento do percentual de células produzindo EROs, aumento este estatisticamente semelhante ao desencadeado pela adição de PMA, LPS, plasma e PMA, plasma e LPS e IRAP e PMA. Já a adição de IRAP e LPS às amostras foi o estímulo que induziu o menor aumento no percentual de células produzindo EROs, mas foi estatisticamente semelhante aos estímulos de adição de plasma, de PMA, de LPS, de plasma e LPS e de IRAP e PMA.

O maior incremento no percentual de células polimorfonucleares produzindo EROs foi observado com a adição do estímulo plasma e PMA, apesar dele ter se mostrado estatisticamente comparável aos estímulos de adição de plasma, de PMA, de plasma e LPS e IRAP e PMA. Portanto, verificou-se que qualquer um dos estímulos aumentou o percentual de células gerando EROs em relação à ausência de estímulo.

Na população de células totais a maioria dos estímulos não teve influência estatisticamente significativa no percentual de células produzindo EROs em relação ao percentual de células produzindo EROs na ausência de estímulos; a única exceção foi a diminuição neste percentual, observada com a adição do estímulo plasma e LPS.

A adição de plasma não teve efeito significativo quando comparada aos efeitos da adição de outros estímulos no percentil de células gerando EROs.

A comparação entre os efeitos do plasma e do plasma com PMA e plasma com LPS não revelou diferença estatisticamente significativa no percentual de células produzindo EROs no líquido sinovial. O mesmo ocorreu na comparação entre os estímulos PMA, IRAP e PMA, e plasma e PMA.

Em relação ao LPS como estímulo, houve diferença estatisticamente significante quando comparado ao estímulo plasma e LPS e IRAP e LPS, com diminuição do percentual de células produtoras de EROs nos dois últimos estímulos.

Assim, tanto o plasma como o IRAP reduziram o percentual de células totais produtoras de EROs ativadas pelo PMA ou LPS, apesar de não estatisticamente significante.

Na Tabela 8 estão agrupados dados referentes à intensidade média de fluorescência do DCFH, em valores arbitrários, verificada pela citometria de fluxo nas células do líquido sinovial.

Em relação à população de células mononucleares (R1) a intensidade média de fluorescência não foi estatisticamente distinta frente aos estímulos de adição de plasma, plasma e LPS e IRAP e LPS.

A adição de PMA provocou aumento significativo na intensidade de fluorescência das células quando comparadas às células não estimuladas ou com as estimuladas com plasma e PMA e IRAP e PMA. Da mesma forma ocorreu com o estímulo LPS e os ensaios plasma e LPS e IRAP e LPS.

O efeito dos estímulos plasma e LPS e IRAP e LPS foi estatisticamente semelhante, assim como foram os efeitos dos estímulos plasma e PMA e IRAP e PMA. Ainda mais, os estímulos plasma e LPS e IRAP e LPS foram estatisticamente semelhantes quando comparados à ausência de estímulo na intensidade de fluorescência gerada pelas células mononucleares. Em relação ao estímulo PMA, a redução na intensidade de fluorescência só foi comparável à ausência de estímulo com o IRAP, mas não com o plasma, sugerindo que frente ao PMA o IRAP tenha um maior efeito antiinflamatório que o plasma.

Pode-se observar que na população de células polimorfonucleares (R2) a intensidade de fluorescência média obtida com os estímulos IRAP e LPS e IRAP e PMA, plasma e LPS e plasma foi estatisticamente semelhante à intensidade de fluorescência emitida pelas células polimorfonucleares sem estímulo. Apenas o estímulo plasma e PMA diferiu significativamente do ensaio sem estímulo.

Em relação à população de células totais do líquido sinovial os estímulos PMA e LPS causaram aumento estatisticamente significativo na fluorescência média.

Quando comparadas à fluorescência média emitida pelo estímulo PMA, a adição de plasma e PMA e IRAP e PMA provocaram diminuição estatisticamente significativa, tendo o mesmo sido observado em relação ao LPS frente ao plasma e LPS e IRAP e LPS, indicando o efeito antiinflamatório do IRAP e do plasma sobre as células ativadas com PMA e LPS.

Os estímulos plasma e PMA e plasma e LPS foram estatisticamente semelhantes ao estímulo plasma na intensidade média de fluorescência gerada, e estatisticamente distintos em relação à fluorescência exibida com os estímulos PMA e LPS.

A fluorescência média foi, ainda, estatisticamente semelhante quando comparamos os estímulos plasma e PMA e IRAP e PMA e também entre os estímulos plasma e LPS e IRAP e LPS. Ou seja, plasma e IRAP apresentaram efeito antiinflamatório estatisticamente semelhante sobre células estimuladas com PMA e LPS.

Tabela 7 – Porcentagem (média e desvio padrão) de células totais, células mononucleares (R1) e polimorfonucleares (R2) produzindo EROs, frente à adição de PMA, LPS, três plasmas e três IRAP *in vitro*, realizada em um *pool* de células do líquido sinovial de eqüinos – São Paulo – 2007

Estímulos		Sem estímulo (DCFH)	Adição de plasma	Adição de PMA	Adição de LPS	adição de plasma e PMA	Adição de plasma e LPS	Adição de IRAP e PMA	Adição de IRAP e LPS
População de células	Amostras de plasma								
R1	1	100	100	100	100	100	100	100	100
	2	100	100	100	100	100	100	100	100
	3	100	100	100	100	100	100	100	100
	Média	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100^a	100a
	DP	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
R2	1	90,45	98,29	96,54	96,70	99,49	97,31	97,41	93,51
	2	90,45	99,71	96,54	96,70	99,63	98,37	97,50	94,97
	3	90,45	98,77	96,54	96,70	99,92	98,26	97,77	99,42
	Média	90,45a	98,92bc	96,54bc	96,7bc	99,68b	97,98bc	97,56bc	95,97c
	DP	0,0	0,72	0,0	0,0	0,22	0,58	0,19	3,079
Células totais	1	88,92	58,66	97,42	97,34	79,06	43,64	81,66	37,20
	2	88,92	79,26	97,42	97,34	77,06	47,32	73,28	47,24
	3	88,92	57,84	97,42	97,34	84,02	46,78	73,50	98,12
	Média	88,92ac	65,25abc	97,42a	97,34a	80,05abc	45,91b	76,15abc	60,85bc
	DP	0,0	12,14	0,0	0,0	3,58	1,99	4,77	32,66

DCFH: diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína; PMA: 12-miristato 13-acetato de forbol; LPS: lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*; IRAP: proteína antagonista de receptor de interleucina-1. Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $P < 0,05$.

