Mariana Trivilin Mendes

**Efeito de drogas sintéticas inibidoras
do fator de necrose tumoral alfa
na artrite reumatoide em ratos**

*Effect of synthetic drugs inhibiting
tumor necrosis factor alpha
on the experimental arthritis in rats*

São Paulo

2017

Mariana Trivilin Mendes

**Efeito de drogas sintéticas inibidoras
do fator de necrose tumoral alfa
na artrite reumatoide em ratos**

*Effect of synthetic drugs inhibiting
tumor necrosis factor alpha
on the experimental arthritis in rats*

Versão Corrigida da Tese
apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de
Fisiologia Geral.

Orientador: Dr. Paulo Flávio Silveira

São Paulo

2017

Mendes, Mariana Trivilin
Efeito de drogas sintéticas inibidoras do fator de
necrose tumoral alfa na artrite reumatoide em ratos
Mariana Trivilin Mendes;
orientador Dr. Paulo Flávio Flávio Silveira.
-- São Paulo, 2017.

107 f.

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, Departamento de Fisiologia.

1. Artrite reumatoide.
2. Drogas Anti-TNF- α .
3. Novas Terapias.
4. Novos Usos para Velhas Drogas.
5. Reposicionamento de Drogas.

Prof(a). Dr(a). Orientador(a)

Paulo Flávio Silveira

Dedicatória

Agradeço primeiramente a **Deus**, que possibilitou o encontro com pessoas tão especiais e sempre me deu forças, saúde, consolo e me fortaleceu nos momentos difíceis. À minha mãe, **Linéia Ruiz Trivilin**, que sempre foi um exemplo de dedicação, caráter, e esforço, pelo incentivo a ler e estudar desde pequena, por estar junto comigo em cada derrota, comemoração, lágrimas e sorrisos nessa jornada chamada vida.

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

A minha avó materna **Ana Ruiz Trivilin**, exemplo de força, coragem e amor, por ser a melhor vó do mundo. Me orgulho de ser sua neta. A minha família, irmãs (**Anna e Marília**), padrasto (**Pedro Kobler**), tios (**Luiz, João Luiz e Amilton**), tias (**Ligia, Livânia, Rosana e Solange**), avó (**Agripina**) e primos (**Camila, Vitor, Diego, Vini, João Vitor, Carol, Gabriel, Enzo e Ana Letícia**) pelo carinho e por me apoiarem, uma família maravilhosa da qual tenho muito orgulho.

Ao **Denis Pupo**, que apesar das adversidades da vida sempre esteve do meu lado, me apoiando e dando forças, por me entender sempre e pelo amor, companheirismo e amizade de todos esses anos, por me mostrar o verdadeiro significado do amor. À minha melhor amiga, **Camilla de Cássia Sovenhi**, pela certeza de uma amizade que irá durar a vida inteira, por estar sempre presente, pela companhia, conselhos, risadas, pela família que me adotou, pela força sem tamanho e por ser meu porto seguro.

À **Kelly de Albuquerque**, pela nossa amizade baseada em gordices, conversas existenciais, ombro pra chorar, conselhos e confiança, por estar presente mesmo longe, por ser tão importante pra mim, que nossa amizade dure para sempre. Às minhas amigas: **Isis Rossetti Torrito, Shirley Oliveira, Caroline F. Prado Teles, Aline Blasques, Jéssica Camila Rodrigues, Natassja Foizer, Lorraine Andrade e Natália Fávero** por me mostrarem o valor da amizade e do amor, das risadas fora de hora, dos conselhos, das conversas e dos abraços apertados quando se é preciso.

Aos meus sobrinhos postigos: **Bella, Gabi, Manu e João Pedro** pelo amor incondicional, sorrisos, abraços e brincadeiras que deixam minha vida mais leve.

Em memória do meu avô materno **Leonildo Trivilin**, que faz muita falta e de quem eu lembro sempre com muito carinho, minha saudade e meu amor serão eternos.

A todas as pessoas que fizeram ou que fazem parte da minha vida e que de alguma maneira me ajudaram a ser quem hoje sou, ou contribuíram na minha jornada até aqui.

Epígrafe

O meu Deus pode.
Quando a rotina tornar-se pesada demais,
quando o meu teto estiver encoberto
por uma grande abóbada de obscuridade,
quando eu olhar para o céu e enxergar apenas escuridão...
Ele me dará a visão das estrelas.
Os fragmentos de amor de cada pincelada na qual
Ele formou as nuvens,
entre elas ali estará os resquícios de esperança.
Quando a seta da dor me perfurar,
o meu Deus me tomará pela Tua mão e me mostrará que existe cura.
Que a força do milagre ainda está firmada na rocha
e que a chama da fé não foi apagada.
O meu Deus pode.
Ele pode transformar o meu deserto num manancial
e transformar a minha terra árida num jardim repleto de flores.
Em meio às guerras, quando o medo me consumir,
quando o riacho se transformar em ondas violentas,
quando o chão estiver rígido demais,
o meu Deus trará a restituição dobrada,
o amanso, o mar calmo, os ombros fortes.
Quando as lágrimas forem muito densas,
quando a vontade de viver se tornar escassa,
o meu Deus irá trazer a paz que excede o entendimento
e me dará o impulso necessário em direção à Promessa.
Quando o caminho da volta por ventura se parecer melhor,
Deus me mostrará os tesouros gloriosos do caminho da ida.
Quando tudo ao meu redor for cinzas,
quando a descrença se assentar,
quando a subida for íngreme demais.
Deus virá e não tardará.
No meio da tribulação, ao redor das feridas e das súplicas...
Deus vem. Ele vem, sim. Ele sempre virá.

Igor Salles

Agradecimentos

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

Aos meus colegas de laboratório, **Dra. Rafaela Fadoni Alporti Vendrame**, **Patrícia Lúcio Alves** e **Dr. Rodrigo Frezzatti**, por tornarem meu dia a dia mais leve, pelas risadas, brincadeiras, pela ajuda inestimável em experimentos e nas discussões do meu trabalho e, principalmente, pela amizade, que me é especial.

A **Dra. Rafaela Fadoni Alporti Vendrame**, pela paciência e atenção com que me auxiliou durante toda minha trajetória no laboratório, obrigada por tudo.

Ao meu amigo **Marcelo Florêncio Passos Silva**, pela amizade e pelo auxílio em vários experimentos durante todo meu doutorado.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia, **Adriana Martins**, **Lucas Alves** e **Natália Fernanda Teixeira** pelas risadas, congressos e vivências.

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

Ao **Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa** da **Universidade de São Paulo** (CEFAP-USP/ FLUIR) e ao **Laboratório de Bioquímica** do **Instituto Butantan** pelas contribuições nas etapas de utilização de equipamento e software para análise da densitometria óssea.

Agradeço ao **Dr. Fernando Delgado Pretel** do CEFAP e a **Dra Sônia Elisabete Alves de Lima** do Instituto Butantan pelo auxílio na utilização do equipamento de densitometria óssea e do software de análise.

Agradeço à **Roseli Silva Santos**, secretária do Departamento de Fisiologia da Universidade de São Paulo, pela dedicação e auxílio.

Agradeço a **Fundação Ezequiel Dias (FUNED)** pelo fornecimento da talidomida para a execução desse projeto.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela bolsa concedida.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Geral** do **Instituto de Biociências** da **Universidade de São Paulo**.

LISTA DE ABREVIATURAS

AG - tratamento agudo
AINHs - drogas anti-inflamatórias não hormonais
ALT - alanina-transaminase ou TGP
AMPc - adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANA - anticorpo antinuclear
APB - aminopeptidase básica
anti-CCP - autoanticorpos contra peptídeos e proteínas citrulinados cíclicos
AR - artrite reumatoide e grupo artrítico induzido por CII e adjuvante
AST - aspartato-transaminase ou TGO
BAFF - fator ativador de linfócitos B
BLT - receptores do leucotrieno-B₄
bFGF - expressão básica do fator de crescimento de fibroblastos
CIA - modelo de indução da artrite por colágeno tipo II em adjuvante
CII - colágeno tipo II
COX - ciclooxigenase
CR - tratamento crônico
C-S - animais controles injetados com salina
DMARDs - drogas modificadoras da doença
DMSO - dimetil-sulfóxido
DPOC - doença pulmonar obstrutiva crônica
EDA - ectodisplasina
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
EMA - Agência Europeia de Medicamentos
FDA - Food and Drug Administration
FGF-2 - Fator de crescimento de fibroblastos
FS - fração solúvel
FR - fator reumatoide
Gran - granulócitos
HCT - hematócrito
HGB - concentração de hemoglobina
i.d. - via intradérmica
IFN- γ - interferon- γ
IL - interleucina
i.p. - via intraperitoneal
IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada
Leuc - leucócitos
Linf - linfócitos
LS - líquido sinovial
LPS - lipopolissacarídeo
LT - leucotrieno
LT-A₄-H - leucotrieno-A₄-hidrolase
LT-B₄- leucotrieno-B₄
MIX - tratamento combinado das drogas rupatadina, pentoxifilina, rolipram e talidomida
MCH - conteúdo celular médio de hemoglobina em uma hemácia
MCHC - concentração celular média de hemoglobina em uma hemácia
MIP-1 α - proteína inflamatória de macrofagos
Mon - monócitos
MPV - volume plaquetário médio

mRNA - RNA mensageiro
mTNF - TNF- α transmembranal
MTX - metotrexato
PAF - fator de ativação plaquetária
NF- κ B - fator de transcrição nuclear kappa B
PBMCs - células mononucleares do sangue periférico
PBS - tampão fosfato
PCR - proteína C reativa
PDE - fosfodiesterase
PDE4 - fosfodiesterase tipo 4
PDW - índice de amplitude de distribuição do tamanho das plaquetas
PLT - plaquetas
PLT crit - Plaquetócrito ou massa plaquetária
PKA - proteína quinase A1
PRED - prednisolona
PTX - pentoxifilina
RANKL - ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B
RBC - hemácias
RDW - faixa de distribuição das hemácias
ROL - rolipram
RUP - rupatadina
s.c. - via subcutânea
sTNF - TNF- α solúvel
TAL - talidomida
TGO - transaminase glutâmico-oxalacética ou AST
TGP - transaminase glutâmico-pirúvica ou ALT
TRAIL - ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
TRANCE - citocina indutora de ativação relacionada ao TNF
TS - tecido sinovial
TNF- α - fator de necrose tumoral- α
TNFR - família de receptores do fator de necrose tumoral
VEGF- fator de crescimento endotelial vascular
VEGI - inibidor de crescimento de células endoteliais vasculares
VCM - volume corpuscular médio de hemácias

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Hemograma dos controles (C-S) e artríticos não tratados (AR) no 45º dia após a indução CIA-----34

Tabela 2 – Hemograma dos artríticos não tratados (AR) e artríticos tratados com prednisolona crônica (PRED CR), prednisolona aguda (PRED AG), mix das drogas anti-TNF- α (RUP+PTX+ROL+TAL) (MIX), rupatadina (RUP), pentoxifilina (PTX), rolipram (ROL) e talidomida (TAL), MIX e prednisolona crônica (MIX+PRED CR) e MIX e prednisolona aguda (MIX+PRED AG)-----40

Tabela 3 – Níveis plasmáticos de alanina-transaminase (ALT) e aspartato-transaminase (AST) dos artríticos não tratados (AR) e artríticos tratados com prednisolona crônica (PRED CR), prednisolona aguda (PRED AG), mix das drogas anti-TNF- α (RUP+PTX+ROL+TAL) (MIX), rupatadina (RUP), pentoxifilina (PTX), rolipram (ROL) e talidomida (TAL), MIX e prednisolona crônica (MIX+PRED CR) e MIX e prednisolona aguda (MIX+PRED AG)-----41

Tabela 4 - Hemograma dos grupos controle (C-S), artríticos não tratados (AR) e tratados com rolipram (ROL), talidomida (TAL) e ROL+TAL-----45

Tabela 5 - Níveis plasmáticos de alanina-transaminase (ALT) e aspartato-transaminase (AST) dos animais controles (C-S), artríticos não tratados (AR) e artríticos tratados com rolipram (ROL), talidomida (TAL) e ROL+TAL-----50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema sumário geral do protocolo experimental adotado no presente estudo-----	22
Figura 2 - Esquema sumário da triagem seletiva da efetividade antiartrítica e da toxicidade dos tratamentos-----	24
Figura 3 - Evolução temporal da espessura da região plantar das patas traseiras de animais artríticos (AR) (% em relação a controles sadios, C-S =100% em cada tempo) antes (dia 0) e após a indução CIA (dias 14 e 45)-----	31
Figura 4 - Atividade da aminopeptidase básica (APB) na fração solúvel (FS) do tecido sinovial (TS) e de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de controles (C-S) e artríticos (AR) no 45º dia após a indução CIA-----	32
Figura 5 - Fator de necrose tumoral (TNF)- α no plasma de controles (C-S) e artríticos (AR) no 45º dia após a indução CIA-----	32
Figura 6 - Interleucina (IL)-1 β e IL-6 no soro e líquido sinovial (LS) de controles (C-S) e artríticos (AR) no 45º dia após a indução CIA-----	33
Figura 7 - Fator reumatoide (FR) no soro de controles (C-S) e artríticos (AR) no 45º dia após a indução CIA-----	33
Figura 8 – Valores de densidade mineral óssea da região plantar e da tíbia das patas posteriores de controles (C-S) e artríticos (AR) no 45º dia após a indução CIA-----	35
Figura 9 – Níveis plasmáticos de alanina-transaminase (ALT) e aspartato-transaminase (AST) de controles (C-S) e artríticos (AR) no 45º dia após a indução CIA-----	35
Figura 10 – Evolução temporal da massa corporal (g) de controles (C-S) e artríticos (AR) após a indução CIA-----	36
Figura 11 - Alteração percentual da espessura da região plantar das patas traseiras dos animais artríticos tratados com prednisolona crônica (PRED CR), prednisolona aguda (PRED AG), rupatadina (RUP), pentoxifilina (PTX), rolipram (ROL) e talidomida (TAL), RUP+PTX+ROL+TAL (MIX), MIX e prednisolona crônica (MIX+PRED CR) e MIX e prednisolona aguda (MIX+PRED AG) em relação aos artríticos não tratados (AR)-----	36
Figura 12 - Atividade aminopeptidásica básica (APB) na fração solúvel (FS) do tecido sinovial (TS) em artríticos não tratados (AR) e artríticos tratados com prednisolona crônica (PRED CR), prednisolona aguda (PRED AG), rupatadina (RUP), pentoxifilina (PTX), rolipram (ROL) e talidomida (TAL), RUP+PTX+ROL+TAL (MIX), MIX e prednisolona crônica (MIX+PRED CR) e MIX e prednisolona aguda (MIX+PRED AG)-----	37

Figura 13 - Fator de necrose tumoral (TNF)- α em artríticos não tratados (AR) e artríticos tratados com rupatadina (RUP), pentoxifilina (PTX), rolipram (ROL), talidomida (TAL) e RUP+PTX+ROL+TAL (MIX)-----	38
Figura 14 - Linfócitos totais em artríticos não tratados (AR) e artríticos tratados com prednisolona crônica (PRED CR), prednisolona aguda (PRED AG), rupatadina (RUP), pentoxifilina (PTX), rolipram (ROL) e talidomida (TAL), RUP+PTX+ROL+TAL (MIX), MIX e prednisolona crônica (MIX+PRED CR) e MIX e prednisolona aguda (MIX+PRED AG)--- -----	38
Figura 15 – Massa corporal dos artríticos não tratados (AR) e artríticos tratados com prednisolona crônica (PRED CR), prednisolona aguda (PRED AG), rupatadina (RUP), pentoxifilina (PTX), rolipram (ROL) e talidomida (TAL), RUP+PTX+ROL+TAL (MIX), MIX e prednisolona crônica (MIX+PRED CR) e MIX e prednisolona aguda (MIX+PRED AG)-----	42
Figura 16 – Alteração percentual da espessura da região plantar das patas traseiras dos animais artríticos não tratados (AR) e tratados com rolipram (ROL), talidomida (TAL) e ROL+TAL em relação aos animais controles (C-S)-----	43
Figura 17 - Atividade aminopeptidásica básica (APB) na fração solúvel (FS) do tecido sinovial (TS) dos animais controle (C-S), artríticos não tratados (AR) e artríticos tratados com rolipram (ROL), talidomida (TAL) e ROL+TAL-----	44
Figura 18 - Fator de necrose tumoral (TNF)- α dos animais controle (C-S), artríticos não tratados (AR) e artríticos tratados com rolipram (ROL), talidomida (TAL) e ROL+TAL----	44
Figura 19 - Interleucina (IL)-1 β e IL-6 no líquido sinovial dos animais controle (C-S), artríticos não tratados (AR) e artríticos tratados com rolipram (ROL), talidomida (TAL) e ROL+TAL-----	46
Figura 20 - Histologia da articulação tibio-tarsal em corte longitudinal após 15 dias da indução e 30 dias de tratamento (dia 45)-----	48
<i>Figura 20 I. Histologia de animais controle</i> -----	48
<i>Figura 20 II. Histologia de animais artríticos sem tratamento</i> -----	48
<i>Figura 20 III. Histologia de animais artríticos tratados com ROL</i> -----	48
<i>Figura 20 IV. Histologia de animais artríticos tratados com TAL</i> -----	48
<i>Figura 20 IV. Histologia de animais artríticos tratados com ROL+TAL</i> -----	49
Figura 21 - Massa corporal dos animais controles (C-S), artríticos não tratados (AR) e artríticos tratados com rolipram (ROL), talidomida (TAL) e ROL+TAL. Valores são média $\pm$ EPM. Número de animais entre parênteses sobre as barras-----	50

Figura 22- Sumário das etapas da prospecção e efeitos das drogas sob estudo nos animais artríticos em relação aos controles-----65

Figura 23- Esquema ilustrando a ação anti-TNF- α do rolipram (ROL), talidomida (TAL), pentoxifilina (PTX) e da rupatadina (RUP), com destaque (em vermelho) para o mecanismo diferencial dessa ação aqui hipotetizado como principal responsável pelo efeito antiartrítico de ROL e TAL no modelo CIA-----67

Índice

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. AR e modelo CIA	2
1.2. TNF- α	3
1.3. IL-1 β , IL-6 e APB como marcadores da AR	5
1.4. Tratamento da AR	8
1.5. Drogas sintéticas anti-TNF- α	11
1.6. Avaliação macroscópica do grau de artrite em ratos	17
1.7. Avaliação laboratorial de rotina para pacientes de AR	17
1.8. Hepatotoxicidade na triagem de novos esquemas terapêuticos	18
1.9. Alterações ósseas densitométricas e histológicas na AR	20
2. OBJETIVOS	21
2.1. Gerais.....	21
2.2. Específicos.....	21
3. ESTRATÉGIAS DE ESTUDO.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. Animais, tratamentos e amostras.....	25
4.2. Indução de artrite e tratamentos com as drogas	25
4.3. Coleta de material.....	27
4.4. Obtenção de PBMCs	27
4.5. Obtenção da FS do TS e de PBMCs.....	28
4.6. Avaliação da artrite e da hepatotoxicidade.....	28
4.6.1. Avaliação macroscópica	28
4.6.2. Densitometria óssea (BMD)	28
4.6.3. Análise histológica da articulação tíbio-tarsal	28
4.6.4. Hemograma.....	29
4.6.5. ALT, AST, TNF- α , IL-1 β e IL-6	29
4.6.6. FR e ANA	29
4.6.7. Atividade APB	29
4.6.8. Teor proteico.....	29
4.7. Análise dos resultados	29
5. RESULTADOS	31
5.1. Caracterização da artrite	31
5.1.1. Espessura das patas.....	31
5.1.2. Atividade APB.....	31
5.1.3. TNF- α	32
5.1.4. IL-1 β e IL-6	32
5.1.5. Fator reumatoide (FR) e Anticorpo antinuclear (ANA)	33
5.1.6. Hemograma.....	34
5.1.7. Densitometria óssea	35

5.2. Hepatotoxicidade e toxicidade metabólica dos tratamentos.....	35
5.2.1. Atividade das transaminases	35
5.2.2. Massa corporal.....	36
5.3. Prospecção das drogas efetivas	36
5.3.1. Espessura das patas	36
5.3.2. Atividade APB.....	37
5.3.3. TNF- α	37
5.3.4. Linfócitos	38
5.3.5. Hemograma.....	39
5.4. Hepatotoxicidade e toxicidade metabólica dos tratamentos.....	41
5.4.1. Atividade das transaminases	41
5.4.2. Massa corporal.....	42
5.5. Caracterização da ação antiartrítica nos tratamentos selecionados	42
5.5.1. Espessura das patas	43
5.5.2. Atividade APB	43
5.5.3. TNF- α	44
5.5.4. Hemograma.....	44
5.5.5. Interleucinas.....	46
5.5.6. Histologia.....	46
5.6. Hepatotoxicidade e toxicidade metabólica dos tratamentos.....	49
5.6.1. Atividade das transaminases	49
5.6.2. Massa corporal.....	50
6. DISCUSSÃO	51
6.1. Espessura, massa corporal e análise histológica	51
6.2. Atividade APB.....	54
6.3. Transaminases	55
6.4. Hemograma	57
6.5. Citocinas	58
6.6. FR, ANA e densitometria óssea	62
6.7. Apreciação geral.....	64
7. CONCLUSÕES.....	68
8. PERSPECTIVAS.....	69
9. RESUMO.....	70
10. ABSTRACT.....	72
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1. Introdução

Vários relatos destacam o modelo de indução de artrite em roedores, por administração de colágeno e adjuvante (CIA), como eficiente e prático para a abordagem experimental comparativa da artrite reumatoide (AR) (HU et al., 2013; VINCENT et al., 2012; CHO et al., 2007). Os medicamentos biológicos contra o fator de necrose tumoral (TNF)- α atualmente constituem as principais indicações terapêuticas para os casos mais severos da AR (LAZZERINI et al., 2016; GARNER et al., 2014; MENDONÇA et al., 2012), mas entre as limitações para a disseminação do seu uso estão, principalmente, o alto custo e a dificuldade de fabricação de similares (GROZDANOVA et al., 2016), além de efeitos adversos severos (ATZENI et al., 2015; SINGH et al., 2015; ATZENI et al., 2013; RAMIRO et al., 2014; CURTIS et al., 2011; CURTIS et al., 2010; ASKLING et al., 2007; BONGARTZ et al., 2006).

Pentoxifilina (PTX), rolipram (ROL), rupatadina (RUP) e talidomida (TAL) são fármacos sintéticos de baixo custo, já exaustivamente avaliados clinicamente, classicamente utilizados na terapêutica de outras doenças, potencialmente inibidores da produção de TNF- α e/ou de fatores relacionados e, com exceção da RUP, já parcialmente avaliados, em maior ou menor grau, quanto ao potencial antiartrítico (PAL et al., 2016a; PAL et al., 2016b; THABET et al., 2016; JIANG et al., 2015; KORHONEN et al., 2013; BUBLIKOV et al., 2016; MOHAMMED et al., 2013; MCCANN et al., 2010; YAMAKI et al., 2007; YAMAKI et al., 2004; USHA et al., 2002; SCOVILLE, 2001; FRANCISCHI et al., 2000; KEESAL et al., 1999; LAEMONT et al., 1999; SCOVILLE e READING, 1999; DUBOST et al., 1997; ISHII et al., 1997; LEE et al., 1997; NYMAM et al., 1997; ROSS et al., 1997; SINGH et al., 1997; MAKSYMOWYCH et al., 1995; SEKUT et al., 1995; GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ et al., 1989; GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ, 1984). Porém, ainda não há relatos experimentais suficientes sobre os efeitos antiartríticos da PTX, ROL, RUP e TAL que permitam inferir mecanismos de ação e/ou recomendem ensaios clínicos seguros que incluam a privação dos tratamentos convencionais. Na verdade, como já mencionado, sequer existem estudos da RUP na AR em animais experimentais ou humanos. Há evidente necessidade de aprofundamento do conhecimento sobre essas drogas em modelos experimentais de artrite, com técnicas que avaliem, de forma abrangente, as características, marcadores e ensaios laboratoriais da doença. Além

disso, não há estudos *in vitro* ou *in vivo* sobre o efeito antiartrítico da administração concomitante dessas drogas, exceto para a combinação de PTX+TAL, avaliada diretamente em um único ensaio clínico, no qual não foram obtidos resultados favoráveis (HUIZINGA et al., 1996). Por sua vez, apenas ROL e TAL já foram avaliadas individualmente em modelo experimental CIA, não havendo dados prévios sobre quantificação de aminopeptidase básica (APB), bem como de alanina-transaminase (ALT), aspartato-transaminase (AST) e densitometria óssea sob tratamento com PTX, ROL, RUP e TAL. Finalmente, excetuando-se a PTX, também não há relatos sobre os efeitos, em qualquer doença autoimune, do tratamento concomitante, isolado ou combinado das demais drogas sob estudo aqui, associadas a um anti-inflamatório corticoide clássico como a prednisolona (PRED).

1.1. AR e modelo CIA

A AR é uma doença autoimune, inflamatória, crônica e sistêmica (GAVRILĂ et al., 2016; LEICHSENTRING et al., 2016; BRZUSTEWICZ e BRYL, 2015; PICERNO et al., 2015), com etiologia desconhecida (GAVRILĂ et al., 2016; LEICHSENTRING et al., 2016; KOURILOVITCH et al., 2014), que acomete aproximadamente 1% da população mundial (ISHIKAWA et al., 2017; MOELANTS et al., 2013; SOKOLOVE et al., 2012). As principais características dessa doença são poliartrite periférica, simétrica, com erosões ósseas e da cartilagem, consequente deformidade e destruição das articulações (JEFFERY, 2014), além de resposta imune contra os componentes da cartilagem, entre eles o colágeno tipo II (CII) (LINDH et al., 2014; STROLLO et al., 2013; DOBRITZSCH et al., 2011; NAKAMURA, 2000).

A membrana sinovial de pacientes com AR é hiperplásica (LEICHSENTRING et al., 2016; PICERNO et al., 2015; ATZENI et al., 2013), muito vascularizada e com infiltração de células inflamatórias (BRZUSTEWICZ e BRYL, 2015; ATZENI et al., 2013; BOISSIER et al., 2012). Linfócitos T CD4+ ativados por antígeno estimulam monócitos, macrófagos e fibroblastos sinoviais a produzir interleucina (IL)-1, IL-6, TNF- α , metaloproteinases de matriz e, também, induzem células B a estimular outras células a produzir imunoglobulinas como o fator reumatoide (FR) (ATZENI et al., 2013). O CII é possivelmente o antígeno primário na AR, por ser o principal constituinte da cartilagem (NAKAMURA, 2000). No entanto, anticorpos anti-CII são detectados no plasma de animais tratados com CII em adjuvante, independentemente de terem ou não desenvolvido AR (MENDES, 2012; MENDES et al., 2011).

A CIA é um modelo experimental de autoimunidade que gera uma poliartrite erosiva que apresenta várias características comuns com a AR, entre elas sinovite, formação progressiva de *pannus*, erosão óssea marginal e destruição da cartilagem (HIETALA et al., 2004; CREMER et al., 1998; TRENTHAM et al., 1977).

1.2. TNF- α

A família TNF inclui, até o momento, 19 membros identificados: TNF- α , TNF- β , linfotóxina- α/β , CD40L (CD154), CD27L (CD70), CD30L (CD153), Fas Ligante (FasL), 4-1BBL, OX40L, RANKL (ligante do receptor ativador do fator nuclear kapa, também conhecida como TRANCE, citocina indutora de ativação relacionada ao TNF), TWEAK, LIGHT, BAFF (fator ativador de linfócitos B, também conhecida como BLyS ou TALL1), APRIL (ligante indutor de proliferação, também conhecida como TALL-2), TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF), VEGI (inibidor de crescimento de células endoteliais vasculares, também conhecido como TL1A), GITRL (TL6 ou AITRL), EDA (ectodisplasina) 1 e EDA 2 (DE PAEPE et al., 2012; AGGARWAL et al., 2011; SUN e FINK, 2007), os quais, com exceção da linfotóxina- α e APRIL, são proteínas transmembranais de tipo II (DE PAEPE et al., 2012; SUN e FINK, 2007) que contêm um domínio TNF C-terminal homólogo que se liga a repetidos domínios de cisteína de uma ou mais moléculas pertencentes a família de receptores de TNF (TNFR) (WARD-KAVANAGH et al., 2016; CABAL-HIERRO e LAZO, 2012; SUN e FINK, 2007).

Embora os membros da família TNFR sejam expressos por uma ampla variedade de células, a maioria das proteínas da família TNF é expressa por células do sistema imune (ŚLEBIODA e KMIEĆ, 2014; CROFT et al., 2013; SUN e FINK, 2007; AGGARWAL, 2003). Interações entre os TNFs e seus receptores iniciam múltiplas vias de sinalização promovendo sobrevivência celular, morte, diferenciação ou inflamação (WARD-KAVANAGH et al., 2016; CROFT et al., 2013; CABAL-HIERRO e LAZO, 2012; SUN e FINK, 2007).

A maioria dos membros da família TNF atua ligada à membrana e requer contato célula-célula, apesar de grande parte ser expressa na forma solúvel ou liberada na superfície celular após clivagem por proteases específicas (WARD-KAVANAGH et al., 2016; SONG e BUCHWALD, 2015; CROFT et al., 2013; SUN e FINK, 2007). Assim, o TNF- α é uma citocina encontrada sob a forma de proteína transmembranal (mTNF) ou solúvel (sTNF) (OLESEN et al., 2016; BRENNER et al., 2015;

ŚLEBIODA e KMIEĆ, 2014; CHU, 2013; CABAL-HIERRO e LAZO, 2012). O sTNF e o mTNF diferem nas suas capacidades para estimular as vias de sinalização de seus dois receptores, TNFR-1 e TNFR-2 (BRENNER et al., 2015; ŚLEBIODA e KMIEĆ, 2014; CABAL-HIERRO e LAZO, 2012). O TNFR-1 é expresso constitutivamente na maioria dos tipos celulares (WARD-KAVANAGH et al., 2016; BRZUSTEWICZ e BRYL, 2015; ŚLEBIODA e KMIEĆ, 2014; CHU, 2013; MOELANTS et al., 2013; CABAL-HIERRO e LAZO, 2012) e possui o domínio de morte em sua cauda citoplasmática (BRENNER et al., 2015; ŚLEBIODA e KMIEĆ, 2014; CHU, 2013; CABAL-HIERRO e LAZO, 2012), essencial para a indução de apoptose (BRENNER et al., 2015; AGGARWAL, 2003). Esse receptor participa da proliferação de hepatócitos durante a regeneração do fígado (MCMAHAN et al., 2013) e na indução de NF- κ B, que é essencial para induzir a defesa antiapoptótica e para o controle da resposta imune (OLESEN et al., 2016; BRENNER et al., 2015; CABAL-HIERRO e LAZO, 2012). Já as funções do TNFR-2 são menos conhecidas (CABAL-HIERRO e LAZO, 2012), mas sabe-se que é tipicamente encontrado em células imunológicas e endoteliais (WARD-KAVANAGH et al., 2016; CHU, 2013; MOELANTS et al., 2013; AGGARWAL, 2003), não possuindo o domínio de morte (BRENNER et al., 2015; ŚLEBIODA e KMIEĆ, 2014; CHU, 2013; CABAL-HIERRO e LAZO, 2012).

As principais fontes de TNF- α são as células mononucleares do sangue periférico (PBMCs: monócitos/macrófagos e linfócitos T) e, em menor quantidade, neutrófilos, mastócitos, células dendríticas e células não imunes como as endoteliais, queratinócitos e fibroblastos (BRZUSTEWICZ e BRYL, 2015; ZELOVÁ, e HOŠEK, 2013). Estímulos potencialmente nocivos, físicos (luz ultravioleta, raios-X, calor), químicos ou imunológicos, podem induzir a rápida produção e liberação de TNF- α (OLESEN et al., 2016; BRENNER et al., 2015). O TNF- α é a citocina pró-inflamatória mais rapidamente produzida *in vivo*, com níveis séricos detectáveis em camundongos 30 minutos após estímulo (SCHULTE et al., 2013; FELDMANN e MAINI, 2001). Se a rápida liberação de TNF- α nestas situações é bloqueada, são reduzidos os níveis séricos de outras citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β e IL-6 (FELDMANN e MAINI, 2001), sugerindo que o TNF- α coordena a resposta *in vivo* de citocinas à lesão (FELDMANN e MAINI, 2001) e funciona como um alerta (FELDMANN e MAINI, 2001). A indução, por TNF- α , de múltiplas quimiocinas e moléculas de adesão é de grande importância na rápida atração de leucócitos do

sistema imune e inflamatório para o local da lesão (OLESEN et al., 2016; MOELANTS et al., 2013).