Tabela 8 – Intensidade de fluorescência média (média e desvio padrão de valores arbitrários) de células totais, células mononucleares (R1) e polimorfonucleares (R2) pela produção intracelular de EROs, frente à adição de PMA, LPS, três plasmas e três IRAP *in vitro*, realizada em um *pool* de células do líquido sinovial de equinos – São Paulo – 2007

Estímulos		Sem estímulo (DCFH)	Adição de plasma	Adição de PMA	Adição de LPS	adição de plasma e PMA	Adição de plasma e LPS	Adição de IRAP e PMA	Adição de IRAP e LPS
População de células	Amostras de plasma								
R1	1	124,52	79,18	585,19	578,55	143,41	63,29	203,32	29,22
	2	124,52	105,82	585,19	578,55	232,61	81,45	176,16	89,99
	3	124,52	105,75	585,19	578,55	250,05	107,95	188,59	
	Média	124,52ae	96,92a	585,19bc	578,55c	208,69d	84,23a	189,36ed	59,60a
	DP	0,0	15,36	0,0	0,0	57,20	22,46	13,60	42,97
R2	1	68,36	47,46	252,68	141,14	98,65	42,85	114,28	34,88
	2	68,36	98,07	252,68	141,14	112,2	60,56	81,82	51,54
	3	68,36	60,47	252,68	141,14	135,16	48,58	78,54	
	Média	68,36af	68,87aef	252,68b	141,14c	115,34cd	50,66aef	91,55ade	43,21f
	DP	0,0	26,62	0,0	0,0	18,46	9,03	19,55	11,78
Células totais	1	93,49	27,57	325,11	131,43	44,70	28,72	57,67	25,75
	2	93,49	32,81	325,11	131,43	44,50	33,36	40,60	30,40
	3	93,49	29,66	325,11	131,43	52,91	30,07	39,49	118,69
	Média	93,49ad	30,01b	325,11c	131,43d	47,37ab	30,72b	45,92ab	58,28ab
	DP	0,0	2,64	0,0	0,0	4,80	2,39	10,19	52,37

DCFH: diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína; PMA: 12-miristato 13-acetato de forbol; LPS: lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*; IRAP: proteína antagonista de receptor de interleucina-1

Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente em nível de $P < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

As doenças do sistema músculo-esquelético estão entre as afecções mais comuns nas espécies humana e equina. Numerosos tratamentos médicos foram extensivamente empregados no tratamento das enfermidades articulares. Atualmente, estes tratamentos têm como principal objetivo a diminuição e o controle do grau de inflamação nas articulações acometidas. Drogas antiinflamatórias esteroidais e não esteroidais constituem o módulo básico de atuação.

Apesar dos antiinflamatórios não esteroidais promoverem alívio sintomático, conferem pouca proteção aos tecidos articulares, e, ainda, não tem potencial, como modalidade terapêutica, para modificar o curso da enfermidade subjacente. Além disso, estas drogas estão associadas a uma alta incidência de efeitos colaterais indesejáveis, tornando seu emprego pouco atrativo a longo prazo.

Os antiinflamatórios esteroidais, por sua vez, são comumente utilizados no tratamento das doenças articulares e são potentes mediadores na redução da dor e da inflamação. Contudo, seu uso também está associado à ocorrência de efeitos indesejáveis sobre a cartilagem articular, incluindo prejuízo na atividade dos condrócitos, decréscimo no conteúdo de proteoglicanas e glicosaminoglicanas, diminuição das taxas de reparação e redução da elasticidade da cartilagem articular. Além destas repercussões locais, outras, sistêmicas, e de grande magnitude, também são freqüentemente descritas, entre elas a associação da administração de corticóides com a indução da laminite (BAILEY; ELLIOT, 2007).

As intervenções terapêuticas nas doenças articulares são sem sucesso, em parte, pela incapacidade dos agentes terapêuticos atingirem diretamente as estruturas articulares comprometidas. As vias oral, intravenosa e intramuscular têm sido tradicionalmente empregadas para disponibilizar estes agentes para o compartimento intra-articular. No entanto, estas vias podem ser relativamente ineficientes, pois pequenas partículas penetram na articulação por difusão passiva enquanto moléculas maiores, como as proteínas, geralmente são excluídas do espaço articular (FRISBIE et al., 2000)

Apesar da via intra-articular ser capaz, pelo menos em teoria, de sobrepor estas limitações, a meia vida da maioria dos agentes diretamente administrados no compartimento intra-articular é curta, e injeções freqüentes são necessárias para que se observe atividade biológica nos tratamentos prolongados das enfermidades crônicas (FRISBIE et al., 2000).

Na tentativa de contornar todas estas limitações, a transferência genética e o estudo da aplicabilidade terapêutica de drogas capazes de atuar na gênese dos processos inflamatórios têm merecido especial atenção.

Dentro desta última linha de raciocínio, a ocorrência natural de uma proteína antagonista do receptor de interleucina-1 sugere que o organismo construa seus próprios mecanismos de defesa em relação à inflamação e que esta proteína seja parte de um arsenal terapêutico endógeno para resolução do processo inflamatório e/ou infeccioso (DINARELLO; THOMPSON, 1991). Esta proteína antagonista foi identificada em uma gama de cenários, tais como na urina de pacientes febris, no sangue de indivíduos com sépsis e no líquido sinovial de articulações comprometidas pela osteoartrite (HOWARD et al., 1997).

É interessante e importante ressaltar, neste momento, que o método empregado para a obtenção desta proteína antagonista, o IL-1ra, foi o produto disponibilizado comercialmente como IRAP®⁷.

Os experimentos idealizados neste estudo verificaram a eficácia da ação antiinflamatória do IRAP® sobre as células do líquido sinovial de eqüinos. No primeiro experimento, a atividade antiinflamatória do IRAP® foi avaliada frente aos estímulos PMA e LPS. Para tanto três *pools* celulares de líquido sinovial, resultante da punção de 54 articulações tíbio-társicas, foram estimulados igualmente e avaliados em relação à produção de espécies reativas do oxigênio antes e depois da adição de IRAP®.

Foi possível observar que nem os estímulos inflamatórios, nem a adição do IRAP® mudou o percentual de células envolvidas na geração do *burst* oxidativo, apesar da tendência de redução deste percentil de células envolvidas ficar claro com a adição do IRAP®.

Contudo, o LPS e o PMA estimularam adequadamente as células do líquido sinovial para a produção de EROs e o IRAP® provocou uma diminuição na fluorescência média emitida pelas células totais, apesar desta redução não ter sido estatisticamente significativa. A irrelevância estatística deveu-se ao alto desvio padrão provocado pelo efeito errático de estimulação do PMA, neste ensaio específico, sobre o *pool* de número dois de células de líquido sinovial.

No segundo experimento, a atividade antiinflamatória do IRAP® é testada empregando-se cinco amostras diferentes preparadas (ou seja, cinco diferentes IRAP® preparados com sangue coletado de cinco diferentes eqüinos) sobre um único *pool* de líquido sinovial.