O TNF- α ainda está envolvido na diferenciação e maturação de osteoclastos (principais células relacionadas com a destruição óssea na AR) (BRENNER et al., 2015; ATZENI et al., 2013), estimulando essas células, assim como estimula fibroblastos e condrócitos a secretar proteinases que destroem o osso e a cartilagem articular (BRZUSTEWICZ e BRYL, 2015; ATZENI et al., 2013). Sabe-se que desempenha um papel central na patogênese da AR (OLESEN et al., 2016; BRENNER et al., 2015; ATZENI et al., 2013; CHU, 2013), sendo encontrado em altas concentrações no soro (MOELANTS et al., 2013) e no líquido sinovial (BRZUSTEWICZ e BRYL, 2015) de pacientes acometidos.

1.3. IL-1 β , IL-6 e APB como marcadores da AR

IL-1 β e IL-6 parecem desempenhar papéis importantes na patogênese da AR (BRZUSTEWICZ e BRYL, 2015), tendo sido encontradas em níveis elevados no soro desses pacientes (ENG et al., 2016; BRZUSTEWICZ e BRYL, 2015) e de ratos com artrite induzida por adjuvante (LAN et al., 2016; SHEN et al., 2015; REFAAT et al., 2013).

A família IL-1 possui 11 membros (IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ , IL-1Ra, IL-36RA, IL-37 e IL-38) e desempenha um relevante papel na mediação de respostas imunitárias, devido ao seu largo espectro de funções biológicas e diversidade de células em que atua (AFONINA et al., 2015; TSUTSUI et al., 2015; BOISSIER et al., 2012). Dentre os membros dessa família, IL-1 β , IL-18 e IL-33 são encontradas em níveis elevados na AR (na membrana sinovial, líquido sinovial, soro e cultura de fibroblastos sinoviais de pacientes AR) (LAVRIC et al., 2016; MATEEN et al., 2016; BERTAZZOLO et al., 1994). Na AR, a IL-18 atua ativando células T e macrófagos, induzindo a produção de IL-2, IL-2Ra, TNF- α , prostaglandina E2, enzima óxido nítrico sintase induzível, ciclo-oxigenase (COX)-2 e quimiocinas, inibindo a proliferação de condrócitos e estimulando a angiogênese (MATEEN et al., 2016), além de atuar via IL-1 β na degradação da cartilagem (MCINNES e SCHETT, 2007). A IL-33 atua em várias doenças, inclusive na AR (LAVRIC et al., 2016), na qual o mecanismo de ação proposto é a ativação dos mastócitos e, com isso, produção de citocinas inflamatórias e aumento da secreção de IL-6 e IL-1 β por mastócitos ativados (MACEDO et al., 2016). Por sua vez, a IL-1 β é sintetizada por várias células

do sistema imune no tecido sinovial inflamado na AR, principalmente por monócitos e macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (SCHETT et al., 2016). A IL-1 β , juntamente com o TNF- α , induz o progresso da AR por meio de mediadores como a COX-2, aumentando a produção de prostaglandina E2 e agravando a inflamação sinovial (WU et al., 2016). Além disso, a IL-1 β promove a ativação de células T e a síntese de outras proteínas pró-inflamatórias (BRZUSTEWICZ e BRYL, 2015). A IL-1 β é responsável pela degradação da matriz cartilaginosa e destruição da cartilagem articular por meio da inibição da síntese de colágeno tipo II da cartilagem hialina, alterando o ambiente ao redor das células da cartilagem e levando a variações na estrutura proteica da cartilagem (ROY et al., 2015), além de aumentar a expressão de enzimas extracelulares da matriz, tais como collagenases, que facilitam a destruição da cartilagem articular (SCHETT et al., 2016). Essa citocina não está presente nas células de indivíduos saudáveis e exige uma série de eventos intracelulares antes de ser produzida (DINARELLO et al., 2012). A participação em etapas decisivas de diversos mecanismos de gênese e manutenção da inflamação na AR faz com que a IL-1 β seja a citocina da família IL-1 mais estudada nessa doença.

A IL-6 é produzida por linfócitos T e B, monócitos, macrófagos, fibroblastos, osteoblastos, queratinócitos, células endoteliais e algumas células tumorais (YAO et al., 2014; FONSECA et al., 2009). Na inflamação, é a principal indutora da síntese de proteínas de fase aguda e estimula a produção de anticorpos por linfócitos B (YAO et al., 2014; SCHELLER et al., 2011; FONSECA et al., 2009). A reação de fase aguda é uma das primeiras respostas à lesão e manifesta-se por alterações nos níveis de algumas proteínas no soro, produzidas pelo fígado, como o aumento de proteína C-reativa (PCR), fibrinogênio, ferritina e soro amiloide A e a diminuição de transferrina e albumina (ASSIER et al., 2010; FONSECA et al., 2009). IL-6 está envolvida não só na ativação do sistema imune, mas também em processos de regeneração, regulação do metabolismo, manutenção da homeostase óssea e em muitas funções neurais (SCHELLER et al., 2011). Sabe-se que contribui para a transição da fase aguda para a fase crônica da inflamação na AR, por acúmulo de células mononucleares no local da lesão, contínua secreção de proteína quimiotática de monócitos-1, angiogênese e funções antiapoptóticas em células T (FONSECA et al., 2009). Atua localmente na formação de *pannus* ao ativar células endoteliais vasculares que produzem quimiocinas e moléculas de adesão, promovendo o recrutamento de leucócitos para o local inflamado (ASSIER et al., 2010). Também, auxilia na produção de

metaloproteinases da matriz que digerem o colágeno e os proteoglicanos da cartilagem (MURAKAMI e NISHIMOTO, 2015), induz células endoteliais a expressar quimiocinas, ativa os linfócitos T e B e estimula a diferenciação e ativação de osteoclastos (BRZUSTEWICZ e BRYL, 2015; YAO et al., 2014; MCINNES e SCHETT, 2011). Além de afetar o osso, a IL-6 afeta a qualidade da cartilagem, por meio da diminuição da produção de colágeno tipo II e proteoglicanos pelos condrócitos, e da indução da proliferação de fibroblastos (ASSIER et al. 2010). Na AR, os níveis de IL-6 também são elevados no líquido sinovial e correlacionam-se com a destruição das articulações (BRZUSTEWICZ e BRYL, 2015).

A atividade APB emerge como fator importante na AR. Essa importância vem sendo relacionada com sua participação no processamento de peptídeos (HWANGA e HOOKA, 2008), provavelmente associada com a maturação pós-translacional na rede trans-Golgi, e em processos de regulação na membrana plasmática, o que inclui hidrólise extracelular de vários potenciais substratos peptídicos de relevância fisiológica, além da participação nas etapas finais de processamento de precursores de hormônios e neurotransmissores (CADEL et al., 2015; OHNISHI et al., 2015; CADEL et al., 2013; PHAM et al., 2007). Em animais artríticos do modelo CIA, a atividade APB encontra-se diminuída na fração solúvel de PBMCs e aumentada nas frações solúvel e de membrana do tecido sinovial, sugerindo que essa atividade poderia ser uma potencial marcadora do desenvolvimento de AR (MENDES, 2012; MENDES et al., 2011). Além disso, a APB também poderia ser marcadora da resistência ao desenvolvimento da AR no modelo CIA, pois encontra-se diminuída no líquido sinovial e no plasma e aumentada na fração de membrana de PBMCs de animais desse modelo que não desenvolvem AR (MENDES et al., 2011). Por sua vez, a relevância da dupla função catalítica dessa molécula enzimática, como APB e leucotrieno (LT)-A₄-hidrolase, continua a ser uma questão em aberto (PHAM et al., 2007; PIESSE, et al., 2004, FOULON et al., 1999). Sua ação em ampla faixa de pH demonstra sua adaptabilidade a vários sub-compartimentos celulares e seu envolvimento em um amplo espectro de fenômenos fisiológicos (FOULON et al., 1999), entre os quais se incluem os processos inflamatórios (PHAM et al., 2007; FOULON et al., 1999). Foi hipotetizado que a atividade APB estaria relacionada com a angiogênese, pois a calidina (HEFFELFINGER, 2007; BALOGH et al., 1998) e angiotensina III (RUIZ-ORTEGA et al., 2007), substratos da APB, têm reconhecidas ações na regulação do processo angiogênico (HEFFELFINGER, 2007). Já a atividade

catalítica eicosanoide (LT-A4-H) da APB é responsável pela formação de LT-B4, um potente mediador pró-inflamatório sintetizado por células imunes, como eosinófilos, neutrófilos e macrófagos, o qual estimula a produção de várias citocinas (PENNING et al., 2002), sendo um fator quimiotático reconhecidamente potente durante o início da inflamação (RYAN e GODSON, 2010; HAEGGSTRÖM, 2000), além de promover degranulação, aumento da liberação de enzimas lisossômicas e produção de superóxidos por neutrófilos (TSUJI et al., 1999; SAMUELSSON et al., 1987). Hashimoto e colaboradores (2003) quantificaram a expressão gênica dos receptores de LT-B4 (BLT1 e BLT2) em tecido sinovial de pacientes artríticos, mostrando grande expressão de ambos neste tecido inflamado. Mathis e colaboradores (2010) mostraram redução da incidência e gravidade da doença, incluindo a proteção contra a perda óssea e da cartilagem, em ratos nocauteados para o receptor BLT2 em modelo de artrite induzida por autoanticorpos. Maiores níveis de LT-B4 foram encontrados no plasma na fase ativa da AR, quando comparado com a fase inativa e indivíduos saudáveis (XU, 2010). Mendes e Silveira (2013) mostraram que as atividades LT-A4-H e APB estão inter-relacionadas, de forma compartimento-dependente, atuando como enzimas independentes, com modulação diferencial das suas especificidades, eficiências e/ou afinidades catalíticas sobre os substratos epóxi e peptídico, ou como enzimas bifuncionais ou interdependentes, cujas atividades são inversamente relacionadas devido à inibição concorrente de uma destas atividades.

1.4. Tratamento da AR

Existem três classes principais de medicamentos utilizados no tratamento da AR: 1- drogas anti-inflamatórias não hormonais (AINHs); 2- drogas anti-inflamatórias hormonais ou corticosteroides; 3- drogas modificadoras da doença (DMARDs), subdivididas em drogas sintéticas, como o metotrexato (MTX), sulfassalazina, antimaláricos, leflunamida, ciclosporina e azatioprina, e drogas biológicas, como os anticorpos antilinfócito B, anti-CD20+ (rituximabe/Rituxan, Genentech, Mabthera-Roche), o bloqueador do segundo sinal de ativação do linfócito T (abatacepte/Orencia, Myers, Squibb S.R.L.), o antirreceptor da IL-6 (tocilizumabe/Actemra, Roche; Roactemra, Chugai) (THOMPSON, et al., 2016), bem como, dentre esses, os de uso mais disseminado atualmente, quais sejam os anti-TNF- α (etanercepte/Enbrel, Amgen e Wyeth; infliximabe/Remicade, Mantecorp, Merck&Co, Schering-Plough e Janssen-Cilag; adalimumabe/Humira, Abbott; golimumabe/Simponi, Janssen Biotech).

O conceito corrente no tratamento da AR é o início imediato da administração de alguma das DMARDs sintéticas supracitadas, após definição do diagnóstico e monitoramento clínico-laboratorial e radiográfico (GARNER et al., 2014; JEFFERY, 2014; ATZENI et al., 2013; CAPORALI et al., 2013). As DMARDs atenuam sintomas clínicos e retardam a lesão articular em pacientes com AR (THOMPSON, et al., 2016; AGARWAL, 2011). O MTX geralmente é a DMARD eleita no início do tratamento (PERES et al., 2015; SILVA, 2015; WOODWORTH e DEN BROEDER, 2015; ATZENI et al., 2013; BIANCHI, 2012) e sua forma de administração, isolada ou associada a outra DMARD, dependerá da gravidade e progressão da doença (ATZENI et al., 2013; BIANCHI, 2012). Cerca de 40% dos pacientes tratados com MTX tornam-se resistentes ao tratamento, e a resistência é detectada após um longo período (> 3 meses), quando o quadro da doença pode ter se agravado. A presença de um biomarcador, o CD39, em células T reguladoras periféricas, permitiria reconhecer, dentre os pacientes artríticos, aqueles que se tornarão resistentes ao tratamento com MTX (PERES et al., 2015). Pacientes artríticos que apresentam baixa densidade de CD39 nas células T reguladoras periféricas, tornam-se resistentes ao tratamento com MTX. Apesar de ainda não estar sendo utilizado na clínica, essa medida parece ser um método rápido, conveniente e confiável para detectar a resistência ao MTX, dando, então, oportunidade de encaminhar o paciente imediatamente para outros tipos de terapia (PERES et al., 2015).

Os AINHs são utilizados para controle da inflamação e podem reduzir a dor na maioria dos casos. Existem várias classes terapêuticas de AINHs, mas não existem estudos que demonstrem, com segurança, a superioridade de alguma delas (BIANCHI, 2012). A escolha ocorre em função do perfil do paciente, comorbidades e/ou intolerâncias e hipersensibilidades. Recomenda-se usar doses menores e pelo menor tempo possível, avaliando seus efeitos adversos (BIANCHI, 2012). Os corticosteroides são geralmente usados em doses anti-inflamatórias, sendo a prednisona, ou sua forma terapêuticamente ativa, a prednisolona, os derivados mais utilizados. Em casos de evolução grave da doença, com envolvimento extra-articular, são utilizadas doses maiores de corticosteroides, visando sua ação imunossupressora (BIANCHI, 2012).

Drogas biológicas anti-TNF- α vêm sendo adotadas após ineficácia da terapia da AR com DMARDs sintéticas, intolerância, ou em casos de pior prognóstico, como erosão precoce, altos títulos de FR e/ou de autoanticorpos contra peptídeos (e

proteínas) citrulinados cíclicos (anti-CCP), grande número de articulações acometidas ou envoltimentos extra-articulares (BIANCHI, 2012). O início da terapia biológica da AR e de outras doenças reumáticas, como artrite psoriática e espondilite anquilosante, é geralmente instituído com drogas anti-TNF- α (LAZZERINI et al., 2016; GARNER et al., 2014; MENDONÇA et al., 2012).

Atualmente, cinco drogas bloqueadoras de TNF- α estão aprovadas para o tratamento de pacientes com AR; três anticorpos monoclonais: infliximabe, adalimumabe e golimumabe; o receptor recombinante de TNF- α , etanercepte; e o certolizumabe (Pegol) (LAZZERINI et al., 2016; BRZUSTEWICZ e BRYL, 2015), este um fragmento Fab humanizado conjugado com polietilenoglicol (LAZZERINI et al., 2016; THALAYASINGAM e ISAACS, 2011; TAYLOR, 2010). As cinco drogas anti-TNF- α se ligam ao sTNF e ao mTNF, resultando na diminuição da população celular em locais de inflamação, por meio da indução de apoptose, diminuição do influxo ou aumento do efluxo de células inflamatórias, ou por citotoxicidade direta (ATZENI et al., 2013; TAYLOR, 2010). A apoptose pode ser consequência da ausência de sinais de sobrevivência do sTNF ou da reação cruzada de mTNF com as drogas anti-TNF- α (TAYLOR, 2010). Os estudos *in vitro* sobre PBMCs humanas mostraram que infliximab e adalimumab aumentam a quantidade de células em apoptose, ao passo que o etanercept o faz em menor grau e o certolizumabe carece completamente desta propriedade. Assim, apesar do efeito anti-TNF- α ser comum a estas drogas, além de estruturas e propriedades farmacocinéticas distintas, elas também possuem ações distintas (ATZENI et al., 2013; AGARWAL, 2011).

Por sua vez, além da reumatologia e oncologia, as drogas biológicas vêm sendo empregadas no tratamento de doenças infecciosas, hemostáticas e na rejeição de transplantes (ELVIN et al., 2013). Novas drogas desse tipo chegam ao mercado a cada ano. Atualmente, pelo menos três desses medicamentos biológicos já integram a lista dos dez blockbuster da indústria farmacêutica em todo o mundo (ANDERSON, 2016). Coincidentemente, o desenvolvimento dos medicamentos biológicos ocorre exatamente no contexto de rápidas e profundas mudanças negativas no ambiente de negócios da indústria farmacêutica, redução generalizada da produtividade de pesquisa e desenvolvimento, crises fiscais associadas a pressões de governos para redução dos custos com saúde, maior rigor para aprovação de novas drogas e pressão dos medicamentos genéricos (ELVIN et al., 2013). Neste sentido, os medicamentos biológicos são vantajosos para os grandes oligopólios farmacêuticos, pois são

moléculas bem mais complexas e caras, muito mais lucrativas e difíceis de copiar do que as drogas sintéticas correntes. Também, contribui significativamente com esses interesses da indústria, a costumeira política agressiva de persuasão efetuada pelos seus representantes comerciais junto à classe médica.

Por outro lado, contrariando esses interesses, estudos que avaliam os riscos do uso do tratamento com fármacos anti-TNF biológicos mostram, consistentemente, que estes estão associados a um maior risco de infecções graves da pele, tecidos moles e articulações (ATZENI et al., 2015; ATZENI et al., 2013; RAMIRO et al., 2014) e infecções oportunistas graves (ATZENI et al., 2015; CURTIS et al., 2011; BONGARTZ et al., 2006) em comparação com as tradicionais DMARDs utilizadas no tratamento da AR (SINGH et al., 2015; CURTIS et al., 2011; CURTIS et al., 2010; ASKLING et al., 2007), além de maior risco de ocorrência de neoplasias malignas (BONGARTZ et al., 2006).

1.5. Drogas sintéticas anti-TNF- α

A PTX (Trental e Sanofi, Aventis Farmacêutica; Pentox, Farmasa; Pentoxin, Teuto; Trentafilina, Sigma Pharma; Pentoxifilina, Medley e Apotex Inc), o ROL (Rolipram, Schering AG), a RUP (fumarato de rupatadina, Rupafin, Biosintetica Farmacêutica; Rinialer, J. Uriach&Cia) e a TAL (Talidomida, FUNED) são reconhecidos como drogas que agem em diferentes etapas da síntese de TNF- α . Porém, não há estudos clínicos sobre a RUP e o ROL na AR. Por outro lado, existem apenas 6 estudos clínicos, todos com mais de 15 anos, que avaliam as possíveis ações antiartríticas da TAL (SCOVILLE, 2001; KEESAL et al., 1999; SCOVILLE e READING, 1999; LEE et al., 1997; GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ et al., 1989; GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ, 1984) e outros 6 estudos clínicos com a PTX, sendo dois deles nos últimos 4 anos (BUBLIKOV et al., 2016; MOHAMMED et al., 2013; USHA et al., 2002; DUBOST et al., 1997; ISHII et al., 1997; MAKSYMOWYCH et al., 1995).

Como é bem conhecido e convencionado, muitos e diversificados aspectos de eficácia, mecanismo de ação e segurança são avaliados em animais de experimentação antes da aplicação de uma dada droga em seres humanos, e essas avaliações continuam mesmo após sua aprovação. Na fase pré-clínica, após a identificação do potencial terapêutico em experimentações *in vitro*, a molécula de interesse é aplicada em animais; passa-se então ao ensaio clínico, o qual é ainda dividido em 4 fases. Na

Fase 1, é realizado o primeiro estudo em seres humanos, em pequenos grupos de 20 a 100 voluntários sadios; na Fase 2 são realizados estudos controlados em 100 a 500 pacientes para avaliar a efetividade da medicação; na Fase 3 é realizado um estudo terapêutico de larga escala, com 1000 a 5000 pacientes de diferentes populações; já a Fase 4, ou de farmacovigilância, ocorre após aprovação para comercialização do produto e é caracterizada pelo monitoramento dos efeitos do medicamento (QUENTAL e SALLES FILHO, 2006).

Dentre os estudos clínicos com a PTX, Maksymowych e colaboradores (1995) avaliaram 19 pacientes, Dubost e colaboradores (1997) avaliaram 21 pacientes, Ishii e colaboradores (1997) avaliaram 1 paciente, Usha e colaboradores (2002) avaliaram 53 pacientes, Mohammed e colaboradores (2013) avaliaram 49 pacientes, Bublikov e colaboradores (2016) avaliaram 101 pacientes. Dentre os estudos clínicos com a TAL, Gutiérrez-Rodríguez (1984) avaliou 7 pacientes, Gutiérrez-Rodríguez e colaboradores (1989) avaliaram 17 pacientes, Lee e colaboradores (1997) avaliaram 12 pacientes, Keesal e colaboradores (1999) avaliaram 10 pacientes, Scoville e Reading (1999) avaliaram 31 pacientes e Scoville (2001) avaliou 25 pacientes. No geral, com esse número amostral, e uma vez que abordam parâmetros isolados e aleatórios, tais investigações sequer constituem um estudo sistematizado de Fase 1.

A PTX ($C_{13}H_{18}N_4O_3$), nomenclatura oficial IUPAC: 3,7-dimetil-1-(5-oxohexil)purina-2,6-dione (National Center for Biotechnology Information, 2017a), parece suprimir a produção de TNF- α bloqueando a transcrição do gene desta citocina em macrófagos e leucócitos murinos e humanos (NEVES et al., 2015; ZHANG et al., 2010; KRETH et al., 2010; WEINBERG et al., 1992; HAN et al., 1991; THIEL et al., 1991), além de aumentar os níveis intracelulares de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) em macrófagos de ratos, inibindo a produção de TNF- α por essas células (CORRÊA, 2008; SZTRYMF et al., 2004). Outro mecanismo de ação proposto para a PTX consiste na inibição da produção de outras citocinas/quimiocinas por inibição direta ou indireta do TNF- α em humanos (NEVES et al., 2015; KRETH et al., 2010). Há relatos de que a PTX inibe a ativação de neutrófilos murinos e humanos, incluindo adesão, quimiotaxia e liberação de oxidante *in vitro* (ZHANG et al., 2010; BESSLER et al., 1986). Clinicamente, a PTX tem sido utilizada para atenuar processos inflamatórios, com efeitos inibitórios detectados sobre a IL-1 β , IL-6, IL-8, interferon (IFN)- γ e IL-2 (ZHANG et al., 2010; CORRÊA, 2008; NEUNER et al., 1994), angiogênese e modulação da resposta tipo Th2, responsável pela

produção de IL-4, IL-5, IL-13, IL-12 e TNF- α (PÓVOA, 2008; BIENVENU et al., 1995). Foi relatado que a PTX inibe a produção de TNF- α em macrófagos murinos (MARCINKIEWICZ et al., 2000) e em células sinoviais de pacientes AR, neste caso inibindo o desenvolvimento de *pannus* de forma dose-dependente (MORIUCHI et al., 1998). A PTX tem mostrado eficácia sobre a artrite experimental em ratos (PAL et al., 2016b; MOHAMED et al., 2014; QUEIROZ-JUNIOR et al., 2013; SILVA et al., 2000) e camundongos (TISSI et al., 1999). Os estudos da PTX no tratamento de pacientes AR (BUBLIKOV et al., 2016; MOHAMMED et al., 2013; USHA et al., 2002; ISHII et al., 1997; MAKSYMOWYCH et al., 1995) sugerem um potencial efeito antirreumático (ISHII et al., 1997; USHA et al., 2002). Dentre as drogas propostas no presente estudo, até o momento a PTX é a que foi avaliada em maior número de pacientes (244) em estudos clínicos (BUBLIKOV et al., 2016; MOHAMMED et al., 2013; USHA et al., 2002; DUBOST et al., 1997; ISHII et al., 1997; MAKSYMOWYCH et al., 1995), nenhum desses estudos efetivamente conclusivo em recomendar o uso da PTX no tratamento da AR.

A TAL ($C_{13}H_{10}N_2O_4$), nomenclatura oficial IUPAC: (RS)-2-(2,6-dioxopiperidina-3-il)-1H-isindol-1,3(2H)-diona (National Center for Biotechnology Information, 2017b), já mostrou efeitos imunomoduladores e anti-inflamatórios efetivos e está sendo testada em humanos para diversas condições inflamatórias como espondilite anquilosante (DENG et al., 2013; MAGALHÃES et al., 2006; TSENG et al., 1996), artrite idiopática juvenil (SATHE e KHUBCHANDANI, 2013), eritema nodoso leproso, lúpus eritematoso cutâneo, entre outras (MAGALHÃES et al., 2006; COMBE, 2001; TSENG et al., 1996). Há relatos consistentes de que a TAL inibe a síntese de TNF- α *in vitro* e *in vivo* (PÓVOA, 2008; CAMUSSI e LUPIA, 1998), aumentando a degradação do mRNA do TNF- α , com consequente inibição da produção dessa citocina em humanos e roedores (ALEXANDRE-MOREIRA et al., 2005; LUNA, 2005). Também, tem sido relatada a ação anti-angiogênica da TAL, reduzindo a formação de novos vasos sanguíneos que contribuiriam com a progressão da AR em humanos e roedores (REWATKAR et al., 2010; SZEKANECZ et al., 2010; SZEKANECZ e KOCH, 2009). Em macrófagos peritoneais de camundongos incubados com TAL foi observada marcada inibição do RNA de TNF- α induzido por lipopolissacarídeo (LPS) (ALEXANDRE-MOREIRA et al., 2005). Em células eritróides progenitoras da medula óssea de ratos CIA, a TAL diminuiu a porcentagem apoptótica (LIU et al., 2008). Não houve diminuição de TNF- α em leucócitos de rato

estimulados com LPS (OLIVER et al., 1999). Em monócitos de pacientes AR e sadios tratados com TNF- α ou TNF- α +TAL, a TAL inibiu a translocação citoplasmática da proteína intracelular de alta mobilidade de grupo caixa-1 (HMGB1) causada pelo TNF- α (ZUO et al., 2008). Entre os estudos avaliando a TAL no tratamento da artrite experimental em ratos (RAO et al., 2010; ALEXANDRE-MOREIRA et al., 2005; OLIVER et al., 1999; OLIVER et al., 1998) e camundongos (HAUSCHILD et al., 1997; KRÖGER et al., 1996), apenas um apontou efeitos negativos (OLIVER et al., 1999). Sobretudo, alguns dos ensaios clínicos já feitos com essa droga no tratamento da AR indicaram efeitos benéficos (GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ et al., 1989; GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ, 1984), mas é opinião generalizada que há a necessidade de mais avaliações (SCOVILLE et al., 2001; KEESAL et al., 1999; SCOVILLE e READING, 1999; LEE et al., 1997). Como é de amplo conhecimento, a TAL foi sintetizada inicialmente como sedativo e seu efeito teratogênico (BASTOS, 2013; PÓVOA, 2008) causou um dos maiores desastres da história da medicina (BASTOS, 2013; MARRIOTT et al., 1999). Obviamente, a droga não é prescrita para mulheres gestantes e só pode ser recomendada, sob estrito controle, nas mulheres em fase reprodutiva. Os efeitos adversos, descritos no tratamento da AR humana com a TAL, incluem sonolência (LEE et al., 1997; GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ et al., 1989; GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ, 1984), constipação (SCOVILLE e READING, 1999; GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ et al., 1989; GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ, 1984), neuropatia periférica (SCOVILLE e READING, 1999; LEE et al., 1997), inchaço duro dos membros inferiores, eritema da face, membros com prurido local ou sensação de queimação, perda de cabelo, tosse, obstrução nasal, febre e ressecamento da pele e mucosas (GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ et al., 1989), espessura dos membros inferiores (GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ, 1984), tremores e erupções cutâneas (LEE et al., 1997).

O ROL ($C_{16}H_{21}NO_3$), nomenclatura oficial IUPAC: 4-(3-ciclopentiloxi-4-metoxifenil) pirrolidina-2-1) (National Center for Biotechnology Information, 2017c), inibe a síntese de TNF- α em células mononucleares murinas e humanas (NYMAN et al., 1997; PRABHAKAR et al., 1994; SEMMLER et al., 1993), além de ser bem conhecido como um inibidor específico de fosfodiesterase (PDE) do tipo 4 (PDE4) em roedores e humanos (DOSEYICI et al., 2014; SHENOY e AGARWAL, 2010; LUNA, 2005; HARTMANN et al., 2000; PRABHAKAR et al., 1994). O ROL inibe o mRNA do TNF- α a nível pós-transcricional em roedores e humanos (LUNA, 2005),

além de suprimir a produção de INF- γ em roedores e primatas em geral (SHENOY e AGARWAL, 2010; LUNA, 2005; YAMAKI et al., 2004). O ROL foi originalmente concebido como uma droga antidepressiva (HARTMANN et al., 2000; NYMAN et al., 1997) e, posteriormente, foi aventado seu potencial terapêutico em doenças dependentes de TNF- α , mais especificamente na encefalomielite autoimune experimental em ratos (SOMMER et al., 1995) e em primatas não humanos (GENAIN et al., 1995). Em ensaios *in vitro*, em macrófagos ativados e células polimorfonucleares de camundongos, o ROL inibiu a produção de TNF- α após estímulo com LPS (KORHONEN et al., 2013). Em células do baço e nódulos linfáticos de camundongos cultivadas com colágeno tipo II, ROL suprimiu a resposta de células T auxiliares tipo 1 (OZEGBE et al., 2004). Estudos que avaliaram o efeito do ROL em células humanas constataram a redução dos níveis de TNF- α em monócitos (CHITTA et al., 1998) e linfócitos (CHO et al., 2004) estimulados com LPS, monócitos da membrana sinovial reumatoide (MCCANN et al., 2010), co-cultura de células T e macrófagos (CHITTA et al., 1998), monócitos (FOEY et al., 2003), macrófagos (FOEY et al., 2003; KASYAPA et al., 1999), células T derivadas de sangue periférico (FOEY et al., 2003) e PBMCs (SONG et al., 2013a), além da modulação da resposta de células T (CHO et al., 2004; FOEY et al., 2003; KASYAPA et al., 1999). Em sinoviócitos mistos de pacientes com osteoartrite e AR (JENEI-LANZL et al., 2015) e em células do tecido sinovial reumatoide (MORIUCHI et al., 1998) foram observados bons resultados anti-inflamatórios do ROL (JENEI-LANZL et al., 2015) e a inibição do desenvolvimento de *pannus* de forma dose-dependente, com inibição do TNF- α (MORIUCHI et al., 1998). Também, já existem evidências de que ROL melhore a artrite experimental em ratos (PAL et al., 2016a; THABET et al., 2016; FRANCISCHI et al., 2000; LAEMONT et al., 1999; NYMAN et al., 1997; SEKUT et al., 1995) e camundongos (YAMAKI et al., 2007; YAMAKI et al., 2004; ROSS et al., 1997). Sabe-se que sua ação é 500 vezes mais potente em comparação a PTX na supressão de TNF- α (LUNA, 2005; HARTMANN et al., 2000). Como já mencionado, não há relatos de ensaios clínicos sobre o ROL no tratamento da AR.

A RUP (C₂₆H₂₆C₁N₃), nomenclatura oficial IUPAC: 8-cloro-11-[1-[(5-metilpiridin-3-il)metil]piperidin-4-ilidene]-5,6-dihidrobenzo[1,2]ciclohepta[2,4-b]piridina (National Center for Biotechnology Information, 2017d), é classicamente um anti-histamínico com elevada afinidade ao receptor H1, possuindo potente ação inibidora

do fator de ativação plaquetária (PAF) e efeitos anti-inflamatórios em humanos (MULLOL et al., 2015; SHAMIZADEH et al., 2014; CHURCH, 2010; VASIADI et al., 2010; KATIYAR e PRAKASH, 2009; MULLOL et al., 2008), provavelmente por meio da inibição da secreção de mediadores pró-inflamatórios como a IL-6, IL-8, IL-10, IL-13 e TNF- α em mastócitos, linfócitos ativados (GRZELEWSKA-RZYMOWSKA e GÓRSKI, 2011) e outras células imunes (VASIADI et al., 2010) humanas. Não há estudos, *in vitro* ou *in vivo*, sobre o tratamento da AR experimental utilizando a RUP, assim como não há, conforme previamente mencionado, nenhum ensaio clínico que tenha avaliado seu efeito no tratamento dessa doença.

No contexto dos efeitos adversos dessas drogas, não há menção de algum para a PTX nos relatos disponíveis sobre seu emprego no tratamento na AR em modelos experimentais (PAL et al., 2016b; MOHAMED et al., 2014; QUEIROZ-JUNIOR et al., 2013; VALE et al., 2004; ABDEL-SALAM et al., 2003; SILVA et al., 2000; TISSI et al., 1999; SINGH et al., 1997) e clínicos (BUBLIKOV et al., 2016; MOHAMMED et al., 2013; USHA et al., 2002; DUBOST et al., 1997; ISHII et al., 1997; MAKSYMOWYCH et al., 1995). Quanto ao uso do ROL no tratamento da AR, os raros estudos se restringem a modelos experimentais em ratos e camundongos (PAL et al., 2016a; THABET et al., 2016; JIANG et al., 2015; KORHONEN et al., 2013; MCCANN et al., 2010; YAMAKI et al., 2007; YAMAKI et al., 2004; FRANCISCHI et al., 2000; LAEMONT et al., 1999; NYMAM et al., 1997; ROSS et al., 1997; SINGH et al., 1997; SEKUT et al., 1995) e um desses estudos descreve que camundongos tratados com ROL exibiram uma imobilidade aumentada e redução da locomoção, fatores associados à letargia. Não existem estudos da RUP na AR em animais ou humanos. No que se refere aos efeitos adversos de TAL e ROL estes, inclusive, podem ser considerados até menos nocivos que os efeitos colaterais dos medicamentos biológicos. De fato, o reposicionamento de fármacos já existentes e associações terapêuticas, como é o caso da proposta do presente estudo, têm a vantagem de reduzir o custo e o tempo da pesquisa, pois a droga utilizada já passou por testes toxicológicos e, em geral, os efeitos adversos conhecidos das drogas selecionadas para o reposicionamento não podem obviamente incluir aqueles que potencializam a doença que é o alvo do reposicionamento.