⁷ Orhtogen Therapeutics GmbH, Dusseldorf, Alemanha

Neste ensaio, o IRAP® apresentou efeito antiinflamatório marcante ($P<0,001$) em relação aos estímulos empregados, mais por diminuir a intensidade de fluorescência, e por consequência, a produção de espécies reativas do oxigênio, do que por alterar a porcentagem de células envolvidas na geração destas espécies.

Conforme demonstrado por Laurindo et al.(1997), a geração das espécies reativas do oxigênio é consequência da ativação celular e indica a instalação de um processo inflamatório bem caracterizado e com repercussões bem descritas sobre os tecidos articulares e seus derivados. A interleucina-1, por sua vez, é a citocina com maior participação na gênese dos processos inflamatórios, e também induz a produção de espécies reativas do oxigênio no microambiente articular (TIKU et al., 1990).

Desta forma, é esperado que a presença do antagonista do receptor de interleucina-1 iniba as manifestações observáveis quando da interação citocina-receptor, e que esta inibição inclua a diminuição da produção das espécies reativas do oxigênio. Na avaliação do líquido sinovial por citometria de fluxo isto foi caracterizado pela diminuição da emissão de fluorescência média, uma vez que esta emissão ocorre em relação linear com a produção das EROs (MASSOCO, 2003; MASSOCO et al., 2006).

Durante o delineamento experimental do presente estudo, o processamento para obtenção do IRAP® gerou especulações sobre quais seriam os efeitos do sangue colhido e tratado de maneira semelhante sobre as populações celulares do líquido sinovial, frente aos mesmos estímulos empregados para o questionamento dos efeitos do IRAP®. Este sangue apenas não entraria em contato com as esferas presentes no interior da seringa comercializada.

Em tese, ao se evitar este contato, a produção da proteína antagonista do receptor de IL-1 não seria desencadeada e, por consequência, os efeitos antiinflamatórios não deveriam ser observados. Optou-se, assim, por um delineamento experimental que incluísse o sangue coletado em seringa comum para controle. Este estímulo foi denominado “plasma” ou “plasma autólogo”, pois era, simplesmente, produto da coleta, incubação, centrifugação e separação do sangue coletado em frasco com heparina de lítio.

No terceiro experimento, o efeito antiinflamatório do plasma obtido de cinco equinos distintos sobre um *pool* de células de líquido sinovial foi testado frente aos estímulos PMA e LPS. Como resultado, observou-se que o plasma teve pouca interferência no percentual de células gerando espécies reativas do oxigênio, mas que teve notável influência ($P<0,001$) sobre a intensidade de geração destas espécies pelas células do líquido sinovial estimulado com PMA e LPS. Ainda é interessante notar que a emissão de fluorescência, em outras palavras a produção de espécies reativas do oxigênio, é reduzida de maneira significativa

apenas pela adição de plasma num ensaio sem estímulo, sugerindo que este possua um efeito “calmante” sobre o *burst* oxidativo basal das células do líquido sinovial, ao qual chamamos de efeito anti-oxidante.

No quarto experimento, os estímulos IRAP® e plasma foram comparados em relação a seus efeitos sobre células do líquido sinovial ativadas pela adição de PMA e LPS. Novamente, o percentual de células produtoras não foi significativamente alterado na maioria dos ensaios, mas tanto o IRAP® como o plasma apresentaram propriedades antiinflamatórias que confirmam os resultados dos experimentos dois e três, com igual magnitude ($P < 0,001$).

Os resultados obtidos nos experimentos sugerem a participação do IRAP® na modulação dos processos inflamatórios. Uma vez que sua adição aos ensaios reduziu a produção de espécies reativas do oxigênio, o efeito antiinflamatório ficou demonstrado.

A interleucina-1 está comprovadamente implicada na patogenia da osteoartrite, sendo encontrada em concentrações significativas no líquido sinovial de articulações acometidas, inclusive em níveis maiores do que os verificados em articulações normais. (FULLER et al., 2001)

A interleucina-1, conforme demonstrado por TIKU et al. (1990), estimula a produção de EROs pelos condrócitos, explicando como, no presente estudo, o antagonismo à ação da interleucina -1 poderia levar à redução da intensidade média de fluorescência emitida pelas células do líquido sinovial eqüino.

O fato de relevância é que as EROs estimulam a cicloxigenase e, por conseguinte, fomentam a produção de tromboxana, prostaciclina e prostaglandina. Existe, ainda, a possibilidade da geração de prostaglandinas *in vivo* por sistema não enzimático, envolvendo a ação direta das EROs sobre o ácido aracdônico. (LAURINDO et al., 1997).

O ácido aracdônico é encontrado em fontes dietéticas ou é o resultado da conversão do ácido graxo essencial, ácido linoleico. Ele não ocorre livre na célula, estando geralmente esterificado nos fosfolípidos de membrana, de onde é liberado através da ação de fosfolípases celulares, como por exemplo, a fosfolipase A2. Metabólitos do ácido aracdônico, também chamados de eicosanóides, são sintetizados a partir de duas grandes classes de enzimas: a cicloxigenase e a lipoxigenase. A cicloxigenase, por sua vez, induz a produção de prostaglandinas e leucotrienos (KUMAR et al., 2005).

Uma das mais importantes prostaglandinas é a prostaglandina E2. Ela atua como coadjuvante no processo inflamatório, sendo o prostanóide mais abundante em articulações acometidas por osteoartrite (GIBSON et al., 1996). Este mediador clássico da inflamação é responsável por eventos como hiperalgesia, dor, febre, vasodilatação, aumento da

permeabilidade de vênulas pós-capilares e formação de edema. Os leucotrienos são potentes agentes quimiotáticos e ativadores das respostas funcionais dos leucócitos, tais como agregação e adesão destas células ao endotélio venular, geração de espécies reativas do oxigênio, liberação de enzimas lisossômicas, aumento de permeabilidade vascular e vasoconstrição (KUMAR et al., 2005). Na osteoartrite eqüina ela desempenha papel fundamental por estimular a produção de MPNs, participar dos processos degradativos das proteoglicanas, causar reabsorção óssea e estar envolvida na formação de osteófitos nas articulações (FARLEY et al., 2005).

A constatação destes eventos deixa clara a ligação entre os fenômenos observados em relação à fluorescência emitida pelas células do líquido sinovial e a presença de um agente antiinflamatório no produto comercializado como IRAP®. Porém a correlação direta entre o efeito antiinflamatório observado e o bloqueio da atividade da interleucina-1 pela ocupação de seu receptor no líquido sinovial de eqüino ainda precisa ser estabelecida.

O resultado mais interessante é o que advém da comparação do efeito antiinflamatório exercido pelo IRAP® com aquele exercido pelo plasma. Observou-se que os efeitos são estatisticamente semelhantes, ocorrendo em valores situados dentro de uma estreita faixa de variação ($P > 0,05$).