Como é uma droga comumente utilizada cronicamente no tratamento da AR (BIJLSMA et al., 2015; CAPORALI et al., 2015; CAPORALI et al., 2013), inclusive em etapa prévia da infusão com drogas biológicas (SCHIAPPAPIETRA et al., 2015;

CAPORALI et al., 2015), e ter efeito comprovado nos pacientes com a doença (CAPORALI et al., 2015; CAPORALI et al., 2013; BIANCHI, 2012), a prednisolona é utilizada aqui como droga padrão, por um lado visando comparar sua ação antiartrítica com a das drogas sob estudo e por outro avaliar se sua ação poderia influenciar a ação antiartrítica dessas drogas.

Enfim, considerando-se o conhecimento prévio dos efeitos adversos e das medidas de segurança para minimizá-los, do ponto de vista da importância do envolvimento da síntese de TNF- α na AR, é intrigante que nem todas as características do potencial antiartrítico de PTX, TAL, ROL e RUP tenham sido exploradas sistematicamente e com a devida profundidade em modelos animais, de modo a consubstanciar sua posterior indicação formal para ensaios clínicos, visando seu possível reposicionamento na terapêutica dessa doença. Então, sendo essas drogas sintéticas potencialmente inibidoras de TNF- α , seriam elas realmente pouco eficazes nas doenças autoimunes, ou estariam “esquecidas” como alternativas terapêuticas em estudos esparsos realizados num passado carente de conhecimentos e técnicas consolidadas para uma avaliação experimental mais refinada e segura, com maiores dificuldades para um controle mais eficaz de seus eventuais efeitos colaterais e, em geral, para o enfrentamento dessas doenças?

1.6. Avaliação macroscópica do grau de artrite em ratos

Uma classificação do grau de artrite experimental correntemente aceita baseia-se na metodologia de Erlandsson-Harris e colaboradores (1997), onde é atribuída uma pontuação segundo o inchaço macroscopicamente observável em cada pata do animal, sendo 1 ponto para inchaço detectável em um tipo de articulação, 2 para inchaço em 2 tipos de articulação, 3 para inchaço em 3 tipos de articulação e 4 para inchaço severo em toda pata. As medidas são realizadas somente nas patas posteriores. Assim sendo, a pontuação máxima para cada animal é 8. Adicionalmente, os aspectos de eritema e cianose também são considerados.

1.7. Avaliação laboratorial de rotina para pacientes de AR

Muitos estudos têm sido feitos para aprimorar a avaliação da AR em pacientes (CURTIS et al., 2012). Dentre os parâmetros laboratoriais rotineiros para acompanhar a doença e a eficiência de seu tratamento, os utilizados no presente estudo compreendem:

1- Hemograma, o qual é considerado uma das avaliações laboratoriais de maior abrangência e significado clínico, consistindo na contagem de hemácias e plaquetas, contagem diferencial de leucócitos (em linfócitos, monócitos e granulócitos), determinação da hemoglobulina e hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (VCM), concentração celular média de hemoglobina em uma hemácia (MCH) e concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) (FISCHBACH, 2005; LIMA et al., 1977).

2- Anticorpo antinuclear (ANA) é aquele mais frequentemente rastreado para pesquisa de autoanticorpos em pacientes suspeitos de doenças reumáticas sistêmicas, como AR, lúpus eritematoso sistêmico, espondilite anquilosante, etc (YANG et al., 2016; GARCÍA-DE LATORRE e GARCÍA-VALLADARES, 2015). O soro de pacientes acometidos com essas doenças contém diversos anticorpos, entre os quais os dirigidos contra o DNA, a nucleoproteína histona e contra outros antígenos nucleares solúveis, sendo esses então coletivamente denominados de anticorpos ou fatores antinucleares (MILLER e GONÇALVES, 1999).

3- Fator Reumatoide (FR) aparece no soro de 70 a 80% dos pacientes com AR (BRZUSTEWICZ e BRYL, 2015). O soro (ISHIKAWA et al., 2017; BRZUSTEWICZ e BRYL, 2015) e, também, o líquido sinovial (ALETAHA e BLÜML, 2016) desses pacientes contém anticorpos especiais anti-IgG, que constituem o FR (ISHIKAWA et al., 2017; ALETAHA e BLÜML, 2016; BRZUSTEWICZ e BRYL, 2015).

1.8. Hepatotoxicidade na triagem de novos esquemas terapêuticos

Vários fármacos têm sido implicados na etiopatogenia de lesões hepáticas (DELGADO et al., 1999). Os efeitos benéficos esperados dos medicamentos empregados rotineiramente na clínica podem ser limitados devido às reações colaterais indesejáveis (BERTOLAMI, 2005), especialmente a agressão ao fígado. A lesão hepática causada por droga pode enganosamente parecer relativamente rara no contexto das doenças hepáticas. Todavia, são frequentes em centros de referência para doenças do fígado e contribuem significativamente para a mortalidade por esse tipo de doença, sendo também a causa principal de remoção de drogas do mercado, após as fases clínica e pós-clínica (PARANÁ e WAKSMAN, 2011).

Como principal órgão metabolizador e detoxificador, o fígado está potencialmente sujeito a danos por uma grande variedade de substâncias. A lesão pode ser resultante

de toxicidade direta, conversão hepática de um xenobiótico em uma toxina ativa, ou por meio de mecanismos imunes gerados por uma droga ou metabólito atuando como um hapteno para converter uma proteína celular em um imunógeno. O dano hepático se reflete geralmente em alterações bioquímicas, transitórias ou persistentes (DELGADO et al., 1999), podendo ter característica hepatocelular, o que se traduzirá por aumento das transaminases de aspartato e alanina (AST e ALT, respectivamente), ou colestático, o que levará ao aumento de bilirrubinas (particularmente da direta), da fosfatase alcalina e da gama-glutamil transferase (BERTOLAMI, 2005). Para avaliar o dano causado por medicamentos utilizam-se marcadores de lesão hepática, dentre eles as transaminases (BERTOLAMI, 2005; KUMAR et al., 2004).

As transaminases (ou aminotransferases) compõem um grupo de enzimas que catalisam a interconversão de aminoácidos e alfa-cetoácidos por transferência de grupos amino (MILLER e GONÇALVES, 1999), com duas representantes de interesse clínico: a aspartato-transaminase, também conhecida como glutâmico-oxalacética ou TGO, e a alanina-transaminase, também denominada glutâmico-pirúvica ou TGP (MILLER e GONÇALVES, 1999). A atividade dessas enzimas é amplamente utilizada para avaliar danos hepatocelulares causados por medicamentos, lesões hepáticas ou cardíacas provocadas por infarto do miocárdio ou infecções, já que após esses eventos várias enzimas, incluindo as aminotransferases, são liberadas das células lesadas e passam para a corrente sanguínea (SILVA, 2015; HUANG et al., 2012). As transaminases são enzimas produzidas principalmente no tecido hepático e que permanecem nesse local em grande quantidade (SALINA, 2013; BURTIS e ASHWOOD, 2005; MILLER e GONÇALVES, 1999). Estas enzimas são liberadas na circulação sanguínea quando há danos ao hepatócito e, por isso, podem ser utilizadas como parâmetros indiretos para a determinação desses danos (SALINA, 2013). A AST está presente em grandes quantidades também no tecido muscular e cardíaco e, dessa forma, não é específica para diagnosticar hepatotoxicidade, sendo necessária a mensuração conjunta com a ALT. Caso haja aumento concomitante na ALT e AST, a origem do dano provavelmente é hepática (SILVA, 2015; SALINA, 2013; BURTIS e ASHWOOD, 2005).

1.9. Alterações ósseas densitométricas e histológicas na AR

A remodelação óssea ocorre principalmente por ação dos osteoblastos (responsáveis pela síntese óssea) e osteoclastos (responsáveis pela reabsorção óssea) (PACCOU et al., 2014; SCHETT e GRAVALLESE, 2012). Na AR há mudanças fundamentais no processo de remodelação óssea que potencialmente podem levar a alterações ósseas estruturais (PACCOU et al., 2014; ABDULGHANI et al., 2009). Sabe-se, também, que o TNF- α atua sobre o metabolismo ósseo na AR, já que essa citocina promove diretamente a diferenciação de osteoclastos, estimula a produção de RANKL por osteoblastos, fibroblastos e células T, aumentando assim a proliferação de osteoclastos, além de inibir indiretamente a proliferação de osteoblastos (MANARA e SINIGAGLIA, 2015). Estudos demonstram a redução na densidade mineral óssea em modelo animal de AR (com camundongos BALB/c) (ABDULGHANI et al., 2009) e em pacientes com AR (KOCIJAN et al., 2014; ZHU et al., 2014; ZHU et al., 2013; PÉREZ-EDO et al., 2002).

A densidade mineral óssea, quantificada por raios X convencional, é um exame de primeira linha na investigação da AR (BAKER et al., 2015; VASANTH et al., 2013; MOTA et al., 2012) e se tornou indispensável (MOTA et al., 2012), já que as alterações radiográficas fazem parte dos critérios diagnósticos e de monitoramento da progressão da doença (BAKER et al., 2015; VASANTH et al., 2013; MOTA et al., 2012). Além disso, o exame tem relativamente baixo custo e disponibilidade praticamente universal (BAKER et al., 2015; VASANTH et al., 2013; MOTA et al., 2012).

Uma variedade de alterações histológicas pode ocorrer na membrana sinovial de pacientes AR (ROONEY et al., 1988). Estas incluem proliferação e espessamento da camada do revestimento sinovial, aumento da vascularização e infiltração de linfócitos T e B e macrófagos (BAETEN et al., 2000; ROONEY et al., 1988). A avaliação histológica fornece informações sobre a gravidade da doença (ROONEY et al., 1988) e sobre resultados de seu tratamento. No modelo CIA em ratos algumas dessas alterações também já foram evidenciadas (KIM e KANG, 2015; YAMASAKI et al., 2012; HITCHON e EL-GABALAWY, 2011; KNOERZER et al., 1997).

Objetivos

2.1. Gerais

Por meio do modelo CIA, avaliar TAL, ROL, RUP e PTX, administrados individualmente ou associados, como alternativas ou complementos terapêuticos para a AR.

2.2. Específicos

2.1. Obtenção de valores de hemograma, massa corporal, densitometria mineral óssea, ALT e AST no plasma, APB na fração solúvel (FS) de tecido sinovial (TS) e de PBMCs, TNF- α no plasma, IL-1 β e IL-6 no soro e líquido sinovial (LS), bem como ANA e FR no soro de ratos saudáveis e CIA (selecionados pela presença de cianose, eritema e significativo aumento da espessura, ou tumescência, da região plantar em ambas as patas traseiras).

2.2. Medidas dos parâmetros alterados de AR em relação a C-S, além de hemograma, massa corporal, ALT e AST no plasma nos animais CIA tratados com PTX, TAL, ROL e RUP, e combinações de interesse com essas quatro drogas e com o anti-inflamatório padrão (prednisona) administrado de forma aguda e crônica.

2.3. Seleção dos tratamentos com eficiência na diminuição da tumescência das patas traseiras, independente de prednisona, e realização de análise histológica das patas posteriores e medidas dos parâmetros alterados de AR em relação a C-S, além de hemograma, massa corporal, ALT e AST no plasma.

2. Estratégias de estudo

I. Indução de CIA, já sabendo que cerca de 70% desenvolvem o grau de artrite aqui convencionado, com pontuação de 6 a 8, segundo classificação pelo grau de espessura da região plantar das patas traseiras (ERLANDSSON-HARRIS et al., 1997) e com presença de eritema e cianose. Estes são subdivididos em AR, TAL, ROL, RUP, PTX, MIX (TAL+ROL+RUP+PTX), PRED AG e PRED CR e MIX tratado com PRED AG (MIX+PRED AG) ou PRED CR (MIX+PRED CR) e injeção de salina 0,9% nas mesmas condições da indução (C-S).

Figura 1 - Esquema sumário geral do protocolo experimental adotado no presente estudo.

II. Subdivisão dos grupos para tratamento, conforme mostra a Figura 1:

a. Administração, por 30 dias, *bolus*, da talidomida, no dorso, por via subcutânea (s.c.), na dose de 30 mg / kg, em volume máximo de 200 µL/animal, em animais artríticos (TAL). Esta dose foi utilizada em linhagem Lewis com bom

resultado no tratamento de encefalomielite autoimune (CORRÊA, 2008) e em linhagem Wistar, reduzindo a carcinogênese mamária (PÓVOA, 2008);

b. Administração, por 30 dias, *bolus*, do rolipram, no dorso, por via s.c., na dose de 3 mg / kg, em volume máximo de 200 µL/animal, em animais artríticos (ROL). Esta dose foi utilizada (via oral) em linhagem Holtzman para diminuição do TNF- α na artrite induzida por adjuvante (FRANCISCHI et al., 2000) e em linhagem Dark Agouti para diminuir a artrite induzida por CII (NYMAN et al., 1997);

c. Administração, por 30 dias, de pentoxifilina, por gavagem, via oral, na dose de 100 mg / kg, em volume máximo de 600 µL/animal, em animais artríticos (PTX). Esta dose foi utilizada em linhagem Sprague–Dawley via intraperitoneal (i.p.) para diminuição de lesão pulmonar gerada pela exposição ao foscênio em cabine de ar (ZHANG et al., 2010) e em linhagem Lewis via i.p. com bom resultado no tratamento de encefalomielite autoimune (CORRÊA, 2008);

d. Administração, por 30 dias, de rupatadina, por gavagem, via oral, na dose de 0,0285 mg / kg, em volume máximo de 600 µL/animal, em animais artríticos (RUP). Esta dose foi utilizada (via oral) para tratar rinite alérgica em pacientes humanos (MARMOUZ et al., 2011);

e. Administração, por 30 dias, do mix com as drogas: talidomida, rolipram, rupatadina e pentoxifilina, nas doses e vias descritas nos itens anteriores (MIX);

f. Administração, por 30 dias, de prednisolona, por gavagem, via oral, na dose de 5 mg / kg, em volume máximo de 600 µL/animal, em animais artríticos (PRED CR). Esta dose foi utilizada (via oral) em linhagem Wistar para tratar a artrite induzida por adjuvante (KUNCHA et al., 2014);

g. Administração aguda (única), de prednisolona, por gavagem, via oral, na dose de 60 mg / kg, em volume máximo de 6 mL/animal, em animais artríticos (PRED AG). Esta dose foi utilizada (via oral) para tratar asma aguda em crianças (STORR et al., 1987);

h. Administração, por 30 dias, de prednisolona juntamente com coquetel das drogas PTX, ROL, RUP, TAL (MIX+PRED CR), nas mesmas vias e doses supracitadas;

i. Administração aguda (única) de prednisolona e administração por 30 dias do coquetel de PTX, ROL, RUP, TAL (MIX+PRED AG), nas mesmas vias e doses supracitadas.

III. Administração por 30 dias com salina 0,9%, no dorso via s.c. e de água de torneira, por gavagem, respectivamente em volumes máximos de 200 e 600 μL /animal, em artríticos (AR), e controles (C-S);

IV. Sob anestesia, quantificação da espessura plantar das patas posteriores com paquímetro, coleta de sangue, retirada de líquido e tecido sinovial da articulação tíbio-tarsal da pata posterior esquerda e, após eutanásia, amputação da pata posterior direita;

V. Densitometria óssea das patas posteriores;

VI. Obtenção de plasma, soro e células mononucleares;

VII. Hemograma em amostras individuais de sangue total em Counter (Auto Hematology Analyzer BC 2800 Vet, Mindray);

VIII. Fracionamento do tecido sinovial e das células mononucleares para obtenção de fração solúvel (FS);

IX. Medidas de proteína total e aminopeptidase básica (APB) na FS do tecido sinovial e das células mononucleares;

X. Medidas de $\text{TNF-}\alpha$, ALT e AST do plasma, FR e ANA no soro e de $\text{IL-1}\beta$ e IL-6 no soro e líquido sinovial e análise histológica da pata direita posterior;

XI. Identificação dos parâmetros diferenciais entre AR e C-S;

XI. Seleção dos tratamentos efetivos sobre os parâmetros diferenciais entre AR e C-S;

XII. Avaliação dos efeitos dos tratamentos efetivos selecionados sobre os parâmetros diferenciais entre AR e C-S.

Figura 2 - Esquema sumário da triagem seletiva da efetividade antiartrítica e da toxicidade dos tratamentos.

3. Material e Métodos

4.1. Animais, tratamentos e amostras

Ratos Wistar pesando 160-180g, fornecidos pelo Biotério do Instituto Butantan, foram mantidos em caixas de polietileno, com no máximo 5 animais por caixa (medidas internas de comprimento x largura x altura = 56 x 35 x 19), com alimento e água *ad libitum*, em estante ventilada (Alesco) com temperatura controlada de 25°C, umidade relativa de 65,3±0,9% e fotoperíodo de 12 h: 12 h, claro: escuro (início do período às 6:00 am). Todos os procedimentos com os animais (indução da artrite, medidas de espessura da pata e massa corporal, tratamento com as drogas e coleta de amostras) foram realizados entre 2:00-5:00 h do período claro (8:00-11:00 h am). Os animais e os protocolos utilizados neste estudo estão de acordo com o CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan sob o protocolo nº1040/13.

4.2. Indução de artrite e tratamentos com as drogas

O processo de indução de artrite foi baseado no método de Chen e colaboradores (2012a). No dia 0, animais foram anestesiados com solução contendo 37,5% de cloridrato de cetamina (100 mg/mL) (Vetaset, Fort Dodge, EUA) e 21,73% de cloridrato de xilazina (23 mg/mL) (Anasedan, Vetbrands, Brasil) em água destilada, da qual foi aplicada, i.p., 2 mL/ kg (75 mg de cloridrato de cetamina/kg e 1 mg de cloridrato de xilazina /kg). Após a anestesia, foi administrado colágeno tipo II (CII de galinha [Sigma, USA]) dissolvido em 0,1 M de ácido acético (2 mg/mL) por 12 horas e emulsificado em igual volume de adjuvante incompleto de Freund (Sigma). Assim, a concentração final do CII administrada foi de 1 mg/mL (preparado a 4°C, imediatamente antes da utilização), em dose única de 100 µL em cada pata posterior, em *bolus*, via intradérmica (i.d.), na almofada da pata, no metatarso, ou alternativamente foi administrada solução de NaCl 0,9%, no mesmo esquema.

No 7º dia após a 1ª administração, a mesma emulsão de CII em adjuvante foi novamente administrada, via i.d. na dose de 100 µL / animal, subdivididos na cauda e em 3 lugares do dorso do animal ou, alternativamente, a mesma solução de NaCl 0,9%, sob o mesmo esquema, em cada grupo respectivo, sob anestesia, como descrito

anteriormente. No 14º dia após a primeira administração da emulsão de CII em adjuvante, os ratos foram avaliados, selecionados e classificados, conforme o sistema de pontuação dos graus de espessura plantar das patas traseiras, baseado naquele proposto por Erlandsson-Harris e colaboradores (1997). No presente estudo, os ratos que compuseram o grupo artrítico (AR) foram somente os de pontuação de 6 a 8, com espessura, eritema e cianose, isto é, cerca de 70% dos animais induzidos. Esses ratos artríticos foram subdivididos em 9 grupos: AR (artrítico sem tratamento); PTX (artrítico tratado com PTX – Pentoxifilina da EMS); ROL (artrítico tratado com ROL - Rolipram da Cayman Chemical Company); TAL (artrítico tratado com TAL - Talidomida da FUNED); e RUP (artrítico tratado com RUP - Rupafin da Biosintética Farmacêutica); MIX (artrítico tratado com coquetel de PTX, ROL, RUP e TAL); PRED AG (artrítico tratado com PRED aguda – Prednisolona da Biosintética); PRED CR (artrítico tratado com PRED crônica); MIX+PRED AG (artrítico tratado com coquetel de PTX, ROL, RUP, TAL e PRED AG); MIX+PRED CR (artrítico tratado com coquetel de PTX, ROL, RUP, TAL e PRED CR). A partir do 14º dia os ratos C-S e AR receberam injeções diárias de 0,2 mL de salina 0,9%, via i.p. e os ratos PTX, ROL, RUP, TAL, MIX, PRED AG, PRED CR, MIX+PRED AG e MIX+PRED CR receberam as drogas respectivas diluídas em água destilada (PRED, RUP e PTX) ou DMSO 2% em água destilada (TAL e ROL), em doses de eleição, especificadas no item 3 (subitem II nas estratégias de estudo), num volume máximo de 0,2 mL, administrado s.c., e de 0,6 mL, administrado via oral por gavagem, em todos os tratamentos crônicos supracitados, além do volume máximo de 6,0 mL na administração da prednisolona aguda, via oral, por gavagem.

Novos agrupamentos foram formados ao longo do estudo, em função das atividades que esses grupos apresentaram. No 45º dia, ao final do tratamento, os animais de cada um destes grupos foram anestesiados, conforme aqui descrito anteriormente, para coleta do material abaixo especificado. As doses das drogas foram selecionadas de acordo com a utilização corrente para tratamento experimental de artrite e/ou outras doenças inflamatórias em ratos, conforme especificado no item 3 (subitem II nas estratégias de estudo).

Os ratos não inseridos em nenhum desses grupos experimentais foram eutanasiados, sob anestesia, por decapitação.

4.3. Coleta de material

Após o período de tratamento, os animais dos respectivos grupos, sob anestesia, foram submetidos à sangria por punção cardíaca com seringas com e sem heparina e seringa com EDTA. Cerca de 6,0 mL de sangue coletado com heparina foi utilizado para o processamento necessário para a obtenção de fração solúvel (FS) de PBMCs e plasma (MENDES, 2012). Aproximadamente 2,0 mL de sangue coletado sem heparina foi deixado por 10 min a 23°C e então centrifugado a 200 X g por 10 min sob a mesma temperatura, para a obtenção de soro, destinado para medida de FR, ANA, IL-1 β e IL-6. Aproximadamente 2,0 mL de sangue coletado com heparina foi centrifugado a 200 X g por 10 min a 4°C, para a obtenção de plasma, destinado para medida de ALT, AST e TNF- α . Cerca de 0,5 mL de sangue total coletado com EDTA foi destinado ao counter para realização do hemograma. O líquido (LS) e o tecido sinovial (TS) foram retirados da articulação tíbio-tarsal da pata posterior esquerda, conforme descrito previamente (MENDES, 2012; YAMASAKI et al., 2012; MENDES et al., 2011), sendo o LS destinado à medida de IL-1 β e IL-6 e a FS de TS e de PBMCs destinada à medida de atividade APB e teor proteico. Em seguida, a pata posterior direita foi desmembrada para obtenção da articulação tíbio-tarsal, destinada ao exame histológico (YAMASAKI et al., 2012). Soro, plasma, líquido sinovial e FS de tecido sinovial e de PBMCs foram armazenados a -20°C e utilizados em até 10 dias. Após esta coleta, os animais, sob anestesia, foram eutanasiados por decapitação.

4.4. Obtenção de PBMCs

Baseado na metodologia de Grage-Griebenow e colaboradores (1997), o sangue heparinizado foi cuidadosamente depositado sobre uma solução de Percoll (densidade = 1,077 g / mL) (GE – Healthcare, USA) com PBS (56%); para cada 5 mL de sangue coletado foi usado 3 mL da solução de Percoll e PBS (56%), sendo centrifugado a 1.000 X g, por 40 min, a 25°C. A camada de PBMCs (segunda faixa de cima para baixo, aspecto esbranquiçado) foi retirada do tubo com pipetas Pasteur e transferida para microtubos identificados para a realização de contagem destas células.

A quantificação do número total de PBMCs foi realizada em alíquotas de 20 μ L de suspensão de células diluídas em líquido de Turk (1:20, v/v), em câmara de Neubauer, ao microscópio óptico (E600, Nikon, Japão).

4.5. Obtenção da FS do TS e de PBMCs

O TS da articulação foi homogeneizado em tampão 10mM Tris-HCl, pH 7,4, (0,1 g de tecido/ 3 mL), por 3 min a 15.000 rpm (Polytron-Aggregate, Kinematica) e ultracentrifugado a 100.000 X g por 35 min (Hitachi modelo HIMAC CP60E). O sobrenadante corresponde a FS.

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

Todos os procedimentos foram realizados a 4°C. As FS foram utilizadas para determinar as atividades de APB e teor proteico.

4.6. Avaliação da artrite e da hepatotoxicidade

4.6.1. Avaliação macroscópica

Foi realizada pela observação dos aspectos de eritema (vermelhidão), cianose (arroxeado) e quantificação da espessura da região plantar com paquímetro (Mitutoyo, EUA), por meio da média das medidas da espessura plantar na região mediana das 2 patas posteriores, aplicando-se a pontuação proposta por Erlandsson-Harris e colaboradores (1997).

4.6.2. Densitometria óssea (BMD)

Os animais foram anestesiados, conforme previamente descrito, sendo utilizado o equipamento *In Vivo* Imaging System FX PRO (Bruker Corporation, Alemanha) para obter as imagens de raios X. Após a aquisição das imagens, a análise densitométrica foi realizada por meio do software Brucker MI (Bruker Corporation, Alemanha). A densidade mineral óssea (g/cm³) foi calculada utilizando a média dos valores das duplicatas obtidas da tíbia e da região plantar em ambas as patas posteriores de cada animal. Para a realização dessa técnica foram utilizados os equipamentos e softwares do Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa da Universidade de São Paulo (CEFAP-USP/ FLUIR) e do Laboratório de Bioquímica do Instituto Butantan.

4.6.3. Análise histológica da articulação tíbio-tarsal

As amostras foram fixadas em formol 10% por uma semana e transferidas para etanol 70% por uma semana. A descalcificação foi realizada em solução de ácido nítrico 10% por 72 horas, fixados em formol 10% por 48 h e desidratado por 1 h em álcool 70%, 1 h em álcool 96% e 1 h em álcool absoluto para total desidratação da amostra. Após a desidratação, as amostras foram deixadas por 2 horas em xilol e, em

seguida, colocadas em um banho de parafina por 3 horas. Os cortes foram realizados em sentido longitudinal, em espessura de 5 micrômetros, para a montagem das lâminas. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina para análise em microscópio óptico. A análise foi realizada com um microscópio Nikon E600 equipado com câmera digital CoolSNAP-PRO®, usando o software Image-Pro Plus® 4.0 (Cybernetics).

4.6.4. Hemograma

Realizado em Counter (Auto Hematology Analyzer BC 2800 Vet, Mindray) com amostras individuais de sangue total coletado com EDTA.

4.6.5. ALT, AST, TNF- α , IL-1 β e IL-6

ALT e AST foram medidas no plasma, usando kits colorimétricos comerciais (Laborclin, Brasil), segundo as recomendações do fabricante. TNF- α foi medido no plasma, enquanto IL-1 β e IL-6 foram medidas no soro e líquido sinovial, usando kit ELISA TNF- α para rato da Merck (Alemanha) e kits ELISA Raybiotech (USA) para IL-1 β e IL-6, segundo as recomendações do fabricante.

4.6.6. FR e ANA

FR e ANA foram medidos no soro, usando kits ELISA comerciais Cusabio (USA) e Mybiosource (USA), respectivamente, segundo as recomendações dos fabricantes.

4.6.7. Atividade APB

Foi medida na FS de tecido sinovial e de PBMCs, em conformidade com metodologia previamente descrita (MENDES, 2012; MENDES et al., 2011).

4.6.8. Teor proteico

Foi medido pelo método de Bradford (1976), com o kit Bio-Rad (Hercules, USA), utilizando triplicatas de 40 μ L de amostras de FS do TS e de PBMCs (diluída 10 vezes), lidas a 630 nm em espectrofotômetro leitor de microplaca Bio-Tek Power Wave X® (Bio-Tek Instruments, EUA). O conteúdo de proteína foi interpolado numa curva-padrão obtida com albumina de soro bovino (Sigma, USA), dissolvida no mesmo diluente da amostra. Os valores foram utilizados para normalização do cálculo da atividade APB.

4.7. Análise dos resultados

Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e foram analisados estatisticamente usando o software GraphPad Instat™. Análise de regressão foi realizada para obtenção de curva padrão de proteína. Foi utilizado o teste

t de Student para comparação de duas médias e a análise de variância (ANOVA), seguida, quando foram detectadas diferenças, pelo teste post hoc apropriado (Newman-Keuls ou Dunnett), para comparar mais de dois valores. Em todos os cálculos foi fixado o nível crítico mínimo de $p < 0,05$.

4. Resultados

5.1. Caracterização da artrite

5.1.1. Espessura das patas

A espessura da região plantar média das patas traseiras (Figura 3) não diferiu entre os grupos C-S e AR no dia da primeira administração de CII em adjuvante (dia 0). Porém, no dia 14, após duas administrações de colágeno e adjuvante (nos dias 0 e 7), ocorreu aumento na espessura das patas no grupo AR em relação ao grupo C-S, caracterizando a tumefação, que se manteve após 30 dias (dia 45).

Figura 3. Evolução temporal da espessura da região plantar das patas traseiras de animais artríticos (AR) (% em relação a controles saudáveis, C-S =100% em cada tempo, n=21) antes (dia 0) e após a indução CIA (dias 14 e 45). C-S (mm) = $4,206 \pm 0,03544$ (dia 0); $4,465 \pm 0,02876$ (dia 14) e $4,548 \pm 0,03167$ (dia 45). Valores são média $\pm$ EPM. Número de animais AR entre parênteses sobre as barras. Comparação entre os grupos: C-S x AR: $p = 0,9161$ (dia 0) e $*p < 0,0001$ (dias 14 e 45), teste t-Student não pareado, bicaudal.

5.1.2. Atividade APB

A atividade APB na FS do tecido sinovial (TS) de AR foi maior, enquanto na FS de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foi menor que em C-S (Figura 4).

Figura 4. Atividade da aminopeptidase básica (APB) na fração solúvel (FS) do tecido sinovial (TS) e de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de controles (C-S) e artríticos (AR) no 45º dia após a indução CIA. Valores são média±EPM. Número de animais entre parênteses sobre as barras. Comparação entre os grupos C-S x AR, TS: *p=0,0013 e PBMCs: *p=0,0104, teste t-Student não pareado, bicaudal.

5.1.3 *TNF-α*

No 45º dia após a indução CIA, os níveis plasmáticos de *TNF-α* foram maiores em AR que em C-S (Figura 5).

Figura 5. Fator de necrose tumoral (*TNF-α*) no plasma de controles (C-S) e artríticos (AR) no 45º dia após a indução CIA. Valores são média±EPM. Número de animais entre parênteses sobre as barras. Comparação entre os grupos C-S x AR: *p=0,0068, teste t-Student não pareado, bicaudal.

5.1.4 *IL-1β* e *IL-6*

Os níveis séricos de *IL-1β* e *IL-6* não diferiram entre C-S e AR, enquanto os níveis de *IL-1β* e *IL-6* no líquido sinovial foram maiores em AR que em C-S no 45º dia após a indução CIA (Figura 6).

Figura 6. Interleucina (IL)-1 β e IL-6 no soro e líquido sinovial (LS) de controles (C-S) e artríticos (AR) no 45º dia após a indução CIA. Valores são média $\pm$ EPM. Número de animais entre parênteses sobre as barras (soro) e número de amostras de um *pool* de 2 animais entre parênteses sobre as barras no LS. Comparação entre os grupos C-S x AR no soro: $p=0,0858$ (IL-1 β) e $p=0,6839$ (IL-6); C-S x AR no LS: * $p=0,0442$ (IL-1 β) e * $p=0,0202$ (IL-6), teste t-Student não pareado, bicaudal.

5.1.5. Fator reumatoide (FR) e Anticorpo antinuclear (ANA)

A Figura 7 mostra que não houve diferença significativa nos níveis séricos de FR entre os grupos C-S e AR no 45º dia após a indução CIA. O ANA não foi detectado no soro de animais controles e artríticos.

Figura 7. Fator reumatoide (FR) no soro de controles (C-S) e artríticos (AR) no 45º dia após a indução CIA. Valores são média $\pm$ EPM. Número de animais entre parênteses sobre as barras. Comparação entre os grupos C-S x AR: $p=0,1223$, teste t-Student não pareado, bicaudal.

5.1.6. Hemograma

No hemograma, o único parâmetro diferencial entre C-S e AR foi o número absoluto de linfócitos, o qual foi menor em AR que em C-S no 45º dia após a indução CIA.

Tabela 1. Hemograma dos controles (C-S) e artríticos não tratados (AR) no 45º dia após a indução CIA.

	Leuc (x10 ³ /uL)	Linf (x10 ³ /uL)	Mon (x10 ³ /uL)	Gran (x10 ³ /uL)	Linf (%)	Mon (%)	Gran (%)	RBC (x10 ⁶ /uL)	HGB (g/dL)	HCT (%)	VCM (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW (%)	PLT (x10 ³ /uL)	MPV (fL)	PDW	PCT (%)
C- S	6,3±0,55	4,54±0,35	0,14±0,02	1,75±0,1	70,0±1,1	2,6±0,10	27,5±1,06	7,8±0,27	13,8±0,52	44,5±1,6	56,4±0,5	17,4±0,1	30,9±0,1	11,6±0,1	665±29	5,0±0,11	16,2±0,07	0,33±0,01
AR	5,7±0,43	3,27±0,21*	0,14±0,01	1,72±0,1	66,9±1,1	2,7±0,14	30,2±1,09	8,3±0,23	14,4±0,42	46,4±1,2	56,0±0,6	17,3±0,1	31,0±0,2	12,1±0,1	715±32	4,88±0,08	16,1±0,06	0,35±0,02
t-st	p=0,3686	p=0,0046	p=1,000	p=0,9186	p=0,0617	p=0,5858	p=0,0897	p=0,2540	p=0,3671	p=0,3819	p=0,5920	p=0,6337	p=0,8431	p=0,0631	p=0,7958	p=0,4400	p=0,6324	p=0,6013

Valores são a média+EPM. Número de animais em C-S (n=17) e AR (n=17). Comparação entre os grupos C-S x AR: *p<0,005, teste t-Student (t-st) não pareado, bicaudal. Leuc = leucócitos totais (x10³ / µL); Linf = linfócitos (x10³ / µL); Mon = monócitos (x10³ / µL); Gran = granulócitos (x10³ / µL); Linf = linfócitos (%); Mon = monócitos (%); Gran = granulócitos (%); RBC = Hemácias (%); HGB = Concentração de hemoglobina (g/dL); HCT = hematócrito (%); VCM = Volume corpuscular médio de hemácias (fL = volume de células = 10⁻¹⁵ L ou µm³ por hemácia); MCH = Conteúdo celular médio de hemoglobina em uma hemácia (pg) (MCH=HGB/RBC); MCHC = Concentração celular média de hemoglobina em uma hemácia (g/dL) (MCHC=HGB/HematócritoX100); RDW = faixa de distribuição das hemácias (%); PLT= plaquetas (x10³ / µL); MPV = volume plaquetário médio (fL, volume de células); PDW = Índice de amplitude de distribuição do tamanho das plaquetas; PCT= Plaquetócrito ou massa plaquetária (%) (PCT=PLTXMPV/10000).

5.1.7. Densitometria óssea

A densidade mineral óssea da região plantar e da tíbia de ambas as patas posteriores de cada animal não diferiram entre C-S e AR no 45º dia após a indução CIA (Figura 8).

Figura 8. Valores de densidade mineral óssea da região plantar e da tíbia das patas posteriores de controles (C-S) e artríticos (AR) no 45º dia após a indução CIA. Valores são média±EPM. Número de animais entre parênteses sobre as barras. Comparação entre os grupos C-S x AR, pata: $p=0,1837$ e tíbia: $p=0,6146$, teste t-Student não pareado, bicaudal.

5.2. Hepatotoxicidade e toxicidade metabólica na artrite

5.2.1. Atividade das transaminases

Os níveis de ALT e AST em AR foram maiores que em C-S no 45º dia após a indução CIA (Figura 9).

Figura 9. Níveis plasmáticos de alanina-transaminase (ALT) e aspartato-transaminase (AST) de controles (C-S) e artríticos (AR) no 45º dia após a indução CIA. Valores são média±EPM. Número de animais entre parênteses sobre as barras. Comparação entre os grupos C-S x AR, ALT: $*p<0,0001$ e AST: $p=0,0029$, teste t-Student não pareado, bicaudal.

5.2.2. Massa corporal

Não houve diferença entre a massa corporal (Figura 10) dos grupos C-S e AR ao longo do período de estudo (dia 0 ao dia 45).

Figura 10. Evolução temporal da massa corporal (g) de controles (C-S) e artríticos (AR) antes e após a indução CIA. Valores são média±EPM. Número de animais entre parênteses sobre as barras. Comparação entre os grupos C-S x AR: $p=0,8932$ (dia 0), $p=0,1528$ (dia 14) e $p=0,2390$ (dia 45), teste t-Student não pareado, bicaudal.

5.3. Prospecção das drogas efetivas

5.3.1. Espessura das patas

A espessura média da região plantar das patas traseiras após 15 dias da indução e 30 dias de tratamento (dia 45) com PRED CR, MIX+PRED CR, MIX+PRED AG, MIX, ROL e TAL diminuiu em relação a AR (Figura 11).

Figura 11. Alteração percentual da espessura da região plantar das patas traseiras dos animais artríticos tratados com prednisolona crônica (PRED CR), prednisolona aguda (PRED AG), rupatadina (RUP), pentoxifilina (PTX), rolipram (ROL) e talidomida (TAL), RUP+PTX+ROL+TAL (MIX), MIX e prednisolona crônica (MIX+PRED CR) e MIX e prednisolona aguda (MIX+PRED AG) em relação aos artríticos não tratados (AR). AR=5,538±0,09607 mm = 100%, n=23. Valores são média±EPM. Número de animais tratados entre parênteses sobre as barras. Análise de variância (ANOVA), $p<0,0001$ (AR x PRED CR x MIX+PRED CR x PRED AG x MIX+PRED AG x MIX x RUP x PTX x ROL x TAL) e Dunnett, $*p<0,05$ (em relação a AR).

5.3.2. Atividade APB

Após 15 dias da indução e 30 dias de tratamento (dia 45), a atividade APB na FS do TS (Figura 12) diminuiu em todos os grupos tratados (PRED CR, MIX+PRED CR, PRED AG, MIX+PRED AG, MIX, RUP, PTX, ROL e TAL) em relação a AR. Não houve alteração da APB na FS de PBMCs em nenhum dos grupos tratados em relação a AR (dados não mostrados).

Figura 12. Atividade aminopeptidásica básica (APB) na fração solúvel (FS) do tecido sinovial (TS) em artríticos não tratados (AR) e artríticos tratados com prednisolona crônica (PRED CR), prednisolona aguda (PRED AG), rupatadina (RUP), pentoxifilina (PTX), rolipram (ROL) e talidomida (TAL), RUP+PTX+ROL+TAL (MIX), MIX e prednisolona crônica (MIX+PRED CR) e MIX e prednisolona aguda (MIX+PRED AG). Valores são a média±EPM. Número de animais entre parênteses sobre as barras. Análise de variância (ANOVA), $p<0,0001$ (AR x PRED CR x MIX+PRED CR x PRED AG x MIX+PRED AG x MIX x RUP x PTX x ROL x TAL) e Dunnett, $*p<0,05$ (em relação a AR).

5.3.3. TNF- α

A Figura 13 mostra que após 15 dias da indução e 30 dias de tratamento (dia 45) o TNF- α plasmático diminuiu significativamente nos grupos tratados MIX, TAL e

ROL em relação a AR, sendo que os demais grupos tratados, embora exibindo tendência de diminuição, não diferiram de AR.

Figura 13. Fator de necrose tumoral (TNF)- α em artríticos não tratados (AR) e artríticos tratados com rupatadina (RUP), pentoxifilina (PTX), rolipram (ROL), talidomida (TAL) e RUP+PTX+ROL+TAL (MIX). Valores são a média $\pm$ EPM. Número de animais entre parênteses sobre as barras. Análise de variância (ANOVA), $p=0,0007$ (AR x MIX x RUP x PTX x ROL x TAL) e Dunnett, $*p<0,05$ (em relação a AR).

5.3.4. Linfócitos

Não houve diferença significativa da quantidade de linfócitos em AR sem tratamento (dia 45) e após 15 dias da indução e 30 dias de tratamento (dia 45) com as drogas (Figura 14).

Figura 14. Linfócitos totais em artríticos não tratados (AR) e artríticos tratados com prednisolona crônica (PRED CR), prednisolona aguda (PRED AG), rupatadina (RUP), pentoxifilina (PTX), rolipram (ROL) e talidomida (TAL), RUP+PTX+ROL+TAL (MIX), MIX e prednisolona crônica (MIX+PRED CR) e MIX e prednisolona aguda (MIX+PRED AG). Valores são a média $\pm$ EPM. Número de animais entre parênteses sobre as barras. Análise

de variância (ANOVA), $p=0,2198$ (AR x PRED CR x MIX+PRED CR x PRED AG x MIX+PRED AG x MIX x RUP x PTX x ROL x TAL).

5.3.5. Hemograma

A Tabela 2 mostra parâmetros hematológicos dos grupos tratados com PRED AG, MIX+PRED AG, PRED CR, MIX+PRED CR, MIX, RUP, PTX, ROL e TAL em relação ao grupo AR sem tratamento ao final do período de 15 dias da indução e 30 dias de tratamento (dia 45).

Além dos linfócitos, não houve diferença entre os grupos tratados em relação ao grupo AR quanto ao número de leucócitos, monócitos e granulócitos, porcentagem de monócitos, RBC, HGB, hematócrito, VCM, MCH, MPV e PCT. Nos parâmetros faixa de distribuição das hemácias (RDW) e número de plaquetas (PLT), a análise de variância mostrou diferença entre os grupos, mas o teste pós-hoc Dunnet não identificou diferenças quando analisado somente em relação a AR. Adotando-se uma análise comparando todos os grupos entre si para cada um desses dois parâmetros, o teste pós-hoc de Newman-Keuls evidenciou a diferença de RDW entre MIX e PTX e entre MIX e RUP, mas ainda não foi possível identificar quais grupos difeririam quanto a PLT.

A Tabela 2 mostra uma menor porcentagem de linfócitos em MIX+PRED CR e MIX+PRED AG em relação ao grupo AR. No grupo MIX+PRED CR e MIX+PRED AG há maior porcentagem de granulócitos em relação ao grupo AR. A concentração celular média de hemoglobina em uma hemácia (MCHC) é menor em RUP e PTX em relação ao grupo AR. No grupo RUP há maior índice de amplitude de distribuição do tamanho das plaquetas (PDW) em relação ao grupo AR.

Tabela 2. Hemograma dos artríticos não tratados (AR) e artríticos tratados com prednisolona crônica (PRED CR), prednisolona aguda (PRED AG), mix das drogas anti-TNF- α (RUP+PTX+ROL+TAL) (MIX), rupatadina (RUP), pentoxifilina (PTX), rolipram (ROL) e talidomida (TAL), MIX e prednisolona crônica (MIX+PRED CR) e MIX e prednisolona aguda (MIX+PRED AG).

	AR (17)	PREDAG (6)	MIX+PREDAG (4)	PREDCR (6)	MIX+PREDCR (5)	MIX (6)	RUP (6)	PTX (6)	ROL (8)	TAL (8)	ANOVA
Leuc ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	5,70 $\pm$ 0,43	4,66 $\pm$ 0,57	1,43 $\pm$ 1,09	4,56 $\pm$ 0,47	3,5 $\pm$ 0,73	4,16 $\pm$ 0,83	5,36 $\pm$ 0,93	4,35 $\pm$ 0,96	4,27 $\pm$ 0,73	6,42 $\pm$ 1,38	p = 0,3132
Linf ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	3,82 $\pm$ 0,29	3,13 $\pm$ 0,42	2,20 $\pm$ 0,75	2,85 $\pm$ 0,26	1,58 $\pm$ 0,48	2,63 $\pm$ 0,69	3,43 $\pm$ 0,73	2,80 $\pm$ 0,63	3,05 $\pm$ 0,51	4,31 $\pm$ 1,04	P=0,1300
Mon ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0,14 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,0	0,10 $\pm$ 0,0	0,10 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,02	0,15 $\pm$ 0,05	0,11 $\pm$ 0,04	0,10 $\pm$ 0,02	0,16 $\pm$ 0,02	p = 0,1951
Gran ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1,72 $\pm$ 0,14	1,43 $\pm$ 0,20	1,67 $\pm$ 0,35	1,61 $\pm$ 0,29	1,86 $\pm$ 0,33	1,46 $\pm$ 0,22	1,78 $\pm$ 0,39	1,43 $\pm$ 0,32	1,12 $\pm$ 0,21	1,95 $\pm$ 0,33	p = 0,5416
Linf (%)	66,95 $\pm$ 1,12	66,77 $\pm$ 2,47	52,80 $\pm$ 4,45*	63,17 $\pm$ 3,97	41,68 $\pm$ 6,28*	58,02 $\pm$ 5,71	64,13 $\pm$ 6,45	63,22 $\pm$ 3,28	71,66 $\pm$ 1,03	65,16 $\pm$ 1,76	p <0,0001
Mon (%)	2,71 $\pm$ 0,14	2,55 $\pm$ 0,24	2,87 $\pm$ 0,30	2,36 $\pm$ 0,12	3,14 $\pm$ 0,27	2,28 $\pm$ 0,17	3,06 $\pm$ 0,92	2,53 $\pm$ 0,23	2,25 $\pm$ 0,12	2,77 $\pm$ 0,36	p = 0,6377
Gran (%)	30,22 $\pm$ 1,09	30,68 $\pm$ 2,34	44,33 $\pm$ 4,24*	34,47 $\pm$ 3,93	55,18 $\pm$ 6,28*	39,70 $\pm$ 5,81	32,80 $\pm$ 5,54	34,25 $\pm$ 3,48	26,09 $\pm$ 0,99	32,06 $\pm$ 1,60	p <0,0001
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	8,31 $\pm$ 0,23	7,98 $\pm$ 0,13	7,24 $\pm$ 0,26	8,74 $\pm$ 0,20	8,08 $\pm$ 0,44	7,62 $\pm$ 0,69	8,45 $\pm$ 0,57	8,04 $\pm$ 0,87	7,74 $\pm$ 0,16	8,28 $\pm$ 0,22	p = 0,4830
HGB (g/dL)	14,44 $\pm$ 0,42	13,93 $\pm$ 0,28	12,10 $\pm$ 0,49	14,77 $\pm$ 0,26	13,88 $\pm$ 0,69	13,05 $\pm$ 1,04	14,43 $\pm$ 1,20	13,88 $\pm$ 1,52	13,36 $\pm$ 0,30	14,11 $\pm$ 0,40	p = 0,4989
HCT (%)	46,40 $\pm$ 1,21	45,18 $\pm$ 0,84	39,30 $\pm$ 1,50	47,08 $\pm$ 0,87	44,88 $\pm$ 2,08	43,42 $\pm$ 2,91	49,53 $\pm$ 3,92	47,17 $\pm$ 4,82	43,80 $\pm$ 0,77	46,84 $\pm$ 1,25	p = 0,3219
VCM (fL)	56,02 $\pm$ 0,61	56,65 $\pm$ 0,83	54,30 $\pm$ 0,60	53,97 $\pm$ 0,72	55,70 $\pm$ 0,75	57,35 $\pm$ 1,24	53,65 $\pm$ 4,43	53,57 $\pm$ 3,14	56,66 $\pm$ 0,77	56,66 $\pm$ 0,56	p = 0,7042
MCH (pg)	17,33 $\pm$ 0,17	17,40 $\pm$ 0,27	16,65 $\pm$ 0,27	16,87 $\pm$ 0,28	17,14 $\pm$ 0,21	17,10 $\pm$ 0,47	16,95 $\pm$ 0,44	17,18 $\pm$ 0,10	17,20 $\pm$ 0,16	17,26 $\pm$ 0,38	p = 0,8685
MCHC (g/dL)	31,04 $\pm$ 0,26	30,80 $\pm$ 0,12	30,73 $\pm$ 0,20	31,32 $\pm$ 0,15	30,86 $\pm$ 0,18	29,90 $\pm$ 0,57	29,02 $\pm$ 0,23*	29,28 $\pm$ 0,33*	30,45 $\pm$ 0,31	30,05 $\pm$ 0,30	p <0,0001
RDW (%)	12,14 $\pm$ 0,16	12,77 $\pm$ 0,44	12,90 $\pm$ 0,72	11,87 $\pm$ 0,35	12,80 $\pm$ 0,65	13,37 $\pm$ 0,79	11,90 $\pm$ 0,49	11,07 $\pm$ 0,26	11,79 $\pm$ 0,18	12,48 $\pm$ 0,32	p = 0,0593
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	715 $\pm$ 32,1	825 $\pm$ 63,0	742 $\pm$ 59,3	706 $\pm$ 52,8	793 $\pm$ 46,8	510 $\pm$ 86,4	576 $\pm$ 119,9	591 $\pm$ 120,8	723 $\pm$ 39,2	785 $\pm$ 49,9	p = 0,0582
MPV (fL)	4,88 $\pm$ 0,08	5,13 $\pm$ 0,11	4,40 $\pm$ 0,24	4,98 $\pm$ 0,08	4,94 $\pm$ 0,09	4,56 $\pm$ 0,17	4,98 $\pm$ 0,14	4,76 $\pm$ 0,18	4,85 $\pm$ 0,13	4,87 $\pm$ 0,12	p = 0,0631
PDW	16,15 $\pm$ 0,06	16,15 $\pm$ 0,08	15,78 $\pm$ 0,10	16,27 $\pm$ 0,08	11,16 $\pm$ 0,02	16,13 $\pm$ 0,09	16,52 $\pm$ 0,17*	16,05 $\pm$ 0,15	16,04 $\pm$ 0,05	16,08 $\pm$ 0,05	p = 0,0060
PCT (%)	0,353 $\pm$ 0,02	0,422 $\pm$ 0,03	0,330 $\pm$ 0,04	0,351 $\pm$ 0,02	0,391 $\pm$ 0,02	0,239 $\pm$ 0,04	0,286 $\pm$ 0,06	0,289 $\pm$ 0,07	0,349 $\pm$ 0,02	0,383 $\pm$ 0,02	p = 0,1101

Valores são a média $\pm$ EPM. Análise de variância (ANOVA) (AR x PRED AG x MIX+PRED AG x PRED CR x MIX+PRED CR x MIX x RUP x PTX x ROL x TAL) e Dunnett, *p<0,05 (em relação a AR). Número de animais entre parênteses sob os nomes dos grupos na primeira linha. Leuc = leucócitos totais ($\times 10^3 / \mu\text{L}$); Linf = linfócitos ($\times 10^3 / \mu\text{L}$); Mon = monócitos ($\times 10^3 / \mu\text{L}$); Gran = granulócitos ($\times 10^3 / \mu\text{L}$); Linf = linfócitos (%); Mon = monócitos (%); Gran = granulócitos (%); RBC = hemácias ($\times 10^3 / \mu\text{L}$), HGB = concentração de hemoglobina (g/dL); HCT = hematócrito (%); VCM = Volume corpuscular médio de hemácias (fL = volume de células = 10^{-15} L ou μm^3 por hemácia); MCH = Conteúdo celular médio de hemoglobina em uma hemácia (pg) (MCH=HGB/RBC); MCHC = Concentração

celular média de hemoglobina em uma hemácia (g/dL) ($MCHC = HGB / \text{Hematócrito} \times 100$); RDW = faixa de distribuição das hemácias (%); PLT= nº de plaquetas ($\times 10^3 / \mu\text{L}$); MPV = volume plaquetário médio (fL, volume de células); PDW = Índice de amplitude de distribuição do tamanho das plaquetas; PCT= Plaquetócrito ou massa plaquetária (%) ($PCT = PLT \times MPV / 10000$).

5.4. Hepatotoxicidade e toxicidade metabólica dos tratamentos

5.4.1. Atividade das transaminases

A Tabela 3 mostra os valores da ALT e AST após 15 dias da indução e 30 dias de tratamento (dia 45). Os grupos PRED CR, MIX+PRED CR e TAL apresentaram valores de ALT menores que AR. A atividade AST foi menor em PRED CR, MIX+PRED CR, PRED AG, MIX+PRED AG, RUP, PTX e TAL em relação a AR.

Tabela 3. Níveis plasmáticos de alanina-transaminase (ALT) e aspartato-transaminase (AST) dos artríticos não tratados (AR) e artríticos tratados com prednisolona crônica (PRED CR), prednisolona aguda (PRED AG), mix das drogas anti-TNF- α (RUP+PTX+ROL+TAL) (MIX), rupatadina (RUP), pentoxifilina (PTX), rolipram (ROL) e talidomida (TAL), MIX e prednisolona crônica (MIX+PRED CR) e MIX e prednisolona aguda (MIX+PRED AG).

	AR (16)	PRED CR (6)	MIX+PRED CR (5)	PRED AG (6)	MIX+PRED AG (4)	MIX (6)	RUP (7)	PTX (6)	ROL (7)	TAL (8)	ANOVA
ALT	77,88 $\pm$ 7,5	32,64 $\pm$ 13*	44,85 $\pm$ 7,4*	57,04 $\pm$ 18,3	41,61 $\pm$ 6,08	63,87 $\pm$ 4,1	54,67 $\pm$ 4,5	47,14 $\pm$ 2,4	71,62 $\pm$ 7,8	46,89 $\pm$ 3,0*	p<0,0001
AST	121,1 $\pm$ 6,20	0*	0,116 $\pm$ 0,1*	0*	0*	100,6 $\pm$ 4,3	93,70 $\pm$ 5,0*	71,0 $\pm$ 1,9*	97,5 $\pm$ 9,7	81,92 $\pm$ 7,0*	p<0,0001

Valores são a média $\pm$ EPM. Número de animais entre parênteses sob os nomes dos grupos na primeira linha. Análise de variância (ANOVA) (AR x PRED CR x MIX+PRED CR x PRED AG x MIX+PRED AG x MIX x RUP x PTX x ROL x TAL) e Dunnett, *p<0,05 (em relação a AR).

5.4.2. Massa corporal

A Figura 15 mostra que após 15 dias da indução e 30 dias de tratamento (dia 45) houve diminuição da massa corporal no grupo MIX+PRED CR em relação a AR.

Figura 15. Massa corporal dos artríticos não tratados (AR) e artríticos tratados com prednisolona crônica (PRED CR), prednisolona aguda (PRED AG), rupatadina (RUP), pentoxifilina (PTX), rolipram (ROL) e talidomida (TAL), RUP+PTX+ROL+TAL (MIX), MIX e prednisolona crônica (MIX+PRED CR) e MIX e prednisolona aguda (MIX+PRED AG). Valores são média±EPM. Número de animais entre parênteses sobre as barras. Análise de variância (ANOVA), $p=0,0022$ (AR x PRED CR x MIX+PRED CR x PRED AG x MIX+PRED AG x MIX x RUP x PTX x ROL x TAL) e Dunnett, $*p<0,05$ (em relação a AR).

5.5. Caracterização da ação antiartrítica nos tratamentos selecionados

Os dados obtidos na prospecção das drogas efetivas, mostraram a melhora da espessura da região plantar das patas traseiras nos tratamentos com MIX, TAL e ROL, diminuição da atividade APB na FS do TS em MIX, TAL e ROL e ação anti-TNF- α com diminuição efetiva dos níveis plasmáticos dessa citocina, além da ausência de alteração hematológica nos tratamentos com MIX, TAL e ROL. A avaliação da atividade das transaminases mostrou efeito hepatoprotetor da TAL, que diminuiu a ALT e a AST em relação a AR. Nenhum dos três tratamentos causou toxicidade metabólica, não havendo alteração da massa corporal. Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que os efeitos benéficos do tratamento com MIX sobre a espessura plantar, APB na FS do TS, anti-TNF- α , sem prejuízos hepáticos, são resultado da ação de TAL e ROL. Sendo assim, essas duas drogas, foram selecionadas

para avaliação posterior mais detalhada, conjuntamente e isoladamente, numa análise comparativa com artríticos sem tratamento e controles saudáveis, tal como mostrado a seguir.

5.5.1. Espessura das patas

A espessura média da região plantar das patas traseiras nos grupos selecionados após 15 dias da indução e 30 dias de tratamento (dia 45) diminuiu nos grupos ROL, TAL e ROL+TAL em relação a AR, mas não alcançando os níveis do grupo C-S (Figura 16).

Figura 16. Alteração percentual da espessura da região plantar das patas traseiras dos animais artríticos não tratados (AR) e tratados com rolipram (ROL), talidomida (TAL) e ROL+TAL em relação aos animais controles (C-S). C-S= $4,206 \pm 0,03544$ mm = 100%, n=23. Valores são média±EPM. Número de animais entre parênteses sobre as barras. Análise de variância (ANOVA), $p < 0,0001$ e Student-Newman-Keuls (C-S x AR x ROL x TAL x ROL+TAL), $p < 0,05$ (letras diferentes indicam diferenças entre os grupos - cada grupo também difere de C-S).

5.5.2. Atividade APB

A atividade APB na FS do TS (Figura 17) foi recuperada ao nível de C-S em (ROL, TAL e ROL+TAL, sendo menor que em AR após 15 dias da indução e 30 dias de tratamento (dia 45).

Figura 17. Atividade aminopeptidásica básica (APB) na fração solúvel (FS) do tecido sinovial (TS) dos animais controle (C-S), artríticos não tratados (AR) e artríticos tratados com rolipram (ROL), talidomida (TAL) e ROL+TAL. Valores são média±EPM. Número de animais entre parênteses sobre as barras. Análise de variância (ANOVA), $p < 0,0001$ e Student-Newman-Keuls (C-S x AR x ROL x TAL x ROL+TAL), $p < 0,05$ (letras diferentes indicam diferenças entre os grupos).

5.5.3. *TNF- α*

A Figura 18 mostra que o $TNF-\alpha$ do plasma foi recuperado ao nível de C-S em todos os grupos tratados avaliados (ROL, TAL e ROL+TAL), sendo menores que em AR após 15 dias da indução e 30 dias de tratamento (dia 45).

Figura 18. Fator de necrose tumoral (TNF)- α dos animais controle (C-S), artríticos não tratados (AR) e artríticos tratados com rolipram (ROL), talidomida (TAL) e ROL+TAL. Valores são média±EPM. Número de animais entre parênteses sobre as barras. Análise de variância (ANOVA), $p = 0,0034$ e Student-Newman-Keuls (C-S x AR x ROL x TAL x ROL+TAL), $p < 0,05$ (letras diferentes indicam diferenças entre os grupos).

5.5.4. Hemograma

A Tabela 4 mostra parâmetros hematológicos dos grupos selecionados após 15 dias da indução e 30 dias de tratamento (dia 45). Não houve diferença na comparação entre AR tratados e não tratados com ROL, TAL e ROL+TAL quanto aos parâmetros

de número de leucócitos, monócitos e granulócitos, porcentagem de monócitos, RBC, HGB, hematócrito, número total de plaquetas, MCV, MCH, MPV, PDW e PCT. As diferenças no número de linfócitos entre C-S e AR e entre AR e os grupos tratados foram mostradas respectivamente na Tabela 1 e Figura 9.

A Tabela 4 mostra também a menor porcentagem de linfócitos no grupo ROL+TAL em relação aos grupos C-S, AR e ROL, enquanto o grupo TAL não diferiu de nenhum grupo considerado nessa comparação. No grupo ROL+TAL ocorreu maior porcentagem de granulócitos em relação aos grupos C-S, AR e ROL, enquanto o grupo TAL não diferiu de nenhum grupo considerado sob comparação. A concentração celular média de hemoglobina em uma hemácia (MCHC) foi menor em ROL+TAL em relação aos grupos C-S e AR, enquanto TAL e ROL não diferiram de nenhum grupo sob comparação.

Tabela 4. Hemograma dos grupos controle (C-S), artríticos não tratados (AR) e tratados com rolipram (ROL), talidomida (TAL) e ROL+TAL.

	C-S (17)	AR (17)	ROL (8)	TAL (8)	ROL+TAL (8)	ANOVA
Leuc ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	6,35 $\pm$ 0,55	5,70 $\pm$ 0,43	4,27 $\pm$ 0,73	6,42 $\pm$ 1,38	6,52 $\pm$ 1,42	p = 0,3923
Mon ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0,14 $\pm$ 0,02	0,14 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,02	0,16 $\pm$ 0,02	0,18 $\pm$ 0,03	p = 0,3653
Gran ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1,75 $\pm$ 0,17	1,72 $\pm$ 0,14	1,12 $\pm$ 0,21	1,95 $\pm$ 0,33	2,22 $\pm$ 0,48	p = 0,1193
Linf (%)	70,03 $\pm$ 1,11 ^a	66,95 $\pm$ 1,12 ^a	71,66 $\pm$ 1,03 ^a	65,16 $\pm$ 1,76 ^{ab}	61,53 $\pm$ 2,53 ^b	p = 0,0005
Mon (%)	2,61 $\pm$ 0,10	2,71 $\pm$ 0,14	2,25 $\pm$ 0,12	2,77 $\pm$ 0,36	2,80 $\pm$ 0,21	p = 0,3661
Gran (%)	27,54 $\pm$ 1,06 ^a	30,22 $\pm$ 1,09 ^a	26,09 $\pm$ 0,99 ^a	32,06 $\pm$ 1,60 ^{ab}	35,68 $\pm$ 2,40 ^b	p = 0,0005
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	7,89 $\pm$ 0,27	8,31 $\pm$ 0,23	7,74 $\pm$ 0,16	8,28 $\pm$ 0,22	8,11 $\pm$ 0,16	p = 0,4851
HGB (g/dL)	13,82 $\pm$ 0,52	14,44 $\pm$ 0,42	13,36 $\pm$ 0,30	14,11 $\pm$ 0,40	13,94 $\pm$ 0,33	p = 0,6215
HCT (%)	44,56 $\pm$ 1,67	46,40 $\pm$ 1,21	43,80 $\pm$ 0,77	46,84 $\pm$ 1,25	47,45 $\pm$ 1,32	p = 0,4712
VCM (fL)	56,46 $\pm$ 0,53	56,02 $\pm$ 0,61	56,66 $\pm$ 0,77	56,66 $\pm$ 0,56	58,50 $\pm$ 0,52	p = 0,1314
MCH (pg)	17,44 $\pm$ 0,14	17,33 $\pm$ 0,17	17,20 $\pm$ 0,16	17,26 $\pm$ 0,38	17,11 $\pm$ 0,11	p = 0,8215
MCHC (g/dL)	30,97 $\pm$ 0,18 ^a	31,04 $\pm$ 0,26 ^a	30,45 $\pm$ 0,31 ^{ab}	30,05 $\pm$ 0,30 ^{ab}	29,35 $\pm$ 0,30 ^b	p = 0,0004
RDW (%)	11,66 $\pm$ 0,18	12,14 $\pm$ 0,16	11,79 $\pm$ 0,18	12,48 $\pm$ 0,32	12,36 $\pm$ 0,34	p = 0,0728
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	665 $\pm$ 29,8	715 $\pm$ 32,1	723 $\pm$ 39,2	785 $\pm$ 49,9	838 $\pm$ 87,4	p = 0,0833
MPV (fL)	5,0 $\pm$ 0,11	4,88 $\pm$ 0,08	4,85 $\pm$ 0,13	4,87 $\pm$ 0,12	4,61 $\pm$ 0,10	p = 0,5403
PDW	16,20 $\pm$ 0,07	16,15 $\pm$ 0,06	16,04 $\pm$ 0,05	16,08 $\pm$ 0,05	16,04 $\pm$ 0,09	p = 0,4289
PCT (%)	0,337 $\pm$ 0,01	0,353 $\pm$ 0,02	0,349 $\pm$ 0,02	0,383 $\pm$ 0,02	0,393 $\pm$ 0,04	p = 0,5953

Valores são média $\pm$ EPM. Número de animais entre parênteses sob os nomes dos grupos na primeira linha da tabela. Análise de variância ANOVA e Student-Newman-Keuls (C-S x AR x ROL x TAL x ROL+TAL) p<0,05 (letras diferentes indicam diferenças entre os grupos). Leuc = leucócitos totais ($\times 10^3 / \mu\text{L}$); Linf = linfócitos ($\times 10^3 / \mu\text{L}$); Mon = monócitos ($\times 10^3$

/ μL); Gran = granulócitos ($\times 10^3$ / μL); Linf = linfócitos (%); Mon = monócitos (%); Gran = granulócitos (%); RBC = hemácias ($\times 10^3$ / μL), HGB = concentração de hemoglobina (g/dL); HCT = hematócrito (%); VCM = Volume corpuscular médio de hemácias (fL = volume de células = 10^{-15} L ou μm^3 por hemácia); MCH = Conteúdo celular médio de hemoglobina em uma hemácia (pg) ($\text{MCH}=\text{HGB}/\text{RBC}$); MCHC = Concentração celular média de hemoglobina em uma hemácia (g/dL) ($\text{MCHC}=\text{HGB}/\text{Hematócrito}\times 100$); RDW = faixa de distribuição das hemácias (%); PLT= plaquetas ($\times 10^3$ / μL); MPV = volume plaquetário médio (fL, volume de células); PDW = Índice de amplitude de distribuição do tamanho das plaquetas; PCT= Plaquetócrito ou massa plaquetária (%) ($\text{PCT}=\text{PLT}\times\text{MPV}/10000$).