Analisando-se estes resultados, pode-se inferir que tanto no plasma como no IRAP® existem agentes antiinflamatórios, semelhantes ou não, mas que tem capacidade de interferir com igual magnitude sobre a resposta inflamatória em relação aos estímulos aqui propostos.

Uma vez que o plasma também exibiu efeito antiinflamatório, ele deverá ser alvo de investigação futura para que se determine quais os fatores que, nele presentes, poderiam ser, responsabilizados pela ação observada. Desta forma poder-se-á, ainda, determinar o papel e a relevância das esferas de vidro tratadas na geração da proteína antagonista de receptor de IL-1. Caso a produção da proteína antagonista do receptor de interleucina-1 a partir do sangue esteja condicionada exclusivamente à sua exposição às esferas de vidro tratadas, outros fatores antiinflamatórios devem estar presentes no plasma e deverão ser igualmente pesquisados. O fator de crescimento semelhante a insulina tipo-1 (IGF-I) e o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) poderiam ser exemplos destes fatores, pelas propriedades anabolizantes e antiinflamatórias que exibem (NIXON et al., 2005).

Somado a isto, não se pode excluir a possibilidade da existência de outros agentes, como por exemplo, citocinas antiinflamatórias, no plasma autólogo, capazes de desencadear as respostas antiinflamatórias observadas através da citometria de fluxo pela diminuição da geração das espécies reativas do oxigênio.

A presença de antagonistas de receptores de outras citocinas, como o TNF alfa, ou de anticorpos que se ligassem a eles, por exemplo, poderia explicar os efeitos antiinflamatórios observados.

Em comum no processamento dos dois subprodutos do sangue, a saber, plasma autólogo e IRAP®, temos o uso do anticoagulante heparina de lítio, a centrifugação e a incubação a 37°C por 24 horas. Por este motivo, estas etapas e agentes de processamento deverão ser analisados como variáveis passíveis de desencadear, por si só ou em conjunto, a produção da proteína antagonista do receptor de interleucina-1.

É interessante comparar os resultados do presente trabalho com os resultados do trabalho publicado por Frisbie et al. (2007) onde após a criação de um modelo cirúrgico de osteoartrite os autores procuraram verificar os efeitos da administração intra-articular do IRAP® sobre variáveis clínicas e laboratoriais. Estes autores induziram a OA artroscopicamente na articulação intercarpiana de 16 cavalos, que foram divididos em 2 grupos. Um deles recebeu tratamento placebo e o outro recebeu injeção intra-articular de IRAP®, nos dias 14, 21, 28 e 35 do pós-operatório.

O sangue para a preparação do IRAP® foi colhido no sétimo dia para posterior injeção nas articulações dos animais do grupo tratamento; uma pequena alíquota foi reservada para análise quantitativa de IL-1ra e esta análise não revelou a presença de IL-1ra em quantidade estatisticamente diferente de zero quando o anticorpo anti-IL-1ra humano foi utilizado. Quando a análise foi feita empregando-se anticorpo anti-IL-1ra de camundongo a concentração de IL-1ra foi estatisticamente maior que zero. Estes resultados sugerem que o anticorpo anti IL-1ra de camundongo é mais apropriado que o humano para a estimativa das concentrações de IL-1ra nas amostras. Dificuldade semelhante na detecção do IL-1ra equino com o emprego do *kit* ELISA humano havia sido descrita por Frisbie et al (2005) e atribuída a falta de reconhecimento da estrutura secundária da proteína antagonista por este ensaio.

Alguns autores sugerem, no entanto, um alto grau de similaridade entre a IL-1ra humana, a do cavalo e do rato (KATO et al., 1997), não ficando claros os motivos da especificidade de ligação do IL-1ra observada no trabalho de Frisbie et al. (2007). Esta especificidade precisa ser mais bem estabelecida para que a metodologia adequada seja utilizada na pesquisa do IL-1ra.

Segundo o trabalho de Meijer et al.(2003) a síntese *de novo* da proteína antagonista do receptor de interleucina-1 ocorre após o processamento do sangue e as concentrações crescentes do antagonista são demonstradas no decorrer do período de incubação. Este estudo,

no entanto, foi feito empregando soro de seres humanos e este foi testado com anticorpos anti IL-1ra humanos.

No trabalho de Frisbie et al. (2007) no momento da colheita de sangue para a preparação do IRAP®, uma alíquota de soro foi obtida sem, contudo, ser submetida à técnica para processamento da proteína antagonista. Esta amostra de soro também teve sua concentração de IL-1ra verificada. Em todas as amostras de soro analisadas as concentrações de IL-1ra não foram estatisticamente diferentes de zero. Ainda mais, comparando estas duas análises, a concentração média de IL-1ra foi significativamente maior no sangue processado (IRAP®) do que no soro que não sofreu processamento.

Contudo, os autores se referem às amostras de soro apenas como soro não processado (“*unprocessed*”), sem especificar se o sangue não foi submetido ao contato com as esferas de vidro tratadas, nem incubado, ou se somente não foi colocado em contato com as esferas de vidro, tendo, no mais, sido processado como as amostras para produção de IRAP®. Para inferir, com certeza, que é o contato do sangue com as referidas esferas o fator responsável pelos níveis de IL-1ra detectados nas amostras tratadas, o soro não processado deveria ter sido, explicita e textualmente, tratado (à exceção da exposição às esferas) de maneira semelhante ao sangue.

Os efeitos do processamento (centrifugação e incubação) deverão ser apropriadamente analisados e as propriedades antiinflamatórias dos diferentes subprodutos deste processamento testadas e comparadas entre si.

Ainda, no trabalho de Frisbie et al. (2007) a análise do soro não processado não revelou a presença de IL-1ra, mas o efeito antiinflamatório deste soro não foi pesquisado. Em nosso estudo, por outro lado, as concentrações de IL-1ra não foram medidas, mas o efeito antiinflamatório do plasma foi comprovado.

No entanto, caso os resultados de Meijer et al. (2003) e Frisbie et al. (2007) possam ser extrapolados para o nosso trabalho, seria possível inferir que existem outros fatores antiinflamatórios, em comum ou não, mas certamente diferentes da proteína antagonista do receptor de interleucina-1, no IRAP® e no plasma, responsáveis pelos efeitos antiinflamatórios observados.

De qualquer maneira, os resultados apresentados neste trabalho e no trabalho de Frisbie et al. (2007) são, em um determinado momento, congruentes e complementares por apontarem, ambos, na direção da existência de um efeito antiinflamatório do sangue processado (IRAP®), tendo o primeiro feito esta inferência com dados obtidos *in vitro*, e o segundo *in vivo*.

Em ambos os trabalhos fica evidente que o processamento do sangue resulta em um líquido com propriedades terapêuticas antiinflamatórias, mas cuja composição precisa ser determinada. Esta averiguação constitui um dos objetivos primordiais de um trabalho futuro, que dará seqüência à caracterização deste produto.

Nele, também, deverão ser incluídas metodologias para avaliar a natureza da ligação da proteína antagonista de receptor em questão ao receptor de interleucina-1, uma vez que as observações clínicas superam, em eficácia, as expectativas em relação à durabilidade dos efeitos da administração intra-articular desta proteína. Teoricamente, as concentrações intra-articulares de IL-1ra não seriam sustentáveis do ponto de vista terapêutico, além do IL-1ra ser considerado um inibidor fraco da interleucina-1. A afinidade do IL-1ra pelo receptor de interleucina-1 não é superior à da citocina, em si, e conforme descrito, ela precisa ocupar apenas um pequeno percentual destes receptores para desencadear uma resposta biológica completa. Ainda, sabe-se que um excesso de 10 a 1000 vezes de IL-1ra é necessário para bloquear totalmente as ações da interleucina-1 (HUNG et al., 1994)

Muitos aspectos desta interação citocina/receptor ainda precisam ser desvendados e o comportamento destas moléculas apresenta nuances surpreendentes a cada novo trabalho realizado. Exemplo disto é a constatação feita por Frisbie et al. (2007) de que as concentrações de IL-1ra eram maiores nas articulações infiltradas com IRAP® e nas quais defeitos osteoartíticos haviam sido provocados, mas que também estavam aumentadas no líquido sinovial de várias outras articulações, como um evento sistêmico. Estas observações sugerem que a administração de IL-1ra estimule a produção endógena de IL-1ra.

Estes mesmos autores constataram que 35 dias após a última injeção intra-articular de IRAP® as concentrações de IL-1ra no líquido sinovial ainda estavam aumentadas, contradizendo as expectativas de outros autores sobre a fugacidade dos efeitos do IL-1ra.

Em relação ao plasma, não existem citações específicas na literatura sobre suas propriedades antiinflamatórias na osteoartrite, mas alguns trabalhos realizados na área de infectologia e imunologia procuram caracterizar e explicar os efeitos da adição de plasma sobre o *burst* oxidativo de macrófagos e neutrófilos de indivíduos doentes e de indivíduos saudáveis. Estes trabalhos podem ajudar a fornecer subsídios para a melhor compreensão dos efeitos antiinflamatórios do plasma observados neste estudo.

O plasma incrementa a capacidade de opsonização e de fagocitose de neutrófilos em potros jovens, capacidade que pode ser aferida pela medição do *burst* oxidativo através da citometria de fluxo (GRÖNDAL et al., 1999).

Ainda, o plasma possui um fator inibidor da secreção de protease leucocitária (SLPI), que inibe a ativação dos neutrófilos; sua concentração está aumentada nos casos de sépsis e na endotoxemia experimental, uma vez que os neutrófilos estão implicados na gênese da injúria tecidual associada à disfunção múltipla de órgãos. Este inibidor da protease funciona limitando a contínua lesão dos tecidos mediada pela ativação dos neutrófilos (GROBMYER et al., 2000). Estes autores também documentaram, *in vitro*, que o SLPI recombinante humano inibiu a produção de peróxido de hidrogênio por neutrófilos humanos, utilizando-se de técnicas de citometria de fluxo. A presença deste fator inibidor no plasma autólogo poderia ser um dos eventos envolvidos nas propriedades antiinflamatórias exibidas neste estudo.

Foi ainda demonstrado que o SLPI provoca uma *upregulation* na produção de citocinas antiinflamatórias (como a interleucina-10 e o TGF- β) por macrófagos estimulados (SANO et al., 2000). Pode-se especular que a presença destas citocinas no plasma autólogo empregado tenha participação nos efeitos antiinflamatórios aqui observados sobre as células do líquido sinovial.

A possibilidade de envolvimento do SLPI, da interleucina-10 e do TGF- β nas propriedades antiinflamatórias do plasma nas células do líquido sinovial equino merece posterior avaliação.

Os primeiros relatos de emprego terapêutico de plasma na Medicina Veterinária equina são de Asbury (1984), sugerindo infusões intra-uterinas de plasma para o tratamento de endometrite; outros trabalhos dão ênfase à administração de plasma como fonte de imunoglobulinas para potros com falência de transferência de imunidade passiva (MCTAGGART et al., 2005) enquanto outros demonstram seus efeitos benéficos em pacientes sépticos ou com hipoproteinemia (ROBINSON, 2005).

Não existem trabalhos científicos anteriores, contudo, verificando os efeitos da utilização de plasma *in vitro* ou de sua administração *in vivo*, com objetivo de produzir efeitos antiinflamatórios sobre células do líquido sinovial, que serão objetivos de pesquisas futuras.

7 CONCLUSÃO

- O percentual de células do líquido sinovial envolvidas na geração de EROs após a sua estimulação com LPS e PMA não aumenta significativamente.
- A adição de PMA e LPS às células de líquido sinovial de equino provoca, outrossim, sua ativação com subsequente incremento na produção de espécies reativas do oxigênio.
- A técnica de citometria de fluxo é eficiente para avaliar a produção destas espécies reativas do oxigênio nas células do líquido sinovial, quantitativamente e qualitativamente.
- A adição de plasma às células do líquido sinovial não altera o percentual de células engajadas na produção de espécies reativas do oxigênio, mas reduz a intensidade média de sua produção, apresentando, por si só, efeito anti-oxidante.
- O plasma possui efeito antiinflamatório sobre as células do líquido sinovial.
- O IRAP® possui efeito antiinflamatório sobre as células do líquido sinovial
- Os efeitos antiinflamatórios do plasma e do IRAP® são equivalentes.

REFERÊNCIAS

- ALWAN, W. H.; CARTER, S. D.; DIXON, J. B.; BENNETT, D.; MAY, S. A.; EDWARDS, G. B. Interleukin-1-like activity in synovial fluids and sera of horses with arthritis. **Research in Veterinary Science**, v. 51, n. 1, p. 72-77, 1991.
- AREND, W. P.; JOSLIN, F. G.; THOMPSON, R.C.; HANNUM, C. H. An IL-1 inhibitor from human monocytes-Production and characterization of biologic properties. **The Journal of Immunology**, v. 143, n. 6, p. 1851-1858, 1989.
- AREND, W. P.; WELGUS, H. G.; THOMPSON, R. C. EISENBERG, S.P. Biological properties of recombinant human monocyte-derived interleukin-1 receptor antagonist. **Journal Clinical Investigation**, v. 85, n. 5, p. 1694-1697, 1990.
- ASBURY, A. C. Uterine defense mechanisms in the mare: The use of intrauterine plasma in the management of endometritis. **Theriogenology**, v. 71, n. 2, p.387-393, 1984.
- BABIOR, B. M. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts). **The New England Journal of Medicine**, v. 298, n. 12, p. 659-668, 1978a.
- BABIOR, B. M. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (second of two parts). **The New England Journal of Medicine**, v. 298, n. 13, p. 721-725, 1978b.
- BABIOR, B. M. The respiratory burst of phagocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 73, n. 3, p. 599-601, 1984.
- BAILEY, S. R.; ELLIOT, J. The corticosteroid laminitis story:2. Science of it, when and how. **Equine Veterinary Journal**, v. 39, n. 1, p.7-11, 2007.
- BASS, D. A.; PARCE, J. W.; DECHATELET, L. R.; SZEJDA, P.; SEEDS, M. C.; THOMAS, M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. **Journal of Immunology**, v. 130, n. 4, p. 1910-1917, 1983.
- BERTONE, A. L.; PALMER, J. L.; JONES, J. S. Synovial fluid cytokines and eicosanoids as markers of joint disease in horses. **Veterinary Surgery**, v. 30, n. 6, p. 528-538, 2001.
- BLAKE, D. R.; HALL, N. D.; TREBY, D. A.; HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Protection against superoxide and hydrogen peroxide in synovial fluid from rheumatoid patients. **Clinical Science**, v. 61, n. 4, p. 483-486, 1981.
- BRANDT, R.; KESTON, A. S. Synthesis of diacetyldichlorofluorescein: a stable reagent for fluorometric analysis. **Analytical Biochemistry**, v. 11, p. 6-9, 1965.