5.5.5. Interleucinas

A Figura 19 mostra que houve aumento nos níveis de IL-1 β no líquido sinovial no grupo AR em relação ao C-S, sendo que o ROL, TAL e ROL+TAL recuperaram os níveis de IL-1 β no líquido sinovial após 15 dias da indução e 30 dias de tratamento (dia 45). Com relação aos níveis de IL-6 no líquido sinovial, houve aumento no grupo AR em relação a C-S e ROL, TAL e ROL+TAL não foram capazes de melhorar os níveis de IL-6 após 15 dias da indução e 30 dias de tratamento (dia 45) (Figura 19).

Figura 19. Interleucina (IL)-1 β e IL-6 no líquido sinovial dos animais controle (C-S), artríticos não tratados (AR) e artríticos tratados com rolipram (ROL), talidomida (TAL) e ROL+TAL. Pool de 2 animais por amostra. Valores são média $\pm$ EPM. Número de amostras entre parênteses sobre as barras. Análise de variância (ANOVA), IL-1 β : $p=0,0124$ e IL-6: $p=0,0047$ e Student-Newman-Keuls (C-S x AR x ROL x TAL x ROL+TAL), $p<0,05$ (letras diferentes indicam diferenças entre os grupos para um mesmo parâmetro).

5.5.6. Histologia

Nos animais AR (Figura 20-II), as alterações histopatológicas mais evidentes observadas, comparativamente a C-S (Figuras 20-I), foram erosão óssea e da cartilagem, infiltração celular na cavidade articular e hiperplasia sinovial após 45 dias da indução. Após 15 dias da indução e 30 dias de tratamento (dia 45) o ROL melhorou a infiltração celular e a erosão óssea e da cartilagem (Figuras 20-III) nos

animais artríticos. O tratamento com TAL (Figuras 20-IV) melhorou a erosão óssea e da cartilagem e recuperou totalmente a infiltração celular na articulação em relação aos animais artríticos sem tratamento (Figuras 20-II). O tratamento combinado de ROL+TAL (Figuras 20-V) melhorou bastante a erosão óssea e da cartilagem e a infiltração celular na articulação em relação aos animais artríticos sem tratamento (Figuras 20-II).

Figura 20. Histologia da articulação tibio-tarsal em corte longitudinal de animais controle (I), artríticos sem tratamento (II) e tratados com ROL (III), TAL (IV) ou ROL+TAL (V) após 15 dias da indução e 30 dias de tratamento (dia 45). É possível observar a cartilagem (C), o osso (O), a cavidade intra-articular (CA), o menisco (M), erosões ósseas e da cartilagem (E), bem como a melhora das erosões ósseas e de cartilagem (ME) nos tratamentos ROL e ROL+TAL. Flechas indicam locais de infiltração celular no grupo AR e melhora nos tratamentos TAL, ROL e ROL+TAL. HE.

5.6. Hepatotoxicidade e toxicidade metabólica dos tratamentos

5.6.1. Atividade das transaminases

A Tabela 5 mostra os valores da ALT e AST dos grupos selecionados após 15 dias da indução e 30 dias de tratamento (dia 45). AR, ROL e ROL+TAL tiveram níveis de ALT maiores que C-S. O tratamento com TAL melhorou os níveis de ALT, não diferindo de C-S, ROL e ROL+TAL, mas diferindo de AR. A atividade AST foi maior em AR que em C-S e menor em TAL que em AR, não diferindo entre os demais grupos.

Tabela 5. Níveis plasmáticos de alanina-transaminase (ALT) e aspartato-transaminase (AST) dos animais controles (C-S), artríticos não tratados (AR) e artríticos tratados com rolipram (ROL), talidomida (TAL) e ROL+TAL.

	C-S (16)	AR (16)	ROL (8)	TAL (8)	ROL+TAL (7)	ANOVA
ALT	37,27±4,4 ^a	77,88±7,5 ^b	71,62±7,8 ^{bc}	46,89±3,0 ^{ac}	73,37±9,3 ^{bc}	p<0,0001
AST	95,88±4,68 ^a	121,1±6,20 ^b	93,81±9,1 ^{ab}	81,92±7,0 ^a	99,81±6,4 ^{ab}	P=0,0014

Valores são a média±EPM. Número de animais entre parênteses sob os nomes dos grupos na primeira linha da tabela. Análise de variância (ANOVA) e Student-Newman-Keuls (C-S x AR x ROL x TAL x ROL+TAL) p<0,05 (letras diferentes indicam diferenças entre os grupos para um mesmo parâmetro).

5.6.2. Massa corporal

A Figura 21 mostra que houve diminuição de massa corporal no grupo ROL+TAL em relação ao grupo C-S, não diferindo de AR, ROL e TAL após 15 dias da indução e 30 dias de tratamento (dia 45).

Figura 21. Massa corporal dos animais controles (C-S), artríticos não tratados (AR) e artríticos tratados com rolipram (ROL), talidomida (TAL) e ROL+TAL. Valores são média±EPM. Número de animais entre parênteses sobre as barras. Análise de variância (ANOVA), p=0,00487 e Student-Newman-Keuls (C-S x AR x ROL x TAL x ROL+TAL) p<0,05 (letras diferentes indicam diferenças entre os grupos para um mesmo parâmetro).

5. Discussão

6.1. Espessura plantar, massa corporal e análise histológica

Na primeira administração de colágeno emulsificado em adjuvante, ao iniciar a indução (dia 0), observa-se a ausência de diferença na massa corporal e na espessura das patas entre C-S e AR. Deste modo, é possível garantir que todos os animais utilizados no presente estudo partiram de uma mesma condição em relação a esses parâmetros.

O presente estudo mostra que animais artríticos no modelo CIA, após o desenvolvimento da doença (dia 14), podem ser distinguidos macroscopicamente de animais sadios pela presença de eritema, cianose e inchaço grave que acometem inteiramente ambas as patas posteriores (artríticos), condição que se mantém durante os 30 dias subsequentes (dia 45) nos animais artríticos que não foram tratados (AR) e cuja condição artrítica é confirmada por aspectos histológicos típicos da articulação tibiotársica nessa doença, tais como presença de erosão óssea e da cartilagem, infiltração celular e hiperplasia sinovial (KIM e KANG, 2015; SONG et al., 2013b; YAMASAKI et al., 2012; HITCHON e EL-GABALAWY, 2011; KNOERZER et al., 1997). A artrite reumatoide gera destruição progressiva da cartilagem e do osso, com predominância de mediadores pró-erosivos e de sinovite proliferativa, caracterizada por angiogênese e infiltração de células inflamatórias (LIU et al., 2013; KONISTI et al., 2012). Dessa forma, a inflamação da articulação vem sendo utilizada como parâmetro de avaliação da presença de artrite em vários estudos (WESTMAN et al., 2006; CUZZOCREA et al., 2005; TRENTHAM et al., 1977), bem como da eficácia terapêutica de fármacos potencialmente antiartríticos (KUNCHA et al., 2014).

Os glicocorticoides podem levar a retenção de sódio (Na^+) e perda de potássio (K^+), gerando, conseqüentemente, acúmulo de líquido corporal e aumento de massa corporal. A prednisolona tem como efeito adverso o ganho de massa corporal (BERTHON et al., 2014). Esse efeito da prednisolona cronicamente administrada não é observado no presente estudo. Por outro lado, há diminuição do ganho de massa corporal após o tratamento combinado de MIX e prednisolona crônica, sugerindo que esse efeito decorra das drogas que compõe o MIX. Dentre as drogas estudadas, não há dados anteriores sobre o efeito da RUP sobre a massa corporal. Sabe-se que a PTX não altera o peso de pacientes com esteato-hepatite não alcoólica tratados por 12

meses na dose de 1.200 mg por dia (400 mg, 3 vezes dia) (VAN WAGNER et al., 2011). No entanto, há relatos anteriores sobre efeitos de ROL e TAL na massa corporal. Doseyici e colaboradores (2014) utilizaram o ROL para tratar ratas Wistar com obesidade induzida por dieta hiperlipídica, na dose de 0,1 mg/kg/dia, por tubo orogástrico, durante 2 semanas, observando que o ganho de massa corporal foi significativamente menor no grupo tratado com essa droga em relação ao grupo obeso não tratado. Além disso, dois estudos *in vitro* mostraram que ROL estimula a lipólise (SNYDER et al., 2005; NAKAMURA et al., 2004), causando diminuição da massa corporal (DOSEYICI et al., 2014). O ROL diminui a PDE citoplasmática em adipócitos, ao aumentar o AMPc intracelular e ativar a proteína quinase A1 (PKA) (NAKAMURA et al., 2004). Como a lipólise é controlada pela fosforilação mediada pela PKA, há aumento da lipólise em ratos tratados com ROL sob regime alimentar normal (NAKAMURA et al., 2004). Em camundongos Swiss obesos por dieta hiperlipídica, a administração de TAL, na dose de 100 mg/kg, durante 10 dias, induz uma redução na adiposidade acompanhada pela diminuição de TNF- α , leptina e infiltração de macrófagos (NAKAMITSU et al., 2015). Outro estudo com camundongos obesos por dieta hiperlipídica, tratados por 10 dias com TAL, na dose de 100 mg/kg, constatou a redução na massa corporal (PINTO et al., 2010). No presente estudo, a dose utilizada de TAL (30 mg/kg) é três vezes menor que nesses estudos citados onde se observou redução na massa corporal. Com relação a ROL, o estudo que observou redução na massa corporal utilizou uma forma de administração diferente (sonda orogástrica) (DOSEYICI et al., 2014), enquanto a via de administração utilizada no presente estudo é subcutânea. No entanto, o presente estudo mostra que nenhuma das drogas avaliadas (RUP, TAL, PTX e ROL), quando administradas isoladamente, afeta a massa corporal, o que permite sugerir que o efeito da diminuição de massa corporal observada após o tratamento com MIX e prednisolona crônica se deve ao efeito conjunto de ROL e TAL, o que foi de fato constatado no seguimento do estudo. Sabe-se que tanto a obesidade como o sobrepeso diminuem em até 50% a probabilidade de obter a remissão ou baixa atividade da AR, independentemente do tratamento com DMARDs ou terapia anti-TNF (DAÏEN e SELLAM, 2015; SANDBERG et al., 2014; HEIMANS et al., 2013). Considerando que a obesidade ocorre em 18% a 31% dos pacientes com AR, sendo mais frequente neste grupo que na população em geral, e que o sobrepeso ocorre em mais de 60% dos pacientes com a doença (NARANJO et al., 2008), a diminuição de massa corporal

pela administração conjunta de ROL e TAL seria uma vantagem no caso de pacientes artríticos com obesidade ou sobrepeso.

No presente estudo é constatada a diminuição da espessura plantar nos tratamentos com prednisolona crônica, MIX, ROL, TAL e prednisolona crônica ou aguda administradas conjuntamente com o MIX, em relação ao AR sem tratamento. O efeito anti-inflamatório é bem conhecido para a prednisolona administrada cronicamente no tratamento da AR (BIJLSMA et al., 2015; CAPORALI et al., 2015; CAPORALI et al., 2013). Além do tratamento crônico, a prednisolona também é utilizada agudamente, em etapa prévia da infusão com algumas drogas biológicas (SCHIAPPAPIETRA et al., 2015; CAPORALI et al., 2015), visando a supressão aguda do sistema imune, para que não haja reação imune ao medicamento biológico. O presente estudo constatou que, após 30 dias de uma administração única de prednisolona, não há melhora da espessura plantar e do teor de TNF- α , nem alterações no hemograma no modelo CIA. Pode-se inferir, então, que as drogas biológicas realmente não teriam seu efeito antiartrítico associado ao uso agudo de prednisolona no processo de sua administração. No entanto, o presente estudo mostra que o efeito da dose aguda de prednisolona na diminuição da atividade APB na FS do TS e na diminuição de AST persiste após os 30 dias de tratamento, e no que se refere a APB isto poderia contribuir com o efeito anti-inflamatório. Por outro lado, a administração aguda e crônica de prednisolona com o MIX aumenta a porcentagem de linfócitos e diminui a porcentagem de granulócitos, enquanto a administração crônica também diminui ALT. Tais efeitos da prednisolona não são relevantes para influenciar significativamente os efeitos antiartríticos do MIX, indicando então a efetividade antiartrítica isolada do MIX e validando a continuidade do processo de prospecção de drogas antiartríticas dentre as que compõe o MIX, o qual acabou por evidenciar ROL e TAL como os componentes antiartríticos mais promissores do MIX.

A análise dos tratamentos selecionados (ROL, TAL e ROL+TAL) mostra que o efeito de diminuição da espessura da região plantar em relação a C-S observado no tratamento com MIX foi o mesmo obtido pela combinação de ROL+TAL e de ROL e TAL administrados isoladamente. No entanto, a administração combinada de ROL+TAL não acrescentou melhora significativa do TNF- α plasmático e da atividade APB na FS do TS em relação ao uso isolado de cada uma delas. Isto ocorre provavelmente porque ambas as drogas teriam o mesmo mecanismo principal de ação

anti-TNF- α e antiartrítica no modelo CIA, a qual é aqui hipotetizada como decorrente da inibição de PDE4, como será discutido adiante com mais detalhes.

A avaliação histológica qualitativa aponta melhora, mas não a recuperação total dos aspectos histológicos nos animais artríticos tratados com ROL, TAL e ROL+TAL. Este fato pode estar associado ao período de tempo e doses utilizadas no tratamento.

6.2 Atividade APB

Vem sendo mostrado que a angiogênese é um acontecimento essencial na perpetuação de respostas inflamatórias e imunitárias, como no desenvolvimento de *pannus* na AR (LIU et al., 2013; THAIRU et al., 2011). Além da formação do *pannus*, o tecido sinovial inflamado na articulação se torna altamente infiltrado por macrófagos e linfócitos T e B (OKAMOTO et al., 2008; BOMBINI et al., 2004). Neutrófilos também se apresentam, causando dano tecidual por meio da secreção de produtos como enzimas proteolíticas, oxigênio e nitrogênio derivados de radicais livres (BOMBINI et al., 2004; HARRIS, 1990). O recrutamento de neutrófilos nos locais de inflamação é mediado por quimioatrativos como quimiocinas, C5a e LT-B4 (BOMBINI et al., 2004). A enzima LT-A4-H tem atividade hidrolítica sobre o substrato epóxi LT-A4, formando LT-B4 (ANDERSON et al., 2009).

A APB, além de hidrolisar resíduos básicos (arginina e lisina) na cadeia peptídica (HUI e HUI, 2006; PIESSE et al., 2004; FOULON et al., 1999), é estruturalmente semelhante à enzima LT-A4-H (33% de identidade e 48% de similaridade), também exibindo essa atividade (PHAM et al., 2007; PENNING et al., 2002; FOULON et al., 1999; CADEL et al., 1997). Por sua vez, a atividade peptidásica da APB ocorre sobre substratos com reconhecidas ações na regulação do processo angiogênico (HEFFELFINGER, 2007; RUIZ-ORTEGA et al., 2007; BALOGH et al., 1998), além de participar da maturação de hormônios peptídicos e neurotransmissores (CADEL et al., 2015; OHNISHI et al., 2015; CADEL et al., 2013), já que sua atividade hidrolítica em relação aos resíduos arginina e lisina são essenciais para o processamento e amadurecimento de hormônios e neurotransmissores (OHNISHI et al., 2015). Além disso, já haviam evidências anteriores de que a atividade APB é marcadora do desenvolvimento da artrite no modelo CIA em ratos (MENDES, 2012; MENDES et al., 2011). O presente estudo confirma o mesmo perfil da atividade APB (decréscimo na fração solúvel de PBMCs e aumento nessa mesma fração do tecido sinovial) em

animais artríticos em relação aos animais saudáveis. Nesse sentido, como foi evidenciado que todos os tratamentos (PTX, TAL, ROL, RUP e MIX isoladamente e com prednisolona crônica e aguda) inibem a atividade APB na fração solúvel do tecido sinovial, mas não alteram essa atividade APB na fração solúvel de PBMCs, é provável que a ação desses tratamentos ocorra inicialmente no foco inflamatório da doença, ou seja, nas articulações. Como será discutido mais adiante, a inibição de IL-1 β também foi observada apenas localmente após os tratamentos com ROL, TAL e ROL+TAL. Além disso, é possível hipotetizar que esse efeito local de inibição da APB resulte na diminuição da angiogênese, quimiotaxia e estímulo de neutrófilos, sendo benéfica no tratamento da AR.

6.3. Transaminases

Aumentos de transaminases superiores a 10-20 vezes do valor de referência são raros na ausência de lesão da célula hepática (REJ, 1984). Sabe-se que há aumento de ALT e AST em ratos Wistar com AR induzida por adjuvante completo de Freund (BANJI et al., 2011; BORASHAN et al., 2009; HUNG et al., 2006). No presente estudo, o valor de ALT na AR não chega a aumentar três vezes e o valor de AST não chega a aumentar duas vezes. Embora esse aumento possa sugerir a tendência para a ocorrência de danos hepatocelulares no modelo CIA, também poderia ser decorrente de desordens não hepatobiliares, considerando-se que as aminotransaminases estão ubiquamente distribuídas.

Ratos tratados com ROL (2,5 e 5 mg / kg, i.p.), 30 min antes da indução de lesão hepática aguda por tioacetamida, tiveram diminuição das concentrações séricas das transaminases (MATSUHASHI et al., 2005). O tratamento com ROL nas doses de 5 ou 50 mg / kg antes da indução da síndrome do desconforto respiratório agudo por administração intratraqueal de LPS inibiu o aumento de AST e ALT (TURNER et al., 1993). Porém, não foi observado no presente estudo efeito de inibição de AST e ALT pelo ROL, provavelmente porque os estudos que relatam essa inibição utilizaram uma dose de ROL quase duas vezes maior (TURNER et al., 1993) e outra via de administração (MATSUHASHI et al., 2005). Há relato de uma possível propriedade hepatoprotetora da TAL (MURIEL et al., 2003), efeito esse observado no presente estudo em relação a ambas transaminases. Estudos que avaliaram a PTX no tratamento de esteato-hepatite não-alcoólica apontam a redução dos níveis de AST e ALT (VAN WAGNER et al., 2011; LI et al., 2011; LEE et al., 2008; GEORGESCU e

GEORGESCU, 2007; TUNCER et al., 2003). No presente estudo, constata-se apenas diferença significativa de AST quando o grupo PTX é comparado com o artrítico. Dakhale e colaboradores (2014), em estudo clínico de tratamento de urticária espontânea crônica com a RUP, na dose de 10 mg por dia, não encontraram alterações nas transaminases, assim como no presente estudo. Também, foi evidenciado no presente estudo que a prednisolona aguda e crônica, isoladamente, e a prednisolona aguda e crônica administrada conjuntamente com o MIX, são capazes de suprimir a AST, sugerindo um efeito hepatoprotetor. Um efeito similar, mas menos potente, é observado com a diminuição de AST nos grupos RUP, PTX e TAL em relação a AR. Quando administradas conjuntamente (MIX) não há diminuição da AST, sugerindo que a combinação cause inibição do efeito dessas drogas isoladas. Como nenhum efeito hepatoprotetor foi observado no grupo MIX, é possível inferir que na administração de prednisolona aguda e crônica, isoladamente, ou em combinações com o MIX, esse efeito provém, em maior grau, da prednisolona, a droga presente em todos esses tratamentos. O possível efeito hepatoprotetor da prednisolona também aparece na ALT, a qual é aumentada na AR e melhorada pelos tratamentos crônicos com prednisolona isoladamente ou com o MIX. No entanto, em ratos da linhagem Fisher (menores em tamanho e mais sensíveis à estimulação mecânica de seus membros posteriores, além de algumas outras características locomotoras e sensoriais) tratados por via intravenosa com 22,5 mg de prednisolona / kg por 30 min não foram detectadas alterações nos níveis de AST e ALT (REBOLLEDO et al., 2014). Portanto, a dose maior utilizada no presente estudo na forma aguda, bem como a cronicidade do tratamento, são condições necessárias para causar essas alterações (na ALT com o tratamento crônico, e na AST com o tratamento crônico e agudo).

Drogas anti-reumáticas estão entre os medicamentos comumente associados a reações hepáticas adversas ou hepatotoxicidade (AITHAL, 2011). Uma revisão sistemática sobre o MTX - medicamento de primeira linha no tratamento da AR – mostrou que 13% dos pacientes apresentam elevação de ALT ou AST mais que o dobro do limite normal, e que 3,7% dos pacientes interrompem o tratamento devido à hepatotoxicidade (SALLIOT e VAN DER HEIJDE, 2009). Foram avaliados 3.808 pacientes, tratados com baixas doses de MTX (10,5 mg por semana em média) durante um período médio de 56 (intervalo de 27-180) meses. Outras drogas usadas no tratamento da AR também causam níveis elevados de transaminases, dentre elas as DMARDs sulfassalazina, diclofenaco, leflunamida e azatioprina e três drogas

biológicas inibidoras de TNF- α , adalimumabe, etanercepte e infliximabe (SILVA, 2015; LONDONO et al., 2012; AITHAL, 2011). No presente estudo, o grupo AR sem tratamento e os grupos tratados com ROL e ROL+TAL tiveram níveis de ALT maiores que os animais controle sadios, enquanto que o grupo AR apresentou aumento dos níveis de AST em relação aos controles e ao grupo tratado com TAL. Contudo, como discutido anteriormente, esse aumento não chega a ser o dobro em relação aos controles sadios para ALT e AST, sendo possível afastar a hipótese de lesão hepatocelular mais grave do que a causada pelo MTX. O presente estudo sugere até um efeito hepatoprotetor da TAL, uma vez que o tratamento da AR com essa droga recupera os níveis normais de ambas as transaminases. Assim, a TAL emerge como alternativa vantajosa em relação a outras drogas tradicionais para o tratamento de pacientes AR que possuam algum comprometimento hepático.

6.4. Hemograma

Um estudo sobre subtipos de células B mostrou que um subtipo de linfócito B, produtor de IL-10, tem seus níveis significativamente diminuídos em pacientes AR (DAIEN et al., 2014). Outros estudos observaram que a população de células T reguladoras foi menor em pacientes com AR (FLORES-BORJA et al., 2013; CHEN et al., 2012b). A diminuição da quantidade absoluta de linfócitos no grupo AR, observada no presente estudo, corrobora os achados supracitados. O aumento da migração e acúmulo da população de células B em locais de inflamação pode explicar sua diminuição numérica em pacientes com AR ativa e sua recuperação em pacientes com doença inativa (FLORES-BORJA et al., 2013).

Nenhum dos grupos tratados individualmente com as drogas sob estudo apresentam alteração significativa no número de linfócitos. Apesar disso, a combinação de TAL, ROL, RUP, PTX e prednisolona, esta última administrada de forma crônica ou aguda, causa diminuição da porcentagem de linfócitos e aumento da porcentagem de granulócitos na AR, sugerindo um sinergismo ou potenciação na administração combinada dessas drogas. Porém, o tratamento com o MIX (TAL, ROL, RUP e PTX) não altera o número de linfócitos, sugerindo a existência de alguma interação em relação a esse efeito com o uso combinado dessas drogas na ausência e na presença de prednisolona, o que corrobora o relato de Dale e colaboradores (1974) mostrando que a prednisolona promove a diminuição de neutrófilos e monócitos em pacientes com doenças inflamatórias.

O presente estudo também mostra menor porcentagem de linfócitos e maior porcentagem de granulócitos no tratamento combinado de ROL+TAL, enquanto a TAL sozinha não apresenta esses efeitos. Calabrese e Fleischer (2000) observaram que a TAL diminui a produção de células auxiliares e aumenta a produção de células supressoras *in vitro*. Bielekova e colaboradores (2000) observaram que ROL regula negativamente a expressão de células Th1 e positivamente a expressão de células Th2 em monócitos e linfócitos B e T, após ativação inespecífica por LPS *in vitro*, sugerindo um efeito benéfico no tratamento da AR, já que há um predomínio de mediadores pró-inflamatórios Th1 nessa doença (MELLADO et al., 2015). No presente estudo, esse efeito não foi observado no tratamento com as drogas isoladas, constatando-se menor porcentagem de linfócitos e maior porcentagem de granulócitos apenas com a combinação ROL+TAL, provavelmente porque esses efeitos *in vivo* seriam dependentes do sinergismo ou potenciação decorrente da administração concomitante de ambas essas drogas. Não existem estudos *in vivo* sobre os efeitos isolados dessas drogas em população de linfócitos. Além disso, o efeito da administração combinada de TAL+ROL na modulação de algumas populações celulares que atuam na inflamação (BIELEKOVA et al., 2000; CALABRESE e FLEISCHER, 2000) pode ser influenciado pela diminuição de TNF- α no plasma, e de IL-1 β localmente no líquido sinovial, os quais, por sua vez, estimulam a ação de células imunes e inflamatórias e a liberação de outras citocinas que agravam o quadro da AR.

6.5. Citocinas

TNF- α , IL-1 β e IL-6 desempenham papéis importantes na patogênese da AR (BRZUSTEWICZ e BRYL, 2015) e têm sido encontradas em níveis elevados no soro de pacientes artríticos (ENG et al. 2016; BRZUSTEWICZ e BRYL, 2015) e de ratos com artrite induzida por adjuvante (LAN et al., 2016; SHEN et al., 2015; REFAAT et al., 2013). Além do aumento macroscópico da espessura da região plantar das patas traseiras e da avaliação histológica que confirmam o desenvolvimento da AR no presente estudo, há aumento dos níveis plasmáticos de TNF- α e dos níveis de IL-1 β e IL-6 no líquido sinovial nos animais AR, tal qual ocorre na AR em humanos (BRZUSTEWICZ e BRYL, 2015; MOELANTS et al., 2013). No entanto, não há alteração dos níveis de IL-1 β e IL-6 no soro dos animais AR.

Macrófagos (sinoviócitos tipo A), fibroblastos (sinoviócitos tipo B) e linfócitos T são os tipos celulares mais abundantes na sínovia de pacientes com AR (MARUOTTI et al., 2007). Na AR, os mastócitos da sinóvia expandem-se para constituir por volta de 5% das células sinoviais (MARUOTTI et al., 2007; OLSSON et al., 2001), liberando citocinas inflamatórias como IL-6, IL-8 e TNF- α , cuja expressão é mediada pelo fator nuclear NF- κ B (MAROK et al., 1996; BLUE et al., 1993). Mastócitos liberam quimiocinas que medeiam o recrutamento de macrófagos (MARUOTTI et al., 2007) e produzem mediadores, tais como IL-1, IL-6, TNF- α , fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento de fibroblastos FGF-2 (NOLI e MIOLO, 2001). Alguns mediadores de mastócitos, como a histamina e a proteína inflamatória de macrófagos (MIP)-1 α , podem promover diretamente a diferenciação e ativação de osteoclastos (MARUOTTI et al., 2007), enquanto que histamina, heparina e VEGF induzem a angiogênese na AR (MARUOTTI et al., 2007).

Tissi e colaboradores (1999) quantificaram TNF- α , IL-1 β e IL-6 séricos e locais por diversos períodos de tempo (2 e 6 h e 1, 2, 5, 10, 15 e 20 dias) após a indução do modelo de artrite séptica difusa por inoculação intravenosa de estreptococos em camundongos (TISSI et al., 1999). Nos animais artríticos, os níveis de TNF- α séricos e locais estavam elevados em relação ao grupo controle em todos os períodos examinados, enquanto que os níveis de IL-1 β e IL-6 nas articulações excederam os detectados no soro, confirmando uma forte produção local de IL-1 β e IL-6 (TISSI et al., 1999). No soro, os níveis de IL-6 e IL-1 β têm um aumento significativo 2 h e 5 dias após a indução de artrite, mas no 15º foi observado o início de uma diminuição progressiva de ambas interleucinas (TISSI et al., 1999), sugerindo que os níveis dessas citocinas se mantêm altos apenas durante o estabelecimento da doença.

Silva e colaboradores (2000) observaram perfil semelhante de TNF- α e IL- β em modelo de artrite induzida por adjuvante completo de Freund em diferentes períodos de tempo (1, 10, 20 e 30 dias) após a indução. Os níveis séricos de ambas citocinas foram muito elevados 5 h após a administração do adjuvante, sendo observada uma diminuição progressiva de IL-1 β , mas não de TNF- α , até o 30º dia após a indução (SILVA et al., 2000). Trinta dias após a indução, os níveis de IL-1 β caíram para metade, enquanto que os níveis de TNF- α se mantiveram constantes (SILVA et al., 2000). Por outro lado, outros estudos também não detectaram níveis de IL-1 β no plasma de ratos com artrite induzida por adjuvante completo (OLIVER et al., 1999;

PHILIPPE et al., 1997). No presente estudo, TNF- α , IL-1 β e IL-6 foram quantificadas apenas 30 dias após a indução da AR, provavelmente após a fase de estabelecimento da doença, justificando a ausência de IL-1 β e IL-6 em níveis séricos detectáveis nos animais AR, mas sendo encontradas apenas localmente no líquido sinovial desses animais.

TAL e ROL, ou sua combinação, melhoram IL-1 β , mas não afetam IL-6 no líquido sinovial, mostrando que um processo, que em outras circunstâncias deveria estar limitado a uma fase aguda da inflamação, persiste refratário a essas drogas na AR. Diversos estudos apontam a importância do TNF- α nos acontecimentos iniciais ou nos eventos de perpetuação da AR (OLESEN et al., 2016; BRENNER et al., 2015; MANARA e SINIGAGLIA, 2015; CHU, 2013; ATZENI et al., 2013; MOELANTS et al., 2013; BOMBINI et al., 2004). O presente estudo mostra que apenas os tratamentos com ROL, TAL e MIX diminuíram os níveis de TNF- α nos animais artríticos. Sabe-se que a TAL inibe TNF- α por diferentes mecanismos (MAJUMDER et al., 2012), dentre eles a inibição de PDE4 (TAYLOR, 2003). Outro mecanismo, considerado um dos mais importantes, é o aumento da degradação do mRNA do TNF- α , causando diminuição de sua meia-vida (MAJUMDER et al., 2012; PEARCE e CHIKANZA, 2001) e redução de sua expressão (MAJUMDER et al., 2012; PEARCE e CHIKANZA, 2001; MOREIRA et al., 1993). A TAL inibe seletivamente o NF- κ B induzido por H₂O₂ (MAJUMDER et al., 2012), um fator de transcrição que regula alguns genes inflamatórios, entre eles o TNF- α (YANG et al., 2015; YAGYU et al., 2005; KIM et al., 2004; ROYDS et al., 1998). Além disso, a TAL bloqueia a ativação de NF- κ B por inibição da atividade do complexo IK β quinase, responsável por inativar a classe de proteínas citosólicas que inibem NF- κ B, chamadas I κ Bs, que retêm os dímeros inativos do NF- κ B no citosol, impedindo a translocação e ativação do NF- κ B para o núcleo (YANG et al., 2015; MAJUMDER et al., 2012; ISRAËL, 2010). A TAL também inibe a expressão de RNA e proteína do fator de diferenciação mieloide 88 (MAJUMDER et al., 2012; NOMAN et al., 2009), um dos importantes mediadores da sinalização positiva do NF- κ B, auxiliando na ativação do NF- κ B citosólico (MAJUMDER et al., 2012; KAWAI e AKIRA, 2005). Provavelmente, a efetividade antiartrítica de TAL, detectada no presente estudo, advém dessa amplitude de mecanismos de ação inibitória sobre o TNF- α , mas sobretudo da ação sobre PDE4.

No que se refere ao ROL, este também inibe especificamente PDE4 (YAMAMOTO et al., 2007; OZEGBE et al., 2004; PEARCE e CHIKANZA, 2001;

NYMAN et al., 1997; ROSS et al., 1997), gerando elevação dos níveis intracelulares de AMPc e subsequente supressão de respostas inflamatórias e imunitárias (CRILLY et al., 2011; SHENOY e AGARWAL, 2010; KOBAYASHI et al., 2007; YAMAKI et al., 2004). A inibição do LT-B4, IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-5 também é um mecanismo potencial dos efeitos anti-inflamatórios do ROL (KOBAYASHI et al., 2007; YAMAMOTO et al., 2007; HUANG e MANCINI, 2006). Provavelmente, a efetividade antiartrítica de ROL detectada no presente estudo advém do seu largo espectro de ação sobre várias vias convergentes que complementam o processo inflamatório, mas sobretudo da ação sobre PDE4.