BRESNIHAN, B.; AVARO-GRACIA, J. M.; COBBY, M.; DOHERTY, M.; DOMIJAN, Z.; EMERY, P.; NUKI, G.; PAVELKA, K.; RAU, R.; ROZMAN, B.; WATT, I.; WILLIAMS, B.; AITCHISON, R.; MCCABE, D.; MUSIKIC, P. Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. **Arthritis and Rheumatism**, v. 41, n. 12, p. 2196-2204, 1998.

BURKHARDT, H.; SCHWINGLE, M.; MENNINGER, H.; MACARTNEY, H.W.; TSCHESCHE, H. Oxygen radicals as effectors of cartilage destruction. **Arthritis and Rheumatism**, v. 29, n. 3, p. 379-387, 1986.

CARON, J. P.; FERNANDES, J. C.; MARTEL-PELLETIER, J.; TARDIF, G.; MINEAU, F.; GENG, C.; PELLETIER, J. Chondroprotective effect of intraarticular injections of interleukin-1 receptor antagonist in experimental osteoarthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 39, n. 9, p. 1535-1544, 1996.

CLEGG, P. D.; BURKE, R. M.; COUGHLAN, A. R.; RIGGS, C. M.; CARTER, D. Characterisation of equine matrix metalloproteinase 2 and 9; and identification of the cellular sources of these enzymes in joints. **Equine Veterinary Journal**, v. 29, n. 5, p. 335-342, 1997.

DECHATELET, L. R. Initiation of the respiratory burst in human polymorphonuclear neutrophils: a critical review. **Journal of the Reticuloendothelial Society**, v. 24, n. 1, p. 73-91, 1978.

DHAR, A. K.; THOMPSON, M. S.; PARADIS, M. R.; ACIVAR-WARREN, A. Determination of the cDNA sequence and mRNA expression of interleukin-1 receptor antagonist in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 8, p. 920-924, 2000.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonist. **Blood**, v. 77, n. 8, p. 1627-1652, 1991.

DINARELLO, C. A.; THOMPSON, R. C. Blocking IL-1: interleukin 1 receptor antagonist *in vivo and in vitro*. **Immunology Today**, v. 12, n. 11, p. 404-410, 1991.

FARLEY, J.; SIROIS, J.; MACFARLANE, P. H.; KOMBÉ, A.; LAVERTY, S. Evaluation of coexpression of microsomal prostaglandin E synthase-1 and cyclooxygenase-2 in interleukin-1-stimulated equine articular chondrocytes. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 11, p. 1985-1991, 2005.

FLAMINIO, M. J. B. F.; RUSH, B. R.; DAVIS, E. G.; HENNESSY, K.; SHUMAN, W.; WILKERSON, M. J. Simultaneous flow cytometric analysis of phagocytosis and oxidative burst activity in equine leukocytes. **Veterinary Research Communications**, v. 26, n. 2, p. 85-92, 2002.

FRISBIE, D. D.; GHIVIZZANI, S. C.; ROBBINS, P. D.; EVANS, C. G.; MCILWRAITH, C. W. Treatment of experimental equine osteoarthritis by *in vivo* delivery of the equine interleukin-1 receptor antagonist gene. **Gene therapy**, v. 9, n. 1, p. 12-20, 2002.

FRISBIE, D. D.; KAWCAK, C. E.; MCILWRAITH, C. W. Evaluation of autologous conditioned serum using an experimental model of equine osteoarthritis. In: Annual CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 51., 2005, Seattle. **Proceedings ...** Seattle: American Association of Equine Practitioners, 2005. p. 374-375.

FRISBIE, D. D.; KAWCAK, C. E.; WERP, N. M.; PARK, R. D.; MCILWRAITH, W. Clinical, biochemical, and histologic effects of intra-articular administration of autologous conditioned serum in horses with experimentally induced osteoarthritis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, n. 3, p. 290-296, 2007.

FRISBIE, D. D.; MCILWRAITH, C. W. Evaluation of gene therapy as a treatment for equine traumatic arthritis and osteoarthritis. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, p. 273-287, 2000. Supplementum 379.

FULLER, C. J.; BARR, A. R. S.; DIEPPE, P. A. variations in cartilage catabolism in different equine joints in response to interleukin-1 in vitro. **The Veterinary Record**, v.148, n. 17, p. 204-206, 2001.

GIBSON, K. T.; HODGE, H.; WHITTEM, T. Inflammatory mediators in equine synovial fluid. **Australian Veterinary Journal**, v. 73, n. 4, p.148-151, 1996.

GROBMYER, S. R.; BARIE, P. S.; NATHAN, C. F.; FUORTES, M.; LIN, E.; LOWRY, S. F.; WRIGHT, C. D.; WEYANT, M. J.; HYDO, L.; REEVES, F.; SHILOH, M.U.; DING, A. Secretory leukocyte protease inhibitor, an inhibitor of neutrophil activation, is elevated in serum in human sepsis and experimental endotoxemia. **Critical Care in Medicine**, v. 28, n. 5, p. 1276- 1282, 2000.

GRÖNDAL, G., JOHANNISSON, A.; JENSEN-WAERN, M. Opsonic effect of equine plasma from different donors. *Veterinary Microbiological*, v. 56, n. 3-4, p. 227-235, 1999.

HASUI, M.; HIRABAYASHI, Y.; KOBAYASHI, Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. **Journal of Immunological Methods**, v. 117, n. 1, p. 53-58, 1989.

HENDERSON, B.; PETTIPHER, E. R. The synovial lining cell biology and pathobiology. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 15, p. 1-32, 1985.

HENDERSON, B.; THOMPSON, R. C.; HARDINGHAM, T.; LEWTHWARTE, J. Inhibition of interleukin-1 induced synovitis and articular cartilage proteoglycan loss in the rabbit knee by recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. **Cytokine**, v. 3, n. 3, p. 246-249, 1991.

HINCHCKIFF, K. W.; KANEPS, A. J.; GEOR, R. J. **Equine sports medicine and surgery**. Philadelphia:Saunders, 2004, 1364 p.

HIRABAYASHI, Y.; TANIUCHI, S.; KOBAYASHI, Y. A quantitative assay of oxidative metabolism by neutrophils in whole blood using flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 82, n. 2, p. 253-259, 1985.

HODGSON, J. C.; WATKINS, C. A.; BAYNE, C. W. Contribution of respiratory burst activity to innate immune function and the effects of disease status and agent on chemiluminescence responses by ruminant phagocytes in vitro. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, n. 1-2, p. 12-23, 2006.

HOWARD, R. D.; MCILWRATH, C. W.; TROTTER, G. W.; NYBORG, J.K. Cloning of equine interleukin 1 receptor antagonist and determination of its full-length cDNA sequence. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, n. 6, p. 712-716, 1998.

HUNG, G. L.; GALEA-LAURI, J.; MUELLER, G. M.; GEORGESCU, H. I.; LARKIN, L. A.; SUCHANEK, M. K.; TINDAL, M. H.; ROBBINS, P. D.; EVANS, C.H. Suppression of intra-articular responses to interleukin-1 by transfer to the interleukin-1 receptor antagonist gene to synovium. **Gene Therapy**, v. 1, n.1, p.64-69, 1994.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. J. **Immunobiology**: the immune system in health and disease. 6. ed. New York: Garland, 2004. 800 p.

KAMPEM, A. H.; TOLLERSRUD, T.; LUND, A. Flow cytometric measurement of neutrophil respiratory burst in whole bovine blood using live *Staphylococcus aureus*. **Journal of Immunological Methods**, v. 289, n. 1-2, p. 47-55, 2004.

KATO, H.; OHASHI, T.; MATSUSHIRO, H.; WATARI, T.; GOITSUKA, R.; TSUJIMOTO, H.; HASEGAWA, A. Molecular cloning and functional expression of equine interleukin-1 receptor antagonist. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 56, n. 3-4, p. 221-231, 1997.

KIM, Y. M.; LIM, J. M.; KIM, B. C.; HAN, S. Cu,Zn-superoxide dismutase is an intracellular catalyst for the H₂O₂-dependent oxidation of dichlorodihydrofluorescein. **Molecules and Cells**, v. 21, n. 1, p. 161-165, 2006.

KIRISAWA, R.; HASHIMOTO, N.; TAZAKI, M.; YAMANAKA, H.; ISHII, R.; HAGIWARA, K.; IWAI, H. Molecular characterization and functional expression of equine interleukin-1 type I and type II receptor cDNAs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 109, n. 3-4, p. 219-231, 2006.

KUMAR, V. K.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Pathologic basis of disease**. 7. ed. Philadelphia: Saunders, 2005, 1525 p.

LAURINDO, I. M. M.; MELLO, S. B. V.; NOVAES, G. S.; PALACIOS, F. A. S.; YOSHINARI, N. H. Participação dos radicais livres na inflamação articular. **Revista do Hospital das Clínicas**, v. 52, n. 2, p. 72-79, 1997.

MALYAK, M.; SWANEY, R. E.; AREND, W. P. Levels of synovial fluid interleukin-1 receptor antagonist in rheumatoid arthritis and other arthropathies. **Arthritis and Rheumatism**, v. 36, n. 6, p. 781-789, 1993.

MARTEL-PELLETIER, J.; MCCOLLUM, R.; DIBATTISTA, J.; FAURE, M.; CHIN, J. A.; FOURNIER, S.; SARFATI, M.; PELLETIER, J. The interleukin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. **Arthritis and Rheumatism**, v. 35, n. 5, p. 530-540, 1992.

MASSOCO, C. O. **Receptores benzodiazepínicos periféricos e a resposta imune inata de eqüinos: efeitos do midazolam**. 2003. 125 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2003.

MASSOCO, C. O.; CARMONA, L.; BACCARIN, R. Y. A. Técnica de citometria de fluxo para avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pelas células do líquido sinovial de eqüinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 4, p. 665-667, 2006.

MASSOCO, C.; PALERMO NETO, J. Effects of midazolan on equine innate immune response: a flow cytometric study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 95, n. 1-2, p. 11-19, 2003.

MAY, S. A.; HOOKE, R. E.; LEES, P. Inhibition of interleukin-1 activity by equine synovial fluid. **Equine veterinary Journal**, v. 24, n. 2, p. 99-102, 1992a.

MAY, S. A.; HOOKE, R. E.; LEES, P. Interleukin-1 stimulation of equine articular cells. **Research in Veterinary Science**, v. 52, n. 3, p. 342-348, 1992b.

MAY, S. A.; HOOKE, R. E.; LEES, P. The characterization of equine interleukin-1. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 24, n. 2, p. 169-175, 1990.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I.; Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.

MCCOY JR., J. P. Basic principles in clinical flow cytometry. In: KEREN, D. F.; HANSON, C. A.; HURTUBISE, P. E. (Ed.). **Flow cytometry and clinical diagnosis**. Chicago: American Society of Clinical Pathologists, 1994. p. 26-55.

MCILWRAITH, C. W.; TROTTER, G. W. **Joint disease in the horse**. Philadelphia:Saunders, 1996, 490 p.

MCNEIL, J. D.; WIEBKIN, O. W.; BETTS, W. H.; CLELAND, L. G. Depolymerisation products of hyaluronic acid after exposure to oxygen-derived free radicals. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 44, n. 11, p. 780-789, 1985.

MCPHAIL, L. C.; SHIRLEY, P. S.; CLAYTON, C. C.; SNYDERMAN, R. Activation of the respiratory burst enzyme from human neutrophils in a cell-free system. Evidence for a soluble cofactor. **Journal of Clinical Investigation**, v. 75, n. 5, p. 1735-1739, 1985.