Em comum, ambas as drogas, TAL e ROL, inibem PDE4, uma família de enzimas particularmente abundante em neutrófilos, linfócitos T, macrófagos e eosinófilos (THABET et al., 2016; FRANCISCHI et al., 2000). Nestas células, os inibidores de PDE4 reduzem a síntese e a liberação de mediadores pró-inflamatórios, citocinas e espécies reativas de oxigênio (THABET et al., 2016; HUANG et al., 2001; SOUNESS et al., 2000). Portanto, os resultados do presente estudo apontam que um dos principais mecanismos de ação antiartrítica de ambas as drogas é a inibição do TNF- α decorrente da inibição da PDE4. De fato, novos inibidores de PDE4, tais como cilomilast, CHF 6001, GSK256066 e MK0952 têm sido foco de investigação quanto aos seus efeitos em várias doenças autoimunes inflamatórias, (MARTINEZ e GIL, 2014; MAURICE et al., 2014). Dentre esses inibidores, o roflumilast foi aprovado em 2010 pela Agência Européia de Medicamentos (EMA) para tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) associada à bronquite crônica em pacientes adultos. Em 2011, a Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos aprovou o roflumilast para tratamento da DPOC grave (SAKKAS et al., 2017; MARTINEZ e GIL, 2014; WITTMANN e HELLIWELL, 2013). Outros inibidores de PDE4 também foram aprovados pela FDA: o apremilast, em 2014, para tratamento de artrite psoriática (SAKKAS et al., 2017; FELQUER e SORIANO, 2015; MARTINEZ e GIL, 2014) e o crisaborole, em 2016, para o tratamento da dermatite atópica (EICHENFIELD e STEIN GOLD, 2017; SAKKAS et al., 2017; PATON, 2017). Uma das vantagens decorrentes da presente constatação dos efeitos antiartríticos de TAL e ROL e sua associação com a inibição de PDE4 é que, em virtude da diferença de tempo de acompanhamento, as informações de Fase 4 sobre contra-indicações e tipo e gravidade dos efeitos adversos de TAL e ROL é muito maior que para esses

inibidores citados, consequentemente proporcionando maior controle e segurança para a prescrição.

A ausência de efeito de PTX sobre os níveis de TNF- α , observada no presente estudo, provavelmente ocorre devido à sua baixa especificidade em inibir PDE4, embora iniba PDEs em geral em ampla diversidade de tipos celulares (LYONS e BRENNAN, 2017; PAL et al., 2016b; NASIRI-TOOSI et al., 2013; LI et al., 2011). Existem onze famílias de PDEs que diferem entre si quanto a localização e distribuição tecidual, estrutura molecular e especificidade em hidrolisar somente AMPc (PDEs 4, 7 e 8), GMPc (PDEs 5, 6 e 9), ou ambos (PDEs 1, 2, 3, 10 e 11) (LOMAS e ZACCOLO, 2014; MAURICE et al., 2014; FRANCIS et al., 2011; GHOSH et al., 2009). Ao hidrolisar os monofosfatos cíclicos, as PDEs regulam vários processos fisiológicos importantes incluindo resistência vascular, débito cardíaco, motilidade visceral, resposta imune, inflamação, neuroplasticidade, visão e reprodução (MAURICE et al., 2014; GHOSH et al., 2009). Enquanto isso, TAL e ROL atuam com especificidade para a PDE4 (THABET et al., 2016; FRANCISCHI et al., 2000), presente preferencialmente em células do sistema imune, a principal fonte de TNF- α (BRZUSTEWICZ e BRYL, 2015; ZELOVÁ, e HOŠEK, 2013).

A RUP é conhecida por sua potente atividade antagonista à histamina e ao PAF (MULLOL et al., 2015; SHAMIZADEH et al., 2014; KATIYAR e PRAKASH, 2009). A expressão e a síntese de PAF e seus receptores ocorrem principalmente em mastócitos (MULLOL et al., 2015; SHAMIZADEH et al., 2014), sendo que a histamina também é liberada por mastócitos e basófilos após estimulação antigênica (WHITE et al., 1987). É possível hipotetizar que a ausência da ação inibitória de TNF- α pela RUP na AR deve-se à ausência de ação sobre PDEs e atuação mais restrita a mastócitos, eosinófilos e neutrófilos, células menos abundantes na sinovia de portadores de AR (MARUOTTI et al., 2007) e que, sobretudo, não estão entre as principais fontes de TNF- α (BRZUSTEWICZ e BRYL, 2015; ZELOVÁ, e HOŠEK, 2013).

6.6. FR, ANA e densitometria óssea

Atualmente, o FR é rotineiramente usado para auxiliar no diagnóstico da AR, sendo um dos critérios sorológicos de classificação de AR (TAYLOR et al., 2011; DE RYCKE et al., 2004). Apesar disso, são identificados em apenas 70% a 80% dos pacientes, com uma proporção que permanece soronegativa (BRZUSTEWICZ e

BRYL, 2015; BARRA et al., 2011; JEFFERY, 2014; NAKAMURA, 2000). Por outro lado, a detecção de FR pode suceder somente seis meses após o surgimento de outros sinais característicos da AR (NAKAMURA, 2000). O FR também não é específico para a AR e pode estar presente em indivíduos saudáveis ou em pacientes com outras doenças autoimunes e infecciosas (TAYLOR et al., 2011; NISHIMURA et al., 2007; WERNHOFF et al., 2003). O presente estudo mostrou, pela primeira vez, que o FR não é alterado no modelo CIA de AR, o que poderia ser atribuído simplesmente a sensibilidade do kit utilizado para a medida. Porém, sabe-se que a sensibilidade e a especificidade do FR para a identificação de pacientes com AR são relativamente baixas em comparação com outros autoanticorpos, como anticorpos para proteínas citrulinadas (TAYLOR et al., 2011; WERNHOFF et al., 2003). Um estudo com pacientes AR (DE RYCKE et al., 2004) e revisões de literatura (TAYLOR et al., 2011; NISHIMURA et al., 2007; WERNHOFF et al., 2003), que compararam a eficácia de ambos no diagnóstico da AR, concluíram que a positividade de anticorpos para proteínas citrulinadas é mais específica que para FR.

Por outro lado, o uso do ANA é bem estabelecido para diagnóstico de doenças reumáticas sistêmicas (PISETSKY et al., 2017; ABELES e ABELES, 2013). Entretanto, não há perfil para diagnóstico específico desse anticorpo na AR (NAKAMURA, 2000). A positividade do ANA foi inicialmente vista como uma característica notável no lúpus eritematoso sistêmico, suficiente para tornar-se um critério de classificação da doença (PISETSKY et al., 2017). Atualmente, sabe-se que a positividade do ANA ocorre mais comumente em pacientes com queixas músculo-esqueléticas e sintomatologia vaga, sendo que um resultado positivo não teria caráter revelador ou informativo (PISETSKY et al., 2017). O presente estudo mostra, pela primeira vez, que ANA não é detectável no soro de ratos com CIA, o que, evidentemente, poderia ser simplesmente consequência da sensibilidade do kit usado para a medida.

Considerando estes dados, uma hipótese mais consistente para a ausência de alterações em FR e ANA, juntamente com a ausência de alterações na densitometria óssea na CIA, é a de que o grau de acometimento no decurso temporal em que esses parâmetros foram avaliados no presente estudo não é suficientemente grave para o surgimento dessas alterações.

6.7. Apreciação geral

Conforme ilustra a Figura 22, a prospecção realizada no presente estudo permite concluir que a atividade antiartrítica proveniente do MIX de drogas aqui avaliado é principalmente consequente dos efeitos de TAL e ROL, o que conduziu à seleção dos tratamentos com ROL, TAL e ROL+TAL para reavaliação dos parâmetros relacionados com a AR e análise histológica óssea. O efeito de diminuição da tumefação das patas traseiras e dos níveis de TNF- α ocorrem somente nos tratamentos da AR com ROL, TAL e MIX, enquanto que a melhora dos níveis de APB na fração solúvel do tecido sinovial ocorre em todos os tratamentos avaliados. Além disso, um efeito hepatoprotetor nos animais AR, recuperando os níveis de ambas as transaminases avaliadas, pode ser observado quando a TAL está presente.

Figura 22. Sumário das etapas da prospecção e efeitos das drogas sob estudo nos animais artríticos em relação aos controles. Prednisolona crônica (PRED CR), prednisolona aguda (PRED AG), rupatadina (RUP), pentoxifilina (PTX), rolipram (ROL), talidomida (TAL), RUP+PTX+ROL+TAL (MIX), MIX e prednisolona crônica (MIX+PRED CR) e MIX e prednisolona aguda (MIX+PRED AG).

É importante destacar que os tratamentos TAL e ROL isoladamente não alteram o hemograma e nem a massa corporal, indicando a ausência de efeitos colaterais relacionados a esses parâmetros. No entanto, o tratamento conjunto da AR com ROL e TAL diminui a massa corporal. Sabe-se que a terapia de combinação para artrite baseia-se na natureza multifatorial da inflamação crônica. O uso concomitante de drogas com diferentes mecanismos de ação ou farmacocinética pode, portanto, ser mais eficaz do que cada um dos tratamentos monoterapêuticos (KUNCHA et al., 2014), ajustando o tratamento às características específicas de alguns pacientes, como em pacientes AR com obesidade ou sobrepeso, por exemplo. Nesse sentido, o tratamento combinado de ROL e TAL pode ser uma alternativa eficaz para pacientes que não respondam aos tratamentos convencionais, ou que tenham outras necessidades específicas, como a obesidade ou sobrepeso.

Conforme ilustra a Figura 23, dentre as quatro drogas aqui avaliadas, ROL, TAL e PTX inibem PDEs (LYONS e BRENNAN, 2017; PAL et al., 2016b; NASIRI-TOOSI et al., 2013; MAJUMDER et al., 2012; LI et al., 2011; YAMAMOTO et al., 2007; OZEGBE et al., 2004; PEARCE e CHIKANZA, 2001; NYMAN et al., 1997; ROSS et al., 1997). A efetividade antiartrítica de TAL e ROL no modelo CIA deve-se, provavelmente, ao efeito inibitório específico da PDE4, enzima abundante em linfócitos T, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos (THABET et al., 2016; FRANCISCHI et al., 2000), as principais fontes de TNF- α , assim gerando, como principal consequência, uma inibição mais efetiva dessa citocina. Por sua vez, a PTX não apresenta efeito anti-artrítico significativo, provavelmente por inibir inespecificamente as PDEs. A RUP, por sua vez, inibe a produção e liberação de TNF- α indiretamente, principalmente ao inibir a quimiotaxia de eosinófilos e neutrófilos e a degranulação de mastócitos (MULLOL et al. 2015), mas sem ação sobre PDEs. Assim, considerando esses dados, podemos hipotetizar que a inibição da síntese de TNF- α , decorrente da inibição de PDE4 em suas principais fontes celulares, promove um efeito antiartrítico consistente, enquanto que esse efeito é ausente quando a inibição de PDEs é menos específica e/ou a inibição de TNF- α ocorre em tipos celulares de menor relevância para o processo artrítico. Por outro lado, a administração combinada de ROL+TAL não implica em sinergismo ou potenciação dos efeitos de diminuição da espessura das patas traseiras e recuperação dos níveis de TNF- α , atividade APB na fração solúvel do tecido sinovial e de IL-1 β no líquido

sinovial, observado com a administração isolada de cada uma dessas drogas, o que provavelmente também se deve ao fato de que ambas têm a mesma via principal de ação anti-TNF- α , que é a inibição de PDE4.

Figura 23. Esquema ilustrando a ação anti-TNF- α do rolipram (ROL), talidomida (TAL), pentoxifilina (PTX) e da rupatadina (RUP), com destaque (em vermelho) para o mecanismo diferencial dessa ação aqui hipotetizado como principal responsável pelo efeito antiartrítico de ROL e TAL no modelo CIA.

6. Conclusões

Com base nos resultados obtidos, é possível concluir:

1. Animais artríticos do modelo CIA caracterizam-se pela presença de níveis elevados de TNF- α plasmático e de IL-1 β e IL-6 no líquido sinovial, diminuição de linfócitos, aumento de atividade APB na fração solúvel do tecido sinovial e diminuição na fração solúvel de PBMCs. As características principais identificadas nesses animais artríticos são o aumento da espessura da região plantar em ambas as patas posteriores e as alterações histológicas, caracterizando a presença da doença.
2. A triagem inicial apontou efeito de diminuição da espessura da região plantar das patas traseiras após 30 dias de tratamento com prednisolona crônica isoladamente, ou com prednisolona crônica ou aguda combinada com o MIX, ou com o MIX, ROL e TAL. Essa avaliação também mostrou a diminuição dos níveis de TNF- α e a melhora dos níveis de APB na fração solúvel do tecido sinovial nos tratamentos com MIX, ROL e TAL. Consequentemente, a atividade antiartrítica do MIX foi atribuída a TAL e ROL e ambas as drogas foram selecionadas para uma avaliação diferencial.
3. Na avaliação diferencial, ROL e TAL administradas concomitantemente apresentam os mesmos efeitos antiartríticos que cada uma delas apresenta isoladamente. Porém, TAL recupera os níveis plasmáticos de ambas as transaminases, sugerindo um efeito hepatoprotetor. Além disso, TAL, ROL e ROL+TAL melhoram IL-1 β no líquido sinovial, enquanto a combinação de ROL e TAL se destaca por seu efeito na diminuição de massa corporal.
4. Tendo em conta estes dados, o tratamento isolado com TAL emerge como uma alternativa terapêutica econômica, simples e eficaz para a AR, enquanto a combinação de ROL e TAL pode ser uma opção terapêutica para pacientes com AR que apresentem sobrepeso ou obesidade.

7. Perspectivas

1. Realizar ensaios *in vivo* com doses menores e mesmo tempo de tratamento e com as mesmas doses ou doses menores com maior tempo de tratamento combinado com ROL e TAL, conjunta e isoladamente, para avaliar efeitos adversos e eficácia do tratamento em períodos maiores de tempo (2 ou 3 meses) no modelo CIA;
2. Realizar ensaios *in vitro* com células sinoviais incubadas com ROL e TAL, conjunta e isoladamente, para avaliar mecanismos de ação, toxicidade e efeitos adversos;
3. Avaliar se ROL, TAL, RUP e PTX inibem TNF- α em sinoviócitos, linfócitos T, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos;
4. Avaliar se ROL, TAL, RUP e PTX inibem PDE4 em sinoviócitos, linfócitos T, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos;
5. Avaliar se ROL e TAL inibem APB e LT-A4-H *in vitro* no plasma e na fração solúvel do tecido sinovial e dos PBMCs.

8. Resumo

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune, inflamatória, crônica, sistêmica e de etiologia desconhecida que pode ser induzida experimentalmente em animais por administração de colágeno e adjuvante (CIA). Os medicamentos biológicos contra o fator de necrose tumoral (TNF)- α são indicações terapêuticas atualmente consolidadas para os casos mais severos de AR. As limitações ao uso dessa classe de medicamentos têm sido o alto custo e a dificuldade em fabricar genéricos ou similares com composição, qualidade e desempenho equivalentes na mesma dose e via de administração. O presente estudo avaliou a hipótese de que drogas sintéticas que inibam a produção de TNF- α e / ou fatores relacionados teriam potencial para tornarem-se terapias complementares ou alternativas eficientes para esta doença. Para isso, foram utilizados ratos submetidos ao modelo CIA e tratados cronicamente com pentoxifilina (PTX), rolipram (ROL), talidomida (TAL) e rupatadina (RUP). Um tratamento com prednisolona (PRED) foi também efetuado para avaliar sua influência na eventual ação antiartrítica de PTX, ROL, TAL e RUP, de modo a mimetizar seu efeito imunossupressor, quando administrada agudamente (AG) antes de medicamentos biológicos, bem como pelo seu conhecido efeito anti-inflamatório, quando administrada cronicamente (CR) no tratamento da AR. O desenvolvimento da AR e a efetividade dessas drogas sobre a AR foram avaliadas, de forma seletiva e sequencial, por meio da detecção de eritema e cianose, bem como medidas da espessura da região plantar das patas traseiras, massa corporal, hemograma, TNF- α no plasma, fator reumatoide (FR) e anticorpo antinuclear (ANA) no soro, interleucina (IL)-1 β e IL-6 no soro e líquido sinovial, atividade de aminopeptidase básica (APB) na fração solúvel (FS) do tecido sinovial (TS) e de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), densitometria óssea e análise histológica. A hepatotoxicidade dessas drogas foi avaliada pelas medidas de alanina-transaminase (ALT) e aspartato-transaminase (AST) no plasma. A AR caracterizou-se pelo aumento de TNF- α plasmático e de IL-1 β e IL-6 no líquido sinovial, alterações histológicas na articulação tíbio-tarsal, bem como tumefação da região plantar das patas traseiras, cianose, eritema, diminuição de linfócitos e atividade APB de FS aumentada no TS e diminuída em PBMCs. A AR aumentou ALT e AST. O

tratamento com PRED crônico promoveu um efeito de diminuição da tumefação. O coquetel (MIX de PTX+ROL+RUP+TAL) também apresentou o mesmo efeito. A administração concomitante de PRED AG ou PRED CR com MIX não produziu sinergismo ou potenciação do efeito de diminuição da tumefação da administração isolada do MIX ou da PRED crônica. Além do MIX, ROL e TAL diminuíram a tumefação. MIX, ROL e TAL melhoraram TNF- α no plasma e APB na FS do TS e não causaram hepatotoxicidade, tal como refletido nos níveis de ALT e AST. TAL recuperou ALT e AST, sem alteração do hemograma. Uma vez que PTX e RUP não apresentaram efeito sobre a tumefação, ROL e TAL foram hipotetizados como os prováveis responsáveis pela atividade antiartrítica do MIX. Então, os tratamentos com ROL, TAL e ROL+TAL foram selecionados para avaliação da histologia óssea e medidas de parâmetros diferenciais entre animais controles saudáveis e artríticos. Esta avaliação mostrou que o tratamento isolado da AR com ROL ou TAL não alterou IL-6, mas recuperou IL-1 β no líquido sinovial, efeitos esses que não se diferenciaram do tratamento combinado de ROL+TAL, exceto pelo fato de que essa combinação também diminuiu a massa corporal. TAL se destacou por seu efeito hepatoprotetor nos animais AR. Considerando os efeitos conhecidos de RUP, PTX, TAL e ROL é possível hipotetizar que a ação antiartrítica de TAL e ROL deve-se à inibição da síntese de TNF- α decorrente da inibição de PDE4 em suas principais fontes celulares. Os dados deste estudo prospectivo fornecem subsídios adicionais que estimulam a realização de novos ensaios clínicos, mais amplos e sistematizados, sobre os efeitos antiartríticos de ROL e TAL. Conclui-se que o uso isolado de TAL emerge como uma alternativa terapêutica econômica, simples e eficaz para a AR, enquanto a combinação de ROL+TAL pode ser uma opção viável para portadores de AR com sobrepeso ou obesidade.

Palavras-chave: Artrite Reumatoide, Drogas Anti-TNF- α , Novas Terapias, Novos Usos para Velhas Drogas, Reposicionamento de Drogas.

10. Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune, inflammatory, chronic and systemic disease with unknown etiology that can be experimentally induced in animals by administration of collagen and adjuvant (CIA). Biological drugs against tumor necrosis factor (TNF)- α are therapeutic indications currently consolidated for the most severe cases of RA. The limitations for the use of this class of drugs have been the high cost and the difficulty to manufacture a generic or similar ones with equivalent composition, quality and performance under the same dosage and route of administration. The present study evaluated the hypothesis that synthetic drugs that inhibit the production of TNF- α and/or related factors would have potential to become efficient complementary or alternative therapies for this disease. For this purpose, male rats submitted to the CIA model were chronically treated with pentoxifylline (PTX), rolipram (ROL), thalidomide (TAL) and rupatadine (RUP). The treatment with prednisolone (PRED) was also performed to evaluate its influence on the possible antiarthritic action of PTX, ROL, TAL and RUP, in order to mimic its immunosuppressive effect when acutely (AG) administered prior to biological drugs, as well as due to its known anti-inflammatory effect when administered chronically (CR) to treat RA. The development of RA and the efficacy of these drugs on RA were evaluated, by selective and sequential ways, through the detection of erythema and cyanosis, as well as measurements of plantar thickness of hind paws, body mass, hemogram, plasma TNF- α , rheumatoid factor (FR) and anti-nuclear antibody (ANA) in serum, interleukin (IL)-1 β and IL-6 in serum and synovial fluid, basic aminopeptidase activity (APB) in soluble fraction (FS) from synovial tissue (TS) and from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), bone densitometry and histological analysis. The hepatotoxicity of these drugs was evaluated by measurements of alanine-transaminase (ALT) and aspartate-transaminase (AST). RA was characterized by increased TNF- α in plasma and IL-1 β and IL-6 in synovial fluid, histological alterations in the tibio-tarsal joint, as well as increased thickness of hind paws, cyanosis, erythema, decreased lymphocyte number and increased APB activity in TS and decreased APB activity in PBMCs. RA produced increased ALT and AST. As expected, the chronic treatment with PRED promoted a decreased of tumefaction.

The cocktail (MIX of PTX+ROL+RUP+TAL) also presented this same effect. Concomitant administration of acute or chronic PRED with MIX did not produce synergism or potentiation of the effect on the tumefaction due to the single administration of MIX or chronic PRED. In addition to MIX, ROL and TAL were also decreased the tumefaction. MIX, ROL and TAL ameliorated plasma TNF- α and APB in FS from TS without hepatotoxicity, as reflected by ALT and AST levels. TAL recovered ALT and AST, but it did not affect the hemogram. Since PTX and RUP did not present effects on the tumefaction, ROL and TAL were hypothesized as probable responsible for the antiarthritic activity of MIX. Thus, the treatments with ROL, TAL and ROL+TAL were selected for evaluation of bone histology and measurements of differential parameters between healthy control and arthritic animals. This evaluation showed that the treatment of RA with ROL or TAL alone did not alter IL-6 levels, but recovered IL-1 β in the synovial fluid. Both these effects were not different from those of the concomitant treatment with ROL+TAL, except that this combination also decreases the body mass. TAL stands out for its hepatoprotective effect in RA animals. Considering the known effects of RUP, PTX, TAL and ROL it can be hypothesized that antiarthritic action of TAL and ROL is due to the inhibition of TNF- α synthesis as consequence of its inhibition in its main cellular sources by PDE4. Data from this prospective study provide additional subsidies that stimulate further and more comprehensive clinical trials on the antiarthritic effects of ROL and TAL. In conclusion, the treatment with TAL alone emerges as an economical, simple and effective therapeutical alternative for RA, while the combination of ROL+TAL can be a viable option for RA sufferers with overweight or obesity.

Keywords: Rheumatoid Arthritis, Anti-TNF- α Drugs, New Therapies, New Use for Old Drugs, Drug Repositioning.

11. Referências Bibliográficas

ABDEL-SALAM, OM.; BAIUOMY, AR.; EL-SHENAWY, SM.; ARBID, MS. The anti-inflammatory effects of the phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline in the rat. **Pharmacol Res.** 2003;47(4):331-40.

ABDULGHANI S.; CAETANO-LOPES, J.; CANHÃO, H.; FONSECA, JE. Biomechanical effects of inflammatory diseases on bone-rheumatoid arthritis as a paradigm. **Autoimmun Rev.** 2009;8(8):668-71. doi: 10.1016/j.autrev.2009.02.021.

ABELES, AM.; ABELES, M. The clinical utility of a positive antinuclear antibody test result. **The American journal of medicine.** 2013;126(4):342-348.

AFONINA, IS.; MÜLLER, C.; MARTIN, SJ.; BEYAERT, R. Proteolytic processing of interleukin-1 family cytokines: variations on a common theme. **Immunity.** 2015;42(6):991-1004. doi: 10.1016/j.immuni.2015.06.003.

AGARWAL, SK. Biologic agents in rheumatoid arthritis: an update for managed care professionals. **J Manag Care Pharm.** 2011;17(9 Suppl B):S14–18. doi:10.18553/jmcp.2011.17.s9-b.S14

AGGARWAL, BB.; GUPTA, SC.; KIM, JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: twenty-five years later, a golden journey. **Blood.** 2011;119(3):651–665. doi: 10.1182/blood-2011-04-325225

AGGARWAL, BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. **Nat Rev Immunol.** 2003;3(9):745–756. doi: 10.1038/nri1184

AITHAL, GP. Hepatotoxicity related to antirheumatic drugs. **Nature Reviews Rheumatology.** 2011;7(3):139-150.

ALETAHA, D.; BLÜML, S. Therapeutic implications of autoantibodies in rheumatoid arthritis. **RMD Open.** 2016;2(1):e000009. doi: 10.1136/rmdopen-2014-000009

ALEXANDRE-MOREIRA, MS.; TAKIYA, CM.; DE ARRUDA, LB.; PASCARELLI, B. et al. LASSBio-468: a new achiral thalidomide analogue which modulates TNF- α and NO production and inhibits endotoxic shock and arthritis in an animal model. **Int Immunopharmacol.** 2005;5(3):485-94.

ANDERSON, LEIGH ANN. Looking Ahead: Pharma Projections for 2016 - & Beyond, 2016. Disponível em: <<https://www.drugs.com/slideshow/looking-ahead-pharma-projections-for-2016-and-beyond-1230>>. Acessado em: 18/07/2017.

ANDERSON, GD.; KEYS, KL.; DE CIECHI, PA.; MASFERRER, JL. Combination therapies that inhibit cyclooxygenase-2 and leukotriene synthesis prevent disease in murine collagen induced arthritis. **Inflamm Res.** 2009;58:109-117. doi: 10.1007/s00011-009-8149-3

ASKLING J.; FORED, CM.; BRANDT, L.; BAECKLUND, E. et al. Time-dependent increase in risk of hospitalisation with infection among Swedish RA patients treated with TNF antagonists. **Ann Rheum Dis.** 2007;66:1339–44. doi: 10.1136/ard.2006.062760

ASSIER, E.; BOISSIER, MC.; DAYER, JM. Interleukin-6: from identification of the cytokine to development of targeted treatments. **Joint Bone Spine.** 2010;77(6):532-6. doi: 10.1016/j.jbspin.2010.07.007.

ATZENI, F.; GIANURCO, L.; TALOTTA, R.; VARISCO, V. et al. Investigating the potential side effects of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis: cause for concern? **Immunotherapy.** 2015;7(4):353-61. doi: 10.2217/IMT.15.4.

ATZENI, F.; BENUCCI, M.; SALLÌ, S.; BONGIOVANNI, S. et al. Different effects of biological drugs in rheumatoid arthritis. **Autoimmun Rev.** 2013;12(5):575-9. doi: 10.1016/j.autrev.2012.10.020.

BAETEN, D.; DEMETTER, P.; CUVELIER, C.; VAN DEN BOSCH, F. et al. Comparative study of the synovial histology in rheumatoid arthritis, spondyloarthropathy, and osteoarthritis: influence of disease duration and activity. **Ann Rheum Dis.** 2000;59(12):945-53.

BAKER, JF.; TAN, YK.; CONAGHAN, PG. Monitoring in established RA: Role of imaging and soluble biomarkers. **Best Pract Res Clin Rheumatol.** 2015;29(4-5):566-79. doi:10.1016/j.berh.2015.09.002

BALOGH, A.; CADEL, S.; FOULON, T.; PICART, R. et al. Aminopeptidase B: a processing enzyme secreted and associated with the plasma membrane of rat pheochromocytoma (PC12) cells. **J Cell Sci.** 1998;111:161–169.

BANJI, D.; PINNAPUREDDY, J.; BANJI, OJ.; SAIDULU, A. et al. Synergistic activity of curcumin with methotrexate in ameliorating Freund's Complete Adjuvant induced arthritis with reduced hepatotoxicity in experimental animals. **European journal of pharmacology.** 2011;668(1):293-298. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.06.006>

BASTOS, FST. **Talidomida: A Fénix renascida das cinzas.** 2013. 115 f. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação) – Mestre em ciências farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2013.

BARRA, L.; POPE, J.; BESSETTE, L.; HARAOU, B. et al. Lack of seroconversion of rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide in patients with early inflammatory arthritis: a systematic literature review. **Rheumatology.** 2011;50(2):311-316.

BERTAZZOLO, N.; PUNZI, L.; STEFANI, MP.; CESARO, G. et al. Interrelationships between interleukin (IL)-1, IL-6 and IL-8 in synovial fluid of various arthropathies. **Agents Actions.** 1994;41(1-2):90-2.

BERTHON, BS.; MACDONALD-WICKS, LK.; WOOD, LG. A systematic review of the effect of oral glucocorticoids on energy intake, appetite, and body weight in humans. **Nutr Res.** 2014;34(3):179-90. doi: 10.1016/j.nutres.2013.12.006.

BERTOLAMI, MC. Mechanisms of hepatotoxicity. **Arq. Bras. Cardiol.** 2005;85(suppl.5):25-7.

BESSLER, H.; GILGAL, R.; DJALDETTI, M.; ZAHAVI, I. Effect of pentoxifylline on the phagocytic activity, cAMP levels, and superoxide anion production by monocytes and polymorphonuclear cells. **J Leukoc Biol.** 1986;40:747–54.

BIANCHI, WA. Terapia biológica em artrite reumatoide. **JBM - Jornal Brasileiro de Medicina.** 2012;100(2):57-65.

BIELEKOVA, B., LINCOLN, A., MCFARLAND, H., MARTIN, R. Therapeutic potential of phosphodiesterase-4 and-3 inhibitors in Th1-mediated autoimmune diseases. **The Journal of Immunology.** 2000;164(2):1117-24.

BIENVENU, J.; DOCHE, C.; GUTOWSKI, MC.; LENOBLE, M. et al. Production of proinflammatory cytokines and cytokines involved in the Th1/Th2 balance is modulated by pentoxifylline. **Journal of cardiovascular pharmacology.** 1995;25:S80-S84.

BIJLSMA, JW.; JACOBS, JW.; BUTTGEREIT, F. Glucocorticoid-targeted therapies for the treatment of rheumatoid arthritis. **Clin Exp Rheumatol.** 2015;33(4 Suppl 92):S34-S36.

BLUE, ML.; CONRAD, P.; WEBB, DL.; SARR, T. et al. Interacting monocytes and synoviocytes induce adhesion molecules by a cytokine-regulated process. **Lymphokine Cytokine Res.** 1993;12:213–8.

BOISSIER, MC.; SEMERANO, L.; CHALLAL, S.; SAIDENBERG-KERMANACH, N. et al. Rheumatoid arthritis: from autoimmunity to synovitis and joint destruction. **J Autoimmun.** 2012;39(3):222-8. doi: 10.1016/j.jaut.2012.05.021

BOMBINI, G., CANETTI, C.; ROCHA, FA.; CUNHA, FQ. Tumour necrosis factor- α mediates neutrophil migration to the knee synovial cavity during immune inflammation. **European journal of pharmacology.** 2004;496(1-3):197-204. doi: 10.1016/j.ejphar.2004.06.003

BONGARTZ, T.; SUTTON, AJ.; SWEETING, MJ.; BUCHAN, I. et al. Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials. **JAMA.** 2006;295(19):2275-85.

BORASHAN, FA.; ILKHANIPOOR, M.; HASHEMI, M.; FARROKHI, F. Investigation the effects of curcumin on serum hepatic enzymes activity in a rheumatoid arthritis model. **Electronic Journal of Biology.** 2009;4(4):129-33.

BRADFORD, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** 1976;72:248-54.

BRENNER, D.; BLASER, H.; MAK, TW. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. **Nat Rev Immunol.** 2015;15(6):362-74. doi: 10.1038/nri3834

BRZUSTEWICZ, E.; BRYL, E. The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis—Practical and potential application of cytokines as biomarkers and targets of personalized therapy. **Cytokine.** 2015;76(2):527-36. doi: 10.1016/j.cyto.2015.08.260

BUBLIKOV, DS.; ANDRIENKO, AV.; LYCHEV, VG.; ANCHUGINA, DA. AB0384 The Effects of Pentoxifylline on Rheumatoid Arthritis Activity According To The DAS28 CRP Disease Activity Score. **Annals of the Rheumatic Diseases.** 2016;75:1036. doi: <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-eular.2692>

BURTIS, C.; ASHWOOD, E. **Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry.** Elsevier Health Sciences. 2005(5):1091.

CABAL-HIERRO, L.; LAZO, PS. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. **Cell Signal.** 2012;24(6):1297-305. doi: 10.1016/J.CELLSIG.2012.02.006

CADEL, S.; DARMON, C.; PERNIER, J.; HERVÉ, G. et al. The M1 family of vertebrate aminopeptidases: role of evolutionarily conserved tyrosines in the enzymatic mechanism of aminopeptidase B. **Biochimie.** 2015;109:67-77.

CADEL, S.; PIESSE, C.; PHAM, VL.; PERNIER, J. et al. Aminopeptidase B. In *Handbook of Proteolytic Enzymes* (RAWLINGS, N D.; SALVESEN, GS. Eds.) 3rd ed. 2013:473–479, Academic Press, London.

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

CALABRESE, L; FLEISCHER, AB. Thalidomide: current and potential clinical applications. **Am J Med.** 2000;108(6):487-95. doi: [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(99\)00408-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(99)00408-8)

CAMUSSI, G.; LUPIA, E. The future role of anti-tumour necrosis factor (TNF) products in the treatment of rheumatoid arthritis. **Drugs.** 1998;55(5):613-20. doi:10.2165/00003495-199855050-00001

CAPORALI, R.; TODOERTI, M.; SCIRÈ, CA.; MONTECUCCO, C. et al. ORAL low-dose glucocorticoids should be included in any recommendation for the use of non-biologic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs in the treatment of rheumatoid arthritis. **Neuroimmunomodulation.** 2015;22(1-2):104-11.

CAPORALI, R.; TODOERTI, M.; SAKELLARIOU, G.; MONTECUCCO, C. Glucocorticoids in rheumatoid arthritis. **Drugs**. 2013;73(1):31-43. doi: 10.1007/S40265-013-0008-4

CHEN, JY.; WU, HX.; CHEN, Y.; ZHANG, LL. et al. Paeoniflorin inhibits proliferation of fibroblast-like synoviocytes through suppressing G-protein-coupled receptor kinase 2. **Planta Med**. 2012a;78(7):665–671. doi: 10.1055/s-0031-1298327

CHEN, R. ; TAO, Y. ; QIU, K. ; HUANG, W. et al. [Association of circulating Treg cells with disease activity in patients with rheumatoid arthritis]. [Article in Chinese] **Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao**. 2012b;32(6):886-9.

CHITTA, KS.; STENTZ, CL.; DAVEY, MP.; CARR, DW. TNF- α production, triggered by the interaction of IL-15 treated T-cells with macrophages, is blocked by rolipram. **Arthritis & Rheumatism**. 1998;41(9):S296.

CHO, YG.; CHO, ML.; MIN, SY.; KIM, HY. Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis. **Autoimmun Rev**. 2007;7(1):65-70. doi: 10.1016/j.autrev.2007.08.001

CHO, JY.; PARK, JS.; BAIK, KU.; LEE, JG. et al. Differential effect of phosphodiesterase IV inhibitor RP73401 on various inflammatory and immune responses relevant to rheumatoid arthritis. **Pharmacol Res**. 2004;49(5):423-31. doi: 10.1016/j.phrs.2003.11.003

CHU, WM. Tumor necrosis factor. **Cancer Lett**. 2013;328:222–225. doi:10.1016/j.canlet.2012.10.014

CHURCH, MK. Efficacy and tolerability of rupatadine at four times the recommended dose against histamine-and platelet-activating factor-induced flare responses and ex vivo platelet aggregation in healthy males. **British Journal of Dermatology**. 2010;163(6):1330-1332.

CORRÊA, JOA. **Efeito da Talidomida e da Pentoxifilina na produção de mediadores inflamatórios e na patogênese da encefalomielite autoimune experimental (EAE)**. 2008. 95 f. Trabalho de conclusão de curso (Tese) – Doutorado em patologia, Universidade Federal Fluminense , Rio de Janeiro, 2008.

COMBE, B. Thalidomide: new indications? **Joint Bone Spine**. 2001;68(6):582–587. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S1297-319X(01)00326-8

CREMER, MA.; ROSLONIEC, EF.; KANG, AH. The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease. **J Mol Med (Berl)**. 1998;76(3-4):275-88.

CRILLY, A.; ROBERTSON, SE.; REILLY, JH.; GRACIE, JA. et al. Phosphodiesterase 4 (PDE4) regulation of proinflammatory cytokine and chemokine release from rheumatoid synovial membrane. **Ann Rheum Dis**. 2011;70(6):1130-7. doi: 10.1136/ard.2010.134825.

CROFT, M.; BENEDICT, CA.; WARE, CF. Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies. **Nat Rev Drug Discov**. 2013;12(2):147-68. doi: 10.1038/nrd3930

CURTIS, JR.; VAN DER HELM-VAN MIL, AH.; KNEVEL, R.; HUIZINGA, TW. et al. Validation of a novel multibiomarker test to assess rheumatoid arthritis disease activity. **Arthritis Care Res (Hoboken)**. 2012;64(12):1794-1803. doi: 10.1002/acr.21767

CURTIS, JR.; XIE, F.; CHEN, L.; BADDLEY, JW. et al. The comparative risk of serious infections among rheumatoid arthritis patients starting or switching biological agents. **Ann Rheum Dis**. 2011;70(8):1401-6. doi: 10.1136/ard.2010.146365.

CURTIS, JR.; JAIN, A.; ASKLING, J.; BRIDGES, SL Jr. et al. A comparison of patient characteristics and outcomes in selected European and U.S. rheumatoid arthritis registries. **Semin Arthritis Rheum.** 2010;40(1):2-14.e1. doi: 10.1016/j.semarthrit.2010.03.003.

CUZZOCREA, S.; MAZZON, E.; DI PAOLA, R.; GENOVESE, T. et al. Synergistic interaction between methotrexate and a superoxide dismutase mimetic: pharmacologic and potential clinical significance. **Arthritis Rheum.** 2005;52(12):3755-60. doi: 10.1002/art.21480

DAÏEN, CI.; SELLAM, J. Obesity and inflammatory arthritis: impact on occurrence, disease characteristics and therapeutic response. **RMD open.** 2015;1(1):e000012. doi: 10.1136/rmdopen-2014-000012

DAIEN, CI.; GAILHAC, S.; MURA, T.; AUDO, R. et al. Regulatory B10 cells are decreased in patients with rheumatoid arthritis and are inversely correlated with disease activity. **Arthritis Rheumatol.** 2014;66(8):2037-46. doi: 10.1002/art.38666.

DAKHALE, GN.; SHINDE, AT.; MAHATME, MS.; HIWARE, SK, et al. Clinical effectiveness and safety of cetirizine versus rupatadine in chronic spontaneous urticaria: a randomized, double-blind, 6-week trial. **Int J Dermatol.** 2014;53(5):643-9. doi: 10.1111/ijd.12250.

DALE, DC.; FAUCI, AS.; ; WOLFF, SM. Alternate-day prednisone: leukocyte kinetics and susceptibility to infections. **New England Journal of Medicine.** 1974;291(22):1154-8. doi: 10.1056/NEJM197411282912203

DELGADO, C.E.; COELHO, M.; DOMINGOS, M.; COLAÇO, I.; VELOSO, B. Hepatite tóxica medicamentosa. **Medicina Interna.** 1999;6(2):107-110.

DENG, X. ZHANG, J.; ZHANG, J.; HUANG, F. Thalidomide reduces recurrence of ankylosing spondylitis in patients following discontinuation of etanercept. **Rheumatol Int.** 2013;33(6):1409-13. doi: 10.1007/s00296-012-2571-5

DE RYCKE, L., PEENE, ISABELLE.; HOFFMAN, IEA.; KRUIHOF, E. et al. Rheumatoid factor and anticitrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: diagnostic value, associations with radiological progression rate, and extra-articular manifestations. **Annals of the rheumatic diseases.** 2004;63(12):1587-93. doi: 10.1136/ard.2003.017574

DINARELLO, CA.; SIMON, A.; VAN DER MEER, JW. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. **Nat Rev Drug Discov.** 2012;11(8):633-52. doi: 10.1038/nrd3800

DOBRTZSCH, D.; LINDH, I.; UYSAL, H.; NANDAKUMAR, KS. et al. Crystal structure of an arthritogenic anticollagen immune complex. **Arthritis Rheum.** 2011;63(12):3740-8. doi: 10.1002/art.30611

DOSEYICI, S.; MEHMETOGLU, I.; TOKER, A.; YERLIKAYA, FH. et al. The effects of forskolin and rolipram on cAMP, cGMP and free fatty acid levels in diet induced obesity. **Biotech Histochem.** 2014;89(5):388-92. doi: 10.3109/10520295.2014.883463

DUBOST, JJ.; SOUBRIER, M.; RISTORI, JM.; BEAUJON, G. et al. An open study of the anti-TNF alpha agent pentoxifylline in the treatment of rheumatoid arthritis. **Rev Rhum Engl Ed.** 1997;64(12):789-93.

EICHENFIELD, LF.; STEIN GOLD, LF. Addressing the immunopathogenesis of atopic dermatitis: advances in topical and systemic treatment. **Semin Cutan Med Surg.** 2017;36(2 Suppl 2):S45-S48. doi: 10.12788/j.sder.2017.012.

ELVIN, JG.; COUSTON, RG.; VAN DER WALLE, CF. Therapeutic antibodies: market considerations, disease targets and bioprocessing. **Int J Pharm.** 2013;440(1):83-98. doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.12.039

ENG, GP.; BOUCHELOUCHE, P.; BARTELS, EM.; BLIDDAL, H. et al. Anti-Drug Antibodies, Drug Levels, Interleukin-6 and Soluble TNF Receptors in Rheumatoid Arthritis Patients during the First 6 Months of Treatment with Adalimumab or Infliximab: A Descriptive Cohort Study. **PLoS One**. 2016;11(9):e0162316. doi: 10.1371/journal.pone.0162316

ERLANDSSON-HARRIS, H.; LILJESTRÖM, M.; KLARESKOG, L. Characteristics of synovial fluid effusion in collagen-induced arthritis (CIA) in the DA rat; a comparison of histology and antibody reactivities in an experimental chronic arthritis model and rheumatoid arthritis (RA). **Clin Exp Immunol**. 1997;107(3):480-484.

FELDMANN, M.; MAINI, RN. Anti-TNF α therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? **Annu Rev Immunol**. 2001;19:163–196. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.163

FELQUER, MLA.; SORIANO, ER. New treatment paradigms in psoriatic arthritis: an update on new therapeutics approved by the US Food and Drug Administration. **Current opinion in rheumatology**. 2015;27(2):99-106. doi:10.1097/BOR.0000000000000151

FISCHBACH, F. Manual de Enfermagem: Exames laboratoriais e diagnósticos, 7 ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

FOEY, AD.; FIELD, S.; AHMED, S.; JAIN, A. et al. Impact of VIP and cAMP on the regulation of TNF- α and IL-10 production: implications for rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther**. 2003;5:R317. doi: 10.1186/ar999

FLORES-BORJA, F.; BOSMA, A.; NG, D.; REDDY, V. et al. CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. **Sci Transl Med**. 2013;5(173):173ra23. doi: 10.1126/scitranslmed.3005407.

FONSECA, JE.; SANTOS, MJ.; CANHÃO, H.; CHOY, E. Interleukin-6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction. **Autoimmun Rev**. 2009;8(7):538-42. doi: 10.1016/j.autrev.2009.01.012.

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

FRANCIS, SH.; BLOUNT, MA.; CORBIN, JD. Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions. **Physiological Reviews**. 2011;91:651-690. doi: 10.1152/physrev.00030.2010

FRANCISCHI, JN.; YOKORO, CM.; POOLE, S.; TAFURI, WL. et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of the phosphodiesterase 4 inhibitor rolipram in a rat model of arthritis. **Eur J Pharmacol**. 2000;399(2-3):243-9.

GARCÍA-DE LATORRE, I.; GARCÍA-VALLADARES, I. Antinuclear antibody (ANA) testing in patients treated with biological DMARDs: is it useful? **Curr Rheumatol Rep**. 2015;17(4):23. doi: 10.1007/s11926-015-0500-9.

GARNER, R.; DING, T.; DEIGHTON, C. Management of rheumatoid arthritis. **Medicine**. 2014;42:5.

GAVRILĂ, BI.; CIOFU, C.; STOICA, V. Biomarkers in Rheumatoid Arthritis, what is new? **J Med Life**. 2016;9(2):144-48.

GENAIN, CP.; ROBERTS, T.; DAVIS, RL.; NGUYEN, MH. et al. Prevention of autoimmune demyelination in non-human primates by a cAMP-specific phosphodiesterase inhibitor. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1995;92(8):3601-05.

GENOVESE, MC.; JAROSOVA, K.; CIEŚLAK, D.; ALPER, J. et al. Apremilast in Patients With Active Rheumatoid Arthritis: A Phase II, Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Parallel-Group Study. **Arthritis & Rheumatology**. 2015;67(7):1703-10. doi: 10.1002/art.39120.

GEORGESCU, EF; GEORGESCU, M. Therapeutic options in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Are all agents alike? Results of a preliminary study. **Gastrointestin Liver Dis**. 2007;16:39–46.

GHOSH, R.; SAWANT, O.; GANPATHY, P.; PITRE, S. et al. Phosphodiesterase inhibitors: their role and implications. **International Journal of PharmTech Research, Mumbai**. 2009;1(4):1148-60.

GRAGE-GRIEBENOW, E.; BARAN, J.; LOPPNOW, H.; LOS, M. et al. An Fcγ receptor I (CD64)-negative subpopulation of human peripheral blood monocytes is resistant to killing by antigen-activated CD4-positive cytotoxic T cells. **European journal of immunology**. 1997;27(9):2358-65. doi: 10.1002/eji.1830270934

GROZDANOVA, A.; NETKOVSKA, KA.; STERJEV, Z.; NAUMOVSKA, Z. et al. Biosimilar medical products - licensing, pharmacovigilance and interchangeability. **Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki)**. 2016;37(1):27-36. doi: 10.1515/prilozi-2016-0006

GRZELEWSKA-RZYMOWSKA, I.; GÓRSKI, P. Rupatadine: a novel second-generation antihistamine. **Post Dermatol Alergol**. 2011;XXVIII(6):480–8.

GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ, O.; STARUSTA-BACAL, P.; GUTIÉRREZ-MONTES, O. Treatment of refractory rheumatoid arthritis--the thalidomide experience. **J Rheumatol**. 1989;16(2):158-63.

GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ, O. Thalidomide. A promising new treatment for rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**. 1984;27(10):1118-21.

HAEGGSTRÖM, JZ. Structure, function, and regulation of leukotriene A4 hydrolase. **Am J Respir Crit Care Med**. 2000;161:S25-31. doi: 10.1164/ajrccm.161.supplement_1.lttta-6

HAN, J.; HUEZ, G.; BEUTLER, B. Interactive effects of the tumor necrosis factor promoter and 3'-untranslated regions. **J Immunol**. 1991;146:1843–8.

Harris Jr., ED. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. **N. Engl. J. Med**. 1990;322:1277–89. doi: 10.1056/NEJM199005033221805

HARTMANN, G.; BIDLINGMAIER, C.; SIEGMUND, B.; ALBRICH, S. et al. Specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram mitigates experimental colitis in mice. **J Pharmacol Exp Ther**. 2000;292(1):22-30.

HASHIMOTO, A.; ENDO, H.; HAYASHI, I.; MURAKAMI, Y. et al. Differential expression of leukotriene B4 receptor subtypes (BLT1 and BLT2) in human synovial tissues and synovial fluid leukocytes of patients with rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**. 2003;30:1712-1718.

HAUSCHILD, A.; KROEGER, H.; MITCHISON, NA.; UGRINOVIC, S. et al. Thalidomide therapy of established collagen-induced arthritis (CIA) not accompanied by an evident Th2 shift. **Clin Exp Immunol**. 1997;108(3):428-31

HEFFELFINGER, SC. The renin angiotensin system in the regulation of angiogenesis. **Curr Pharm Des**. 2007;13:1215-29.

HEIMANS, L.; VAN DEN BROEK, M.; LE CESSIE, S.; SIEGERINK, B. et al. Association of high body mass index with decreased treatment response to combination therapy in recent-onset rheumatoid arthritis patients. **Arthritis Care Res (Hoboken)**. 2013;65(8):1235-42. doi: 10.1002/acr.21978.

HIETALA, MA.; NANDAKUMAR, KS.; PERSSON, L.; FAHLÉN, S. et al. Complement activation by both classical and alternative pathways is critical for the effector phase of arthritis. **Eur J Immunol.** 2004;34(4):1208-16. doi: 10.1002/eji.200424895

HITCHON, CA.; EL-GABALAWY, HS. Suppl 1: The Synovium in Rheumatoid Arthritis. **The Open Rheumatology Journal.** 2011;5:(Suppl 1:M3)107-14.

HU, Y.; CHENG, W.; CAI, W.; YUE, Y. et al. Advances in research on animal models of rheumatoid arthritis. **Clin Rheumatol.** 2013;32:161–165. doi: 10.1007/s10067-012-2041-1

HUANG, H.; WANG, YJ.; ZHANG, QY.; LIU, B. et al. Hepatoprotective effects of baicalein against CCl₄-induced acute liver injury in mice. **World J Gastroenterol.** 2012;18(45):6605-13. doi: 10.3748/wjg.v18.i45.6605.

HUANG, Z. ; MANCINI, JA. Phosphodiesterase 4 inhibitors for the treatment of asthma and COPD. **Curr Med Chem.** 2006;13(27):3253-62.

HUANG, Z.; DUCHARME, Y.; MACDONALD, D.; ROBICHAUD, A. The next generation of PDE4 inhibitors. **Current Opinion in Chemical Biology.** 2001;5(4):432–8.

HUI, M.; HUI, KS. A novel aminopeptidase with highest preference for lysine. **Neurochemical Research.** 2006;31(1):95-102. doi: 10.1007/s11064-005-9234-9

HUIZINGA, TW.; DIJKMANS, BA.; VAN DER VELDE, EA.; VAN DE POUW KRAAN, TC. et al. An open study of pentoxifylline and thalidomide as adjuvant therapy in the treatment of rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis.** 1996;55(11):833-6.

HUNG, DY.; SIEBERT, GA.; CHANG, P.; WHITEHOUSE, MW. et al. Hepatic pharmacokinetics of propranolol in rats with adjuvant-induced systemic inflammation. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** 2006;290(2):G343-51.

HWANGA, S.; HOOKA, V. Zinc regulation of aminopeptidase B involved in neuropeptide production. **FEBS Letters.** 2008;582:2527-31. doi: 10.1016/j.febslet.2008.06.017

ISHII, O.; YAMADA, H.; OHYA, S.; MORIUCHI, E. et al. [Remission induction after pentoxifylline treatment in a patient with rheumatoid arthritis]. [Article in Japanese] **Ryumachi.** 1997;37(6):810-5.

ISHIKAWA, LL.; COLAVITE, PM.; FRAGA-SILVA, TF.; MIMURA, LA. et al. Vitamin D Deficiency and Rheumatoid Arthritis. **Clin Rev Allergy Immunol.** 2017;52(3):373-388. doi: 10.1007/s12016-016-8577-0

ISRAËL, A. The IKK complex, a central regulator of NF- κ B activation. **Cold Spring Harbor perspectives in biology.** 2010;2(3):a000158.

JEFFERY, RC. Clinical features of rheumatoid arthritis. **Medicine.** 2014;42(5):231–236. doi:10.1016/j.mpmed.2014.02.011

JENEI-LANZL, Z.; ZWINGENBERG, J.; LOWIN, T.; ANDERS, S. et al. Proinflammatory receptor switch from G α s to G α i signaling by β -arrestin-mediated PDE4 recruitment in mixed RA synovial cells. **Brain Behav Immun.** 2015;50:266-74. doi: 10.1016/j.bbi.2015.07.020.

JIANG, D.; JIANG, DX.; ZHANG, MH.; ZHANG, Q. et al. Influence of gallic acid on porcine neutrophils phosphodiesterase 4, IL-6, TNF- α and rat arthritis model. **Journal of Integrative Agriculture.** 2015;14(4):758–764. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60824-8

KASYAPA CS.; STENTZ, CL.; DAVEY, MP.; CARR, DW. Regulation of IL-15-stimulated TNF- α production by rolipram. **J Immunol.** 1999;163(5):2836-43.

- KATIYAR, S.; PRAKASH, S. Pharmacological profile, efficacy and safety of rupatadine in allergic rhinitis. **Prim Care Respir J.** 2009;18(2):57-68. doi: 10.3132/pcrj.2008.00043.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptor downstream signaling. **Arthritis Res Ther.** 2005;7:12-19.
- KEESAL, N.; WASSERMAN, MJ.; BOOKMAN, A.; LAPP, V. et al. Thalidomide in the treatment of refractory rheumatoid arthritis. **J Rheumatol.** 1999;26(11):2344-7.
- KIM, YH.; KANG, JS. Micro-computed tomography evaluation and pathological analyses of female rats with collagen-induced arthritis. **J Vet Sci.** 2015;16(2):165-71.
- KIM, YS.; KIM, JS.; JUNG, HC.; SONG, IS. The effects of thalidomide on the stimulation of NF-kappaB activity and TNF-alpha production. **Mol Cells.** 2004;17:210-6.
- KOBAYASHI, K.; SUDA, T.; MANABE, H.; MIKI, I. Administration of PDE4 inhibitors suppressed the *pannus*-like inflammation by inhibition of cytokine production by macrophages and synovial fibroblast proliferation. **Mediators Inflamm.** 2007;2007:58901. doi: 10.1155/2007/58901.
- KNOERZER, DB.; DONOVAN, MG.; SCHWARTZ, BD.; MENGLE-GAW, LJ. Clinical and histological assessment of collagen-induced arthritis progression in the diabetes-resistant BB/Wor rat. **Toxicol Pathol.** 1997;25(1):13-19.
- KOCIJAN, R.; FINZEL, S.; ENGLBRECHT, M.; ENGELKE, K. et al. Decreased quantity and quality of the periarticular and nonperiarticular bone in patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional HR-pQCT study. **J Bone Miner Res.** 2014;29:1005-14. doi: 10.1002/jbmr.2109
- KONISTI, S.; KIRIAKIDIS, S.; PALEOLOG, EM. Hypoxia--a key regulator of angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis. **Nat Rev Rheumatol.** 2012;31;8(3):153-62. doi: 10.1038/nrrheum.2011.205
- KORHONEN, R.; HÖMMÖ, T.; KERÄNEN, T.; LAAVOLA, M. et al. Attenuation of TNF production and experimentally induced inflammation by PDE4 inhibitor rolipram is mediated by MAPK phosphatase-1. **Br J Pharmacol.** 2013;169(7):1525-36. doi: 10.1111/bph.12189.
- KOURILOVITCH, M.; GALARZA-MALDONADO, C.; ORTIZ-PRADO, E. Diagnosis and classification of rheumatoid arthritis. **Journal of Autoimmunity.** 2014;48-49:26-30. doi: 10.1016/j.jaut.2014.01.027
- KRETH, S.; LEDDEROSE, C.; LUCHTING, B.; WEIS, F. et al. Immunomodulatory properties of pentoxifylline are mediated via adenosine-dependent pathways. **Shock.** 2010;34(1):10-6. doi: 10.1097/SHK.0b013e3181cdc3e2.
- KRÖGER, H.; MIESEL, R.; DIETRICH, A.; OHDE, M. et al. Synergistic effects of thalidomide and poly (ADP-ribose) polymerase inhibition on type II collagen-induced arthritis in mice. **Inflammation.** 1996;20(2):203-15.
- KUMAR, V; ABBAS, A; FAUSTO, N. **Patologia – Bases patológicas das doenças.** 7 ed, Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.
- KUNCHA, M.; NAIDU, VG.; SAHU, BD.; GADEPALLI, SG. et al. Curcumin potentiates the anti-arthritis effect of prednisolone in Freund's complete adjuvant-induced arthritic rats. **J Pharm Pharmacol.** 2014;66(1):133-44. doi: 10.1111/jphp.12156
- LAEMONT, KD.; SCHAEFER, CJ.; JUNEAU, PL.; SCHRIER, DJ. Effects of the phosphodiesterase inhibitor rolipram on streptococcal cell wall-induced arthritis in rats. **Int J Immunopharmacol.** 1999;21(11):711-25.

LAN, Z.; WEI, M.; CHEN, L.; XIE, G. et al. Role of Sinomenine on Complete Freund's Adjuvant-Induced Arthritis in Rats. **IUBMB Life**. 2016;68(6):429-35. doi: 10.1002/iub.1499

LAVRIC, M.; MIRANDA-GARCÍA, MA.; HOLZINGER, D.; FOELL, D. et al. Alarmins firing arthritis: Helpful diagnostic tools and promising therapeutic targets. **Joint Bone Spine**. 2016;pii: S1297-319X(16)30127-0. doi: 10.1016/j.jbspin.2016.06.010

LAZZERINI, PE.; CAPECCHI, PL.; GALEAZZI, M.; LAGHI-PASINI, F. Biologic drugs and arrhythmic risk in chronic inflammatory arthritis: the good and the bad. **Immunol Res**. 2016;65(1):262-75. doi:10.1007/s12026-016-8833-7

LEE, YM.; SUTEDJA, DS.; WAI, CT.; DAN, YY. et al. A randomized controlled pilot study of Pentoxifylline in patients with non-alcoholic steatohepatitis (NASH). **Hepatol Int**. 2008;(2):196-201. doi: 10.1007/s12072-008-9058-1

LEE, S.; KLAUSNER, J.; OLIVER, S.; KAPLAN, G. et al. Treatment of rheumatoid arthritis with thalidomide. In **Thalidomide: Potential Benefits and Risks Open Public Scientific Workshop**. 1997:(p. 81).

LEICHSENDRING, A.; BÄCKER, I.; FURTMÜLLER, PG.; OBINGER, C. et al. Long-Term Effects of (-)-Epigallocatechin Gallate (EGCG) on Pristane-Induced Arthritis (PIA) in Female Dark Agouti Rats. **PLoS One**. 2016;11(3):e0152518. doi:10.1371/journal.pone.0152518

LI, W.; ZHENG, L.; SHENG, C.; CHENG, X. et al. Systematic review on the treatment of pentoxifylline in patients with non-alcoholic fatty liver disease. **Lipids Health Dis**. 2011;10:49-54. doi: 10.1186/1476-511X-10-49

LIMA, AO.; SOARES, JB.; GRECO, JB.; GALIZZI, J. et al. **Métodos de laboratório aplicados à clínica**. 1977; 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

LINDH, I.; LÖNNBLÖM, E.; UYSAL, H.; ANDERSSON, I. et al. Type II collagen antibody response is enriched in the synovial fluid of rheumatoid joints and directed to the same major epitopes as in collagen induced arthritis in primates and mice. **Arthritis Res Ther**. 2014;16(4):R143. doi: 10.1186/ar4605

LIU, C.; KONG, X.; LI, X.; GUO, W. et al. Wen Luo Yin inhibits angiogenesis in collagen-induced arthritis rat model and in vitro. **J Ethnopharmacol**. 2013;149(2):478-89.

LIU, AJ.; PAN, L.; SHAO, FL.; YANG, JC. et al. [Effect of thalidomide on erythroid progenitor cells of bone marrow in rats with collagen induced arthritis]. [Article in Japanese] **Journal of Hebei Medical University**. 2008;3:014.

LOMAS, O.; ZACCOLO, M. Phosphodiesterases maintain signaling fidelity via compartmentalization of cyclic nucleotides. **Physiology**. 2014;29(2):141-149. doi: 10.1152/physiol.00040.2013

LONDONO, J.; SANTOS, AM.; SANTOS, PI.; CUBIDEZ, MF. et al. Eficácia terapêutica e segurança de metotrexato + leflunomida em pacientes colombianos com artrite reumatoide ativa refratária ao tratamento convencional. **Rev Bras Reumatol**. São Paulo, 2012;52(6).

LUNA, TMS. **Efeitos de drogas inibidoras de TNF- α em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos infectados pelo HTLV-I**. 2005. 105 f. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação) – Mestrado em imunologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2005.

LYONS, AJ.; BRENNAN, PA. Pentoxifylline—a review of its use in osteoradionecrosis. **Br J Oral Maxillofac Surg**. 2017;55(3):230-234. doi: 10.1016/j.bjoms.2016.12.006.

MACEDO, RB.; KAKEHASI, AM.; ANDRADE, MV. IL33 in rheumatoid arthritis: potencial contribution to pathogenesis. **Rev Bras Reumatol.** 2016;pii:S0482-5004(16)00053-X. doi: 10.1016/j.rbr.2016.01.006

MAGALHÃES, FP.; GONZALEZ, FD.; LIMA FILHO, HC.; BOAS, V. et al. Indicações da talidomida em reumatologia/Indications for thalidomide in rheumatology. **Rev Soc Bras Clín Méd.** 2006;4(4):102-109.

MAJUMDER, S.; SREEDHARA, SR.; BANERJEE, S.; CHATTERJEE, S. TNF α signaling beholds thalidomide saga: a review of mechanistic role of TNF- α signaling under thalidomide. **Curr Top Med Chem.** 2012;12(13):1456-67. doi: <https://doi.org/10.2174/156802612801784443>

MAKSYMOWYCH, WP.; AVINA-ZUBIETA, A.; LUONG, MH.; RUSSELL, AS. An open study of pentoxifylline in the treatment of severe refractory rheumatoid arthritis. **J Rheumatol.** 1995;22(4):625-9.

MANARA, M.; SINIGAGLIA, L. Bone and TNF in rheumatoid arthritis: clinical implications. **RMD Open.** 2015;1(Suppl 1):e000065. doi: 10.1136/rmdopen-2015-000065

MARCINKIEWICZ, J.; GRABOWSKA, A.; LAUTERBACH, R.; BOBEK, M. Differential effects of pentoxifylline, a non-specific phosphodiesterase inhibitor, on the production of IL-10, IL-12 p40 and p35 subunits by murine peritoneal macrophages. **Immunopharmacology.** 2000;49(3):335-43.

MARMOUZ, F.; GIRALT, J.; IZQUIERDO, I. Morning and evening efficacy evaluation of rupatadine (10 and 20 mg), compared with cetirizine 10 mg in perennial allergic rhinitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **J Asthma and Allergy.** 2011;4:27–35. doi: 10.2147/JAA.S18265

MAROK, R.; WINYARD, PG.; COUMBE, A.; KUS, ML.; GAFFNEY, K. et al. Activation of the transcription factor nuclear factor- κ B in human inflamed synovial tissue. **Arthritis Rheum.** 1996;39:583–91.

MARRIOTT, JB.; MULLER, G.; DALGLEISH, AG. Thalidomide as an emerging immunotherapeutic agent. **Immunol Today.** 1999;20(12):538-540.

MARTINEZ, A.; GIL, C. cAMP-specific phosphodiesterase inhibitors: promising drugs for inflammatory and neurological diseases. **Expert opinion on therapeutic patents.** 2014;24(12), 1311-1321. doi: 10.1517/13543776.2014.968127

MARUOTTI, N.; CRIVELLATO, E.; CANTATORE, FP.; VACCA, A. et al. Mast cells in rheumatoid arthritis. **Clin Rheumatol.** 2007;26:1-4. doi:10.1007/s10067-006-0305-3

MATEEN, S.; ZAFAR, A.; MOIN, S.; KHAN, AQ. et al. Understanding the role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Clin Chim Acta.** 2016;455:161-71. doi: 10.1016/j.cca.2016.02.010

MATHIS, SP.; JALA, VR.; LEE, DM.; HARIBABU, B. Nonredundant roles for leukotriene B4 receptors BLT1 and BLT2 in inflammatory arthritis. **J Immunol.** 2010;185:3049-56. doi: 10.4049/jimmunol.1001031

MATSUHASHI, T.; OTAKA, M.; ODASHIMA, M.; JIN, M. et al. Specific type IV phosphodiesterase inhibitor ameliorates thioacetamide-induced liver injury in rats. **J Gastroenterol Hepatol.** 2005;20(1):135-40. doi: 10.1111/j.1440-1746.2004.03512.x

MAURICE, DH.; KE, H.; AHMAD, F.; WANG, Y. et al. Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. **Nature reviews Drug discovery.** 2014;13(4):290-314. doi: 10.1038/nrd4228

MCCANN, FE.; PALFREEMAN, AC.; ANDREWS, M.; PEROCHAU, DP. et al. Apremilast, a novel PDE4 inhibitor, inhibits spontaneous production of tumour necrosis factor- α from human rheumatoid

synovial cells and ameliorates experimental arthritis. **Arthritis Res Ther.** 2010;12(3):R107. doi: 10.1186/ar3041.

MCINNES, IB.; SCHETT, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. **N Engl J Med.** 2011;365(23):2205-19. doi: 10.1056/NEJMra1004965

MCINNES IB, SCHETT G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Nat Rev Immunol.** 2007;7:429–42. doi: 10.1038/nri2094

MCMAHAN, RS.; RIEHLE, KJ.; FAUSTO, N.; CAMPBELL, JS. A disintegrin and metalloproteinase 17 regulates TNF and TNFR1 levels in inflammation and liver regeneration in mice. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** 2013;305(1):G25-34. doi: 10.1152/ajpgi.00326.2012

MELLADO, M.; MARTINEZ-MUÑOZ, L.; CASCIO, G.; LUCAS, P. et al. T cell migration in rheumatoid arthritis. **Front Immunol.** 2015;6:384. doi: 10.3389/fimmu.2015.00384

MENDES, MT; SILVEIRA, PF. Leukotriene-A4-Hydrolase and Basic Aminopeptidase Activities Are Related with Collagen-Induced Arthritis in a Compartment-Dependent Manner. **Open Journal of Rheumatology and Autoimmune Diseases.** 2013(3):255-62. doi:10.4236/ojra.2013.34040

MENDES, MT. **Aminopeptidase básica e Leucotrieno-A4-hidrolase em Ratos Sensíveis e Insensíveis à Indução de Artrite por Colágeno Tipo II.** 2012. 66 f. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação) – Mestrado em ciências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

MENDES, MT.; MURARI-DO-NASCIMENTO, S.; TORRIGO, IR.; ALPONTI, RF. et al. Basic aminopeptidase activity is an emerging biomarker in collagen-induced rheumatoid arthritis. **Reg Pept.** 2011;167(2-3):215-21. doi: 10.1016/j.regpep.2011.02.012

MENDONÇA, JA.; MARQUES-NETO, JF.; SAMARA, AM.; APPENZELLER, S. Increased levels of rheumatoid factors after TNF inhibitor in rheumatoid arthritis. **Rheumatol Int.** 2012(3);32:815–8. doi: 10.1007/s00296-011-1812-3

MILLER, O.; GONÇALVES, RR. Laboratório para o Clínico. 1999; 8 ed. São Paulo: Atheneu.