- MCTAGGART, C.; PENHALE, J.; RAIDAI, S.L. effect of plasma transfusion on neutrophil function in healthy and septic foals. **Australian Veterinary Journal**, v. 83, n. 8, p. 499-505, 2005.
- MCTAGGART, C.; YOVICH, J. V.; PENHALE, J.; RAIDAL, S. L. A comparison of foal and adult horse neutrophil function using flow cytometric techniques. **Research in Veterinary Science**, v. 71, n. 1, p. 73-79, 2001.
- MEIJER, H.; REINECKE, J.; BECKER, C.; THOLEN, G.; WEHLING, P. The production of anti-inflammatory cytokines in whole blood by physico-chemical induction. **Inflammatory Research**, v. 52, n. 10, p. 404-407, 2003.
- MORRIS, E. A.; MCDONALD, B. S.; WEBB, A. C.; ROSENWASSER, L. J. Identification of interleukin-1 in equine osteoarthritic joint effusions. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, n. 1, p. 59-65, 1990.
- MOYER, W. **A guide to equine joint injection**. Princeton: Solvay Veterinary, Inc., 1986. 32 p.
- NIXON, A. J.; HAUPT, J. L.; FRISBIE, D. D.; MORISSET, S. S.; MCILWRAITH, C. W.; ROBBINS, P. D.; EVANS, C. H.; GHIVIZZANI, S. Gene-mediated restoration of cartilage matrix by combination insulin-like growth factor-I/interleukin-1 receptor antagonist therapy. **Gene Therapy**, v. 12, n. 2, p. 177-186, 2005.
- PELLETIER, J.; CARON, J. P.; EVANS, C.; ROBBINS, P. D.; GEORGESCU, H. I.; JOVANOVIC, D.; FERNANDES, J. C.; MARTEL-PELLETIER, J. In vivo suppression of early experimental osteoarthritis by interleukin-1 receptor antagonist using gene therapy. **Arthritis and Rheumatism**, v. 40, n. 6, p. 1012-1019, 1997.
- PETROV, R.; MACDONALD, M. H.; TESCH, A. M.; BENTON, H. P. Inhibition of adenosine kinase attenuates interleukin-1 and lipopolysaccharide alterations in articular cartilage metabolism. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 13, n. 3, p. 250-257, 2005.
- PLATT, D.; BAYLISS, M. T. An investigation of the proteoglycan metabolism of mature equine articular cartilage and its regulation by interleukin-1. **Equine Veterinary Journal**, v. 26, n. 4, p. 297-303, 1994.
- RAIDAL, S. L.; BAILEY, G. D.; LOVE, D. N. Flow cytometric determination of oxidative burst activity of equine peripheral blood and bronchoalveolar lavage-derived leukocytes. **The Veterinary Journal**, v. 156, n. 2, p. 117-126, 1998.
- RAO, K. M.; PADMANABHAN, J.; KILBY, D. L.; COHEN, H. J.; CURRIE, M. S.; WEINBERG, J. B. Flow cytometric analysis of nitric oxide production in human neutrophils using dichlorofluorescein diacetate in the presence of a calmodulin inhibitor. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 51, n. 5, p. 496-500, 1992.
- REED, S. M.; BAYLY, W. M.; SELLON, D. C. **Equine Internal Medicine**. 2. ed. Philadelphia: Saunders, 2004, 1659 p.

RICHARDSON, D. W.; DODGE, G. R. Effects of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α on expression of matrix-related genes by cultured equine articular chondrocytes. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 6, p. 624-630, 2000.

ROBINSON, N. E. **Current Therapy in Equine Medicine**. 5.ed. Philadelphia: Saunders, 2005, 143p.

ROITT, I. M.; BROSTOFF, J.; MALE, D. K. **Immunobiology**. London: Gower Medical, 1985. p. 1.1-2.15.

ROSS, M. W.; DYSON, S. J. **Diagnosis and management of lameness in the horse**. St. Louis: Saunders, 2003, 1140 p.

ROSSETTI, R. B. **Comparação da resposta inflamatória articular decorrente da distensão líquida ou gasosa em eqüinos submetidos a exame artroscópico**. 2006. 101 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

SANO, C.; SHIMIZU, T.; SATO, K.; KAWAUCHI, H.; TOMIOKA, H. Effects of secretory leucocyte protease inhibitor on the production of the anti-inflammatory cytokines, IL-10 and transforming growth factor-beta (TGF-beta), by lipopolysaccharide-stimulated macrophages. **Clinical Experimental Immunology**, v. 121, n. 1, p. 77-85, 2000.

SHEPHERD, V. L. The role of the respiratory burst of phagocytes in host defense. **Seminars in Respiratory Infections**, v. 1, n. 2, p. 99-106, 1986.

SILVEIRA, L. R. Considerações críticas e metodológicas na determinação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em células musculares durante contrações. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 48, n. 6, p. 812-22, 2004.

SOH, N. Recent advances in fluorescent probes for the detection of reactive oxygen species. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 386, n. 3, p. 532-543, 2006.

STASHAK, T. S. **Adam's lameness in horses**. 5. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2002, 1174 p.

SZEJDA, P.; PARCE, J. W.; SEEDS, M. S.; BASS, D. A. Flow cytometric quantitation of oxidative product formation by polymorphonuclear leukocytes during phagocytosis. **Journal of Immunology**, v. 133, n. 6, p. 3303-3307, 1984.

TAKAFUJI, V. A.; HOWARD, R. D.; WARD, D. L.; SHAROVA, L. V.; CRISMAN, M. V. Modulation of equine articular chondrocyte messenger RNA levels following brief exposures to recombinant equine interleukin-1 β . **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 106, n. 1-2, p. 23-38, 2005.

TAKAFUJI, V. A.; MCILWRAITH, C. W.; HOWARD, R. D. Effects of equine recombinant interleukin-1 α and interleukin-1 β on proteoglycan metabolism and prostaglandin E2 synthesis in equine articular cartilage explants. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 4, p. 551-558, 2002.

TIKU, M. L.; LIESCH, J. B.; ROBERTSON, F. M. Production of hydrogen peroxide by rabbit articular chondrocytes.- Enhancement by cytokines. **The Journal of Immunology**, v. 145, n. 2, p.690-696, 1990.

TING, J. T.; VENTA, P. J.; EBERHART, S. W.; YUZBASIYAN-GURKAN, V.; ALEXANDER, L.; CARON, J. P. Effects of anti-arthritis preparations on gene expression and enzyme activity if cicloxygenase-2 in cultures equine chondrocytes. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 8, p. 1134-1139, 2002.

VOWELLS, S. J.; SEKHSARIA, S.; MALECH, H. L.; SHALIT, M.; FLEISHER, T. A. Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. **Journal of Immunological Methods**, v. 178, n. 1, p. 89-97, 1995.

WALRAND, S.; VALEIX, S.; RODRIGUEZ, C.; LIGOT, P.; CHASSAGNE, J.; VASSON, M. P. Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. **Clinica Chimica Acta**, v. 331, n. 1-2, p. 103-110, 2003.

WATSON, G. L.; SLOCOMBE, R. F.; ROBINSON, N. E.; SLEIGHT, S. D. Definition of chemiluminescence and superoxide production responses of bovine neutrophils to selected soluble and particulate stimulants, and comparisons with the responses to *Pasteurella haemolytica*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 8, p. 1045-1054, 1995.

WELCH, H.; MAURAN, C.; MARIDONNEAU-PARINI, I. I. Nonreceptor protein-tyrosine kinases in neutrophil activation. **Methods**, v. 9, n. 3, p. 607-618, 1996.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v. 74, n. 1, p. 139-162, 1994.