MOELANTS, EA.; MORTIER, A.; VAN DAMME, J.; PROOST, P. Regulation of TNF- α with a focus on rheumatoid arthritis. **Immunol Cell Biol.** 2013;91(6):393-401. doi: 10.1038/icb.2013.15

MOHAMED, MA.; MAHMOUD, MF.; REZK, AM. Effect of pentoxifylline and pioglitazone on rheumatoid arthritis induced experimentally in Rats. **Menoufia Med J.** 2014;27(4):766-74. doi: 10.4103/1110-2098.149748

MOHAMMED, SI; GORIAL, FI.; MAJEED, IA. Pentoxifylline as Adjuvant Therapy to Etanercept in Patients with Moderately to Highly Active Rheumatoid Arthritis. **American Journal of Pharmacological Sciences.** 2013;1(4):61-6. doi: 10.12691/ajps-1-4-4

MOREIRA, AL.; SAMPAIO, EP.; ZMUIDZINAS, A.; FRINDT, P. et al. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. **J. Exp. Med.** 1993;177:1675-80.

MORIUCHI, E.; YAMADA, H.; YAMASAKI, M.; KASE, C. et al. Synergistic inhibition of *pannus* tissue development in vitro by PGE1 plus phosphodiesterase 4 inhibitors. **Arthritis & Rheumatism.** 1998;41(9):S161.

MOTA, LMHD.; LAURINDO, IMM.; NETO, S.; LIMA, FAC. et al. Imaging diagnosis of early rheumatoid arthritis. **Rev. Bras. Reumatol.** 2012;52(5):761-6. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0482-50042012000500010>

MULLOL, J.; BOUSQUET, J.; BACHERT, C.; CANONICA, GW. et al. Update on rupatadine in the management of allergic disorders. *Allergy*. 2015;70(s100):1-24. doi: 10.1111/all.12531

MULLOL, J.; BOUSQUET, J.; BACHERT, C.; CANONICA, WG. et al. Rupatadine in allergic rhinitis and chronic urticaria. *Allergy*. 2008;63(Suppl. 87):5-28. doi: 10.1111/j.1398-9995.2008.01640.x

MURAKAMI, M.; NISHIMOTO, N. [IL-6 inhibitors prevent bone loss and cartilage degeneration in rheumatoid arthritis]. [Article in Japanese] *Clin Calcium*. 2015;25(12):1851-7. doi: CliCa151218511857

MURIEL, P.; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, E.; PÉREZ-ÁLVAREZ, V.; LARA-OCHOA, F. et al. Thalidomide ameliorates carbon tetrachloride induced cirrhosis in the rat. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15:951-7. doi: 10.1097/01.MEG.0000059201.12802.EF

NAKAMITSU, PZ.; COMPRI, CM.; PINTO, L.; GOTARDO, ÉM. et al. Thalidomide controls adipose tissue inflammation associated with high-fat diet-induced obesity in mice. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2015;15(2):151-8. doi: 10.2174/1871530314666141128115225

NAKAMURA, J.; OKAMURA, N.; KAWAKAMI, Y. Augmentation of lipolysis in adipocytes from fed rats, but not from starved rats, by inhibition of rolipram-sensitive phosphodiesterase 4. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2004;425(1):106-14 doi: 10.1016/j.abb.2004.02.036.

NAKAMURA, RM. Progress in the use of biochemical and biological markers for evaluation of rheumatoid arthritis. *J Clin Lab Anal*. 2000(6);14:305-13.

NARANJO, A.; SOKKA, T.; DESCALZO, MA.; CALVO-ALEN, J et al. Cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: results from the QUEST-RA study. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(2):R30. doi: 10.1186/ar2383

NASIRI-TOOSI, Z.; DASHTI-KHAVIDAKI, S.; KHALILI, H.; LESSAN-PEZESHKI, M. A review of the potential protective effects of pentoxifylline against drug-induced nephrotoxicity. *European journal of clinical pharmacology*. 2013;69(5):1057-73. doi: 10.1007/s00228-012-1452-x

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database (Pentoxifylline); CID=4740, 2017a. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4740>>. Acessado em: 18/07/2017.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database (Thalidomide); CID=5426, 2017b. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5426>>. Acessado em: 18/07/2017.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database (Rolipram); CID=5092, 2017c. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5092>>. Acessado em: 18/07/2017.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database (Rupatadine); CID=133017, 2017d. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/133017>>. Acessado em: 18/07/2017.

NEVES, KR.; NOBRE, HV JR.; LEAL, LK.; DE ANDRADE, GM. et al. Pentoxifylline Neuroprotective Effects Are Possibly Related to Its Anti-Inflammatory and TNF-Alpha Inhibitory Properties, in the 6-OHDA Model of Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis*. 2015;2015:108179. doi: 10.1155/2015/108179

NEUNER, P.; KLOSNER, G.; SCHAUER, E.; POURMOJIB, M. et al. Pentoxifylline in vivo down-regulates the release of IL-1 beta, IL-6, IL-8 and tumour necrosis factor-alpha by human peripheral blood mononuclear cells. *Immunology*. 1994;83(2):262-7.

NISHIMURA, K., SUGIYAMA, D., KOGATA, Y., TSUJI, G. et al. Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. **Annals of internal medicine**. 2007;146(11):797-808.

NOLI, C.; MIOLO, A. The mast cells in wound healing. **Vet Dermatol**. 2001;12:303–13.

NOMAN, AS.; KOIDE, N.; HASSAN, F.; I-E-KHUDA, I. et al. Thalidomide inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production via down-regulation of MyD88 expression. **Innate Immun**. 2009;1533-41. doi: 10.1177/1753425908099317

NYMAN, U.; MÜSSENER, A.; LARSSON, E.; LORENTZEN, J. et al. Amelioration of collagen II-induced arthritis in rats by the type IV phosphodiesterase inhibitor Rolipram. **Clin Exp Immunol**. 1997;108(3):415-9.

OHNISHI, A.; WATANABE, J.; OGAWA, Y.; GOTO, Y. et al. Involvement of Phenylalanine 297 in the Construction of the Substrate Pocket of Human Aminopeptidase B. **Biochemistry**. 2015;54(39):6062-6070. doi: 10.1021/acs.biochem.5b00964

OKAMOTO, H. ; HOSHI, D. ; KIIRE, A. ; YAMANAKA, H. et al. Molecular targets of rheumatoid arthritis. **Inflamm Allergy Drug Targets**. 2008;7(1):53-66.

OLESEN, CM.; COSKUN, M.; PEYRIN-BIROULET, L.; NIELSEN, OH. Mechanisms behind efficacy of tumor necrosis factor inhibitors in inflammatory bowel diseases. **Pharmacol Ther**. 2016;159:110-119. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.01.001

OLIVER, SJ.; FREEMAN, SL.; CORRAL, LG.; OCAMPO, CJ. et al. Thalidomide analogue CC1069 inhibits development of rat adjuvant arthritis. **Clin Exp Immunol**. 1999;118(2):315-21.

OLIVER, SJ.; CHENG, TP.; BANQUERIGO, ML.; BRAHN, E. The effect of thalidomide and 2 analogs on collagen induced arthritis. **J Rheumatol**. 1998;25(5):964-9.

OLSSON, N.; ULFGREN, AK.; NILSSON, G. Demonstration of mast cell chemotactic activity in synovial fluid from rheumatoid patients. **Ann Rheum Dis**. 2001;60:187–93.

OZEGBE, P.; FOEY, AD.; AHMED, S.; WILLIAMS, RO. Impact of cAMP on the T-cell response to type II collagen. **Immunology**. 2004;111(1):35-40.

PACCOU, J.; EDWARDS, M.; MOSS, C.; DENNISON, E. et al. High-resolution imaging of bone and joint architecture in rheumatoid arthritis. **Br Med Bull**. 2014;112(1):107-18. doi: 10.1093/bmb/ldu033

DE PAEPE, B.; CREUS, KK.; DE BLEECKER, JL. The tumor necrosis factor superfamily of cytokines in the inflammatory myopathies: potential targets for therapy. **Clin Dev Immunol**. 2012;2012:369432. doi: 10.1155/2012/369432.

PAL, R.; TIWARI, PC.; NATH, R.; BABU, S. et al. Phosphodiesterase (pde) inhibitors and their interaction with nitric oxide (NO) modulators in adjuvant-induced rheumatoid arthritis. **The FASEB Journal**. 2016a;30(1):lb556.

PAL, R.; CHAUDHARY, MJ.; TIWARI, PC.; NATH, R. et al. Pharmacological studies on the anti-inflammatory and immunomodulatory role of pentoxifylline and its interaction with nitric oxide (NO) in experimental arthritis in rats. **Inflammopharmacology**. 2016b;24(5):221-231. doi:10.1007/s10787-016-0281-4

PARANÁ, R.; WAKSMAN, JC. Mecanismo de hepatotoxicidade medicamentosa: o exemplo do acetaminofen/paracetamol. **Revista GED Gastroenterologia Endoscopia Digestiv**. 2011;(30)sup.1:06-47.

PATON, DM. Crisaborole: Phosphodiesterase inhibitor for treatment of atopic dermatitis. **Drugs Today (Barc)**. 2017;53(4):239-45. doi: 10.1358/dot.2017.53.4.2604174

PEARCE, GJ.; CHIKANZA, IC. Targeting tumour necrosis factor in the treatment of rheumatoid arthritis. **BioDrugs**. 2001;15(3):139-49.

PENNING, TD.; RUSSELL, MA.; CHEN, BB.; CHEN, HY. et al. Synthesis of potent leukotriene A(4) hydrolase inhibitors. Identification of 3-[methyl[3-[4-(phenylmethyl)phenoxy]propyl]amino]propanoic acid. **J Med Chem**. 2002;45:3482-3490

PERES, RS.; LIEW, FY.; TALBOT, J.; CARREGARO, V. et al. Low expression of CD39 on regulatory T cells as a biomarker for resistance to methotrexate therapy in rheumatoid arthritis. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2015;112(8):2509-2514. doi: 10.1073/pnas.1424792112

PÉREZ-EDO, L.; DÍEZ-PÉREZ, A.; MARIÑOSO, L.; VALLÉS, A. et al. Bone metabolism and histomorphometric changes in rheumatoid arthritis. **Scand J Rheumatol**. 2002;31:285-90. doi:http://dx.doi.org/10.1080/030097402760375188

PHAM, V.; CADEL, MS.; GOUZY-DARMON, C.; HANQUEZ, C. et al. Aminopeptidase B, a glucagon-processing enzyme: site directed mutagenesis of the Zn²⁺-binding motif and molecular modelling. **BMC Biochemistry**. 2007;8:21. doi:10.1186/1471-2091-8-21

PHILIPPE L, GEGOUT-POTTIE P, GUINGAMP C, BORDJI K. et al. Relations between functional, inflammatory, and degenerative parameters during adjuvant arthritis in rats. **Am J Physiol**. 1997;273: R1550–6.

PICERNO, V.; FERRO, F.; ADINOLFI, A.; VALENTINI, E. et al. One year in review: the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Clin Exp Rheumatol**. 2015;33(4):551-8

PIESSE, C.; CADEL, S.; GOUZY-DARMON, C.; JEANNY, JC. et al. Expression of aminopeptidase B in the developing and adult rat retina. **Experimental Eye Research**. 2004;79:639–648. doi:10.1016/j.exer.2004.06.030

PINTO, L. de F.; COMPRI, C. M., FORNARI, J. V., BARTCHEWSKY, W. et al. The immunosuppressant drug, thalidomide, improves hepatic alterations induced by a high-fat diet in mice. **Liver Int**. 2010;30(4):603-610. doi: 10.1111/j.1478-3231.2009.02200.x

PISETSKY, DS. Antinuclear antibody testing [mdash] misunderstood or misbegotten?. **Nature Reviews Rheumatology**. 2017. doi: 10.1038/nrrheum.2017.74. [Epub ahead of print]

PÓVOA, HCC. **Efeito da Talidomida e da Pentoxifilina na produção de Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) e Gama Interferon (INF- γ) na carcinogênese mamária em ratas Wistar**. 2008. 94 f. Trabalho de conclusão de curso (Tese) – Doutorado em patologia, Universidade Federal Fluminense , Rio de Janeiro, 2008.

PRABHAKAR, U.; LIPSHUTZ, D.; BARTUS, JO.; SLIVJAK, MJ. et al. Characterization of cAMP-dependent inhibition of LPS-induced TNF alpha production by rolipram, a specific phosphodiesterase IV (PDE IV) inhibitor. **Int J Immunopharmacol**. 1994;16(10):805-16.

QUEIROZ-JUNIOR, CM.; BESSONI, RL.; COSTA, VV.; SOUZA, DG. et al. Preventive and therapeutic anti-TNF- α therapy with pentoxifylline decreases arthritis and the associated periodontal co-morbidity in mice. **Life Sci**. 2013;93(9-11):423-8. doi: 10.1016/j.lfs.2013.07.022.

QUENTAL, C.; SALLES FILHO, S. Ensaios clínicos: capacitação nacional para avaliação de medicamentos e vacinas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. 2006;9(4):408-24.

RAMIRO, S.; GAUJOUX-VIALA, C.; NAM, JL.; SMOLEN, JS. et al. Safety of synthetic and biological DMARDs: a systematic literature review informing the 2013 update of the EULAR recommendations for management of rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.** 2014;73(3):529–35. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204575

RAO, RS.; MEDHI, B.; KHANDUJA, KL.; PANDHI, P. Correlation of seizures and biochemical parameters of oxidative stress in experimentally induced inflammatory rat models. **Fundam Clin Pharmacol.** 2010;24(3):325-31. doi: 10.1111/j.1472-8206.2009.00773.x

REBOLLEDO, R.; LIU, B.; AKHTAR, MZ.; OTTENS, PJ. et al. Prednisolone has a positive effect on the kidney but not on the liver of brain dead rats: a potential role in complement activation. **J Transl Med.** 2014;12(1):111. doi: 10.1186/1479-5876-12-111

REFAAT, R.; SALAMA, M.; ABDEL MEGUID, E.; EL SARHA, A. et al. Evaluation of the effect of losartan and methotrexate combined therapy in adjuvant-induced arthritis in rats. **Eur J Pharmacol.** 2013;698(1-3):421-8. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.10.024

REJ, R. Measurement of aminotransferases: Part 1. Aspartate aminotransferase. **CRC Crit Rev Clin Lab Sci.** 1984;21(2):99–186. doi :10.3109/10408368409167137

REWATKAR, PV.; KOKIL, GR.; VERMA, A.; THAREJA, S. Rheumatoid arthritis: a new challenge in coming era. **Mini Rev Med Chem.** 2010;10(2):98-107.

ROONEY, M.; CONDELL, D.; QUINLAN, W.; DALY, L. et al. Analysis of the histologic variation of synovitis in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.** 1988;31(8):956-63.

ROSS, SE.; WILLIAMS, RO.; MASON, LJ.; MAURI, C. et al. Suppression of TNF- α expression, inhibition of Th1 activity, and amelioration of collagen-induced arthritis by rolipram. **J Immunol.** 1997;159(12):6253-9.

ROY, K.; KANWAR, RK.; KANWAR, JR. Molecular targets in arthritis and recent trends in nanotherapy. **Int J Nanomedicine.** 2015;10:5407-20. doi: 10.2147/IJN.S89156

ROYDS, JA.; DOWER, SK.; QWARNSTROM, EE.; LEWIS, CW. Response of tumour cells to hypoxia: role of p53 and NF- κ B. **Mol Pathol.** 1998;51:55–61.

RUIZ-ORTEGA, M.; ESTEBAN, V.; EGIDO, J. The regulation of the inflammatory response through nuclear factor-kappaB pathway by angiotensin IV extends the role of the renin angiotensin system in cardiovascular diseases. **Trends Cardiovasc Med.** 2007;17:19-25. doi: 10.1016/j.tcm.2006.10.003

RYAN, A.; GODSON, C. Lipoxins: regulators of resolution. **Curr Opin Pharmacol.** 2010;10:166–172. doi:10.1016/j.coph.2010.02.005

SAKKAS, LI.; MAVROPOULOS, A.; BOGDANOS, DP. Phosphodiesterase 4 inhibitors in immune-mediated diseases: mode of action, clinical applications, current and future perspectives. **Curr Med Chem.** 2017. doi: 10.2174/0929867324666170530093902. [Epub ahead of print]

SALINA, LFG. **Avaliação da segurança hepática e cardíaca do composto LYSO-07-nova tiazolidinodiona.** 2013. 63 f. Trabalho de conclusão de curso (TCC) – Graduação em Farmácia-Bioquímica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, 2013.

SALLIOT, C.; VAN DER HEIJDE, D. Long-term safety of methotrexate monotherapy in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature research. **Ann. Rheum. Dis.** 2009;68:100–1104.

SAMUELSSON, B.; DAHLÉN, SE.; LINDGREN, JA.; ROUZER, CA. et al. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. **Science.** 1987;237:1171-1176.

SANDBERG, ME.; BENGTSSON, C.; KÄLLBERG, H.; WESLEY, A. et al. Overweight decreases the chance of achieving good response and low disease activity in early rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis.** 2014;73(11):2029-33. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-205094.

SATHE, K.; KHUBCHANDANI, RP. Thalidomide for systemic onset juvenile idiopathic arthritis. **Indian Pediatr.** 2013;50(2):237-9.

SHELLER, J.; CHALARIS, A.; SCHMIDT-ARRAS, D.; ROSE-JOHN, S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochim Biophys Acta.** 2011;1813(5):878-88. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.034

SCHETT, G.; DAYER, JM.; MANGER, B. Interleukin-1 function and role in rheumatic disease. **Nat Rev Rheumatol.** 2016;12(1):14-24. doi: 10.1038/nrrheum.2016.166

SCHETT, G.; GRAVALLESE, E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. **Nat Rev Rheumatol.** 2012;8(11):656-64. doi: 10.1038/nrrheum.2012.153

SCHIAPPAPIETRA, B.; VARNIER, G.; ROSINA, S.; CONSOLARO, A. et al. Glucocorticoids in juvenile idiopathic arthritis. **Neuroimmunomodulation.** 2015;22(1-2):112-8. doi: 10.1159/000362732

SCHULTE, W.; BERNHAGEN, J.; BUCALA, R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets--an updated view. **Mediators Inflamm.** 2013;2013:165974. doi: 10.1155/2013/165974

SCOVILLE, CD. Pilot study using the combination of methotrexate and thalidomide in the treatment of rheumatoid arthritis. **Clin Exp Rheumatol.** 2001;19(3):360-1.

SCOVILLE, CD.; READING, JC. Open trial of thalidomide in the treatment of rheumatoid arthritis. **J Clin Rheumatol.** 1999;5(5):261-267.

SEKUT, L.; YARNALL, D.; STIMPSON, SA.; NOEL, L. et al. Anti-inflammatory activity of phosphodiesterase (PDE)-IV inhibitors in acute and chronic models of inflammation. **Clin Exp Immunol.** 1995;100(1):126-32.

SEMMLER, JH.; WACHTEL, H.; ENDRES, S. The specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram suppresses TNF α production by human mononuclear cells. **Int J Immunopharmacol.** 1993;15:409

SHAMIZADEH, S.; BROCKOW, K.; RING, J. Rupatadine: efficacy and safety of a non-sedating antihistamine with PAF-antagonist effects. **Allergo journal international.** 2014;23(3):87-95. doi: 10.1007/s40629-014-0011-7

SHEN, AZ.; LI, X.; HU, W.; CHEN, FH. Total flavonoids of *Bidens bipinnata* L. ameliorate experimental adjuvant-induced arthritis through induction of synovial apoptosis. **BMC Complement Altern Med.** 2015;15(1):437. doi: 10.1186/s12906-015-0962-3.

SHENOY, P.; AGARWAL, V. Phosphodiesterase inhibitors in the management of autoimmune disease. **Autoimmunity Reviews.** 2010; 9(7):511-515. doi: 10.1016/j.autrev.2010.02.012

SILVA, JRC. Análise das enzimas hepáticas dos pacientes em uso de leflunomida em combinação com metotrexato para o tratamento da artrite reumatoide: uma revisão de literatura. **Boletim Informativo Geum.** 2015;6(4):28.

SILVA, JC.; ROCHA, MFG.; LIMA, AAM.; BRITO, GAC. et al. Effects of pentoxifylline and nabumetone on the serum levels of IL-1 β and TNF α in rats with adjuvant arthritis. **Inflamm Res.** 2000;49(1):14-9. doi: 10.1007/PL00000198

SINGH, JA.; CAMERON, C.; NOORBALOOCHI, S.; CULLIS, T. et al. Risk of serious infection in biological treatment of patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet**. 2015;386(9990):258-65. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61704-9

SINGH, HN.; BLANCUZZI, V.; GREENWOOD, S.; SKILES, JW. et al. Synovial fluid levels of tumor necrosis factor- α in the inflamed rat knee: modulation by dexamethasone and inhibitors of matrix metalloproteinase and phosphodiesterase. **Inflamm Res**. 1997;46(Suppl 2):S153-4. doi: 10.1007/S000110050151

ŚLEBIODA, TJ.; KMIEĆ, Z. Tumour necrosis factor superfamily members in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Mediators Inflamm**. 2014;2014:325129. doi: 10.1155/2014/325129

SNYDER, PB.; ESSELSTYN, JM.; LOUGHNEY, K.; WOLDA, SL. et al. The role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in the regulation of adipocyte lipolysis. **Journal of lipid research**. 2005;46(3):494-503. doi: 10.1194/jlr.M400362-JLR200

SOKOLOVE, J.; BROMBERG, R.; DEANE, KD.; LAHEY, LJ. et al. Autoantibody epitope spreading in the pre-clinical phase predicts progression to rheumatoid arthritis. **PLoS One**. 2012;7(5):e35296. doi: 10.1371/journal.pone.0035296

SOMMER, N.; LÖSCHMANN, PA.; NORTHOFF, GH.; WELLER, M. et al. The antidepressant rolipram suppresses cytokine production and prevents autoimmune encephalomyelitis. **Nat Med**. 1995;1(3):244-248.

SONG, Y.; BUCHWALD, P. TNF superfamily protein-protein interactions: feasibility of small-molecule modulation. **Current drug targets**. 2015;16(4):393-408.

SONG, N.; LIU, AJ.; GAO, XF.; GUO, XL. et al. [Effect of selective phosphodiesterase 4 inhibitors on nuclear factor kappa B, tumor necrosis factor- α and interleukin-8 expression in peripheral blood mononuclear cells in rheumatoid arthritis with interstitial lung disease]. [Article in Chinese] **Zhonghua Nei Ke Za Zhi**. 2013a;52(10):829-32.

SONG, SS.; HUANG B, WANG QT, WU YJ. et al. BF02, a recombinant TNFR2 fusion protein, alleviates adjuvant arthritis by regulating T lymphocytes in rats. **Acta Pharmacol Sin**. 2013b;34(3):414-23. doi: 10.1038/aps.2012.171.

SOUNESS, JE.; ALDOUS, D.; SARGENT, C. Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of cyclic AMP phosphodiesterase (PDE) type 4 inhibitors. **Immunopharmacology**. 2000;47:127-62.

STORR, J.; BARRELL, E.; BARRY, W.; LENNEY, W. et al. Effect of a single oral dose of prednisolone in acute childhood asthma. **Lancet**. 1987;1(8538):879-82.

STROLLO, R.; PONCHEL, F.; MALMSTRÖM, V.; RIZZO, P. et al. Autoantibodies to posttranslationally modified type II collagen as potential biomarkers for rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**. 2013;65(7):1702-12. doi: 10.1002/art.37964

SUN, M.; FINK, PJ. A new class of reverse signaling costimulators belongs to the TNF family. **J Immunol**. 2007;179(7):4307-4312.

SZEKANECZ, Z.; BESENYEI, T.; PARAGH, G.; KOCH, AE. New insights in synovial angiogenesis. **Joint Bone Spine**. 2010;77(1):13-9. doi: 10.1016/j.jbspin.2009.05.011.

SZEKANECZ, Z; KOCH, AE. Angiogenesis and its targeting in rheumatoid arthritis. **Vascul Pharmacol**. 2009;51(1): 1-7. doi: 10.1016/j.vph.2009.02.002

SZTRYMF, B.; RABILLER, A.; NUNES, H.; SVALE, L. et al. Prevention of hepatopulmonary syndrome and hyperdynamic state by pentoxifylline in cirrhotic rats. **European Respiratory Journal**. 2004;23(5):752-758.

TAYLOR, P.; GARTEMANN, J.; HSIEH, J.; CREEDEN, J. A systematic review of serum biomarkers anti-cyclic citrullinated peptide and rheumatoid factor as tests for rheumatoid arthritis. **Autoimmune Diseases**. 2011;2011:815038. doi: 10.4061/2011/815038.

TAYLOR, PC. Pharmacology of TNF blockade in rheumatoid arthritis and other chronic inflammatory diseases. **Curr Opin Pharmacol**. 2010;10(3):308-315. doi: 10.1016/j.coph.2010.01.005

TAYLOR, PC. Anti-TNF α therapy for rheumatoid arthritis: an update. **Internal medicine**. 2003;42(1):15-20.

THABET, RH.; AL SHAMMRY, AH.; ALANAZI, AA.; FALAH, N. et al. Immune modulation and amelioration of joint edema by a PDE –inhibitor and its solvent. **American Journal of Research Communication**. 2016;4(3):28-42.

THAIRU, N.; KIRIAKIDIS, S.; DAWSON, P.; PALEOLOG, E. Angiogenesis as a therapeutic target in arthritis in 2011: learning the lessons of the colorectal cancer experience. **Angiogenesis**. 2011;14(3):223-34. doi: 10.1007/s10456-011-9208-2.

THALAYASINGAM, N.; ISAACS, JD. Anti-TNF therapy. **Best Pract Res Clin Rheumatol**. 2011;25(4):549-567. doi: 10.1016/j.berh.2011.10.004

THIEL, M.; BARDENHEUER, H.; PÖCH, G.; MADEL, C. et al. Pentoxifylline does not act via adenosine receptors in the inhibition of the superoxide anion production of human polymorphonuclear leukocytes. **Biochem Biophys Res Commun**. 1991;180:53

THOMPSON, C.; DAVIES, R.; CHOY, E. Anti cytokine therapy in chronic inflammatory arthritis. **Cytokine**. 2016;86:92-9. doi: 10.1016/j.cyto.2016.07.015

TISSI, L.; PULITI, M.; BARLUZZI, R.; OREFICI, G. et al. Role of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta, and interleukin-6 in a mouse model of group B streptococcal arthritis. **Infect Immun**. 1999 ;67(9):4545-50.

TRENTHAM, DE.; TOWNES, AS.; KANG, AH. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. **J Exp Med**. 1977;146(3):857-868.

TSENG, S.; PAK, G.; WASHENIK, K.; POMERANZ, MK. et al. Rediscovering thalidomide: a review of its mechanism of action, side effects, and potential uses. **J Am Acad Dermatol**. 1996;35(6):969-79.

TSUJI, F.; OKI, K.; FUJISAWA, K.; OKAHARA, A. et al. Involvement of leukotriene B4 in arthritis models. **Life Sci**. 1999;64(3):PL51-6.

TSUTSUI, H.; CAI, X.; HAYASHI, S. Interleukin-1 Family Cytokines in Liver Diseases. **Mediators Inflamm**. 2015;2015:630265. doi: 10.1155/2015/630265

TUNCER, İ.; UYGAN, İ.; DÜLGER, H.; TÜRKDO, Ğ AN K. et al. The comparative effects of pentoxifylline and ursodeoxycholic acid on IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α levels in nonalcoholic fatty liver. **E J Med**. 2003;8:27–32.

TURNER, CR.; ESSER, KM.; WHEELDON, EB. Therapeutic intervention in a rat model of ARDS: IV. Phosphodiesterase IV inhibition. **Circ Shock**. 1993;39(3):237-45.

USHA, PR.; NAIDU, MUR.; DATLA, R. Clinical Efficacy and Tolerability Evaluation of Pentoxifylline in Rheumatoid Arthritis: A Double-Blind, Randomised, Placebo-Controlled Study. **Clinical Drug Investigation**. 2002;22(5):329–339.

VALE, ML.; BENEVIDES, VM.; SACHS, D.; BRITO, GA. et al. Antihyperalgesic effect of pentoxifylline on experimental inflammatory pain. **Br J Pharmacol**. 2004;143(7):833–44. doi: 10.1038/sj.bjp.0705999

VASANTH, LC.; PAVLOV, H.; BYKERK, V. Imaging of rheumatoid arthritis. **Rheum Dis Clin North Am**. 2013;39(3):547-66. doi: 10.1016/j.rdc.2013.03.007

VAN WAGNER, LB.; KOPPE, SW.; BRUNT, EM.; GOTTSTEIN, J. et al. Pentoxifylline for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a randomized controlled trial. **Ann Hepatol**. 2011;10(3):277-86.

VASIADI, M.; KALOGEROMITROS, D.; KEMPURAJ, D.; CLEMONS, A. et al. Rupatadine inhibits proinflammatory mediator secretion from human mast cells triggered by different stimuli. **Int Arch Allergy Immunol**. 2010;151(1):38–45. doi:10.1159/000232569

VINCENT, TL.; WILLIAMS, RO.; MACIEWICZ, R.; SILMAN, A. et al. Mapping pathogenesis of arthritis through small animal models. **Rheumatology (Oxford)**. 2012;51(11):1931-41. doi: 10.1093/rheumatology/kes035

WARD-KAVANAGH, LK.; LIN, WW.; ŠEDÝ, JR.; WARE, CF. The TNF Receptor Superfamily in Co-stimulating and Co-inhibitory Responses. **Immunity**. 2016;44(5):1005-19. Doi: 10.1016/j.immuni.2016.04.019

WEINBERG, JB.; MASON, SN.; WORTHAM, TS. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and interleukin-1 beta (IL-1 beta) messenger RNA (mRNA) expression in HL-60 leukemia cells by pentoxifylline and dexamethasone: dissociation of acivicin-induced TNF-alpha and IL-1 beta mRNA expression from acivicin-induced monocytoid differentiation. **Blood**. 1992;79:3337–3343.

WERNHOFF, P.; OLOFSSON, P.; HOLMDAHL, R. The genetic control of rheumatoid factor production in a rat model of rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**. 2003;48(12):3584-96. doi: 10.1002/art.11342

WESTMAN, E.; LUNDBERG, K.; ERLANDSSON HARRIS, H. Arthritogenicity of collagen type II is increased by chlorination. **Clin. Exp. Immunol**. 2006;145(2):339-45. doi: 10.1111/j.1365-2249.2006.03129.x

WHITE, MV.; SLATER, JE.; KALINER, MA. Histamine and asthma. **Am Rev Respir Dis**. 1987;135:1165–76.

WITTMANN, M.; HELLIWELL, PS. Phosphodiesterase 4 inhibition in the treatment of psoriasis, psoriatic arthritis and other chronic inflammatory diseases. **Dermatol Ther (Heidelb)**. 2013;3(1):1-15. doi: 10.1007/s13555-013-0023-0.

WOODWORTH, TG.; DEN BROEDER, AA. Treating to target in established rheumatoid arthritis: Challenges and opportunities in an era of novel targeted therapies and biosimilars. **Best Pract Res Clin Rheumatol**. 2015;29(4-5):543-549. doi: 10.1016/j.berh.2015.10.001

WU, Q.; WANG, Y.; WANG, Q.; YU, D. et al. The bispecific antibody aimed at the vicious circle of IL-1 β and IL-17A, is beneficial for the collagen-induced rheumatoid arthritis of mice through NF- κ B signaling pathway. **Immunol Lett**. 2016;pii:S0165-2478(16)30159-6. doi: 10.1016/j.imlet.2016.09.001

XU, S.; LU, H.; LIN, J.; CHEN, Z. et al. Regulation of TNFalpha and IL1beta in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by leukotriene B4. **Rheumatol Int**. 2010;30:1183–1189. doi: 10.1007/s00296-009-1125-y

- YAGYU, T.; KOBAYASHI, H.; MATSUZAKI, H.; WAKAHARA, K. et al. Thalidomide inhibits tumor necrosis factor- α -induced interleukin-8 expression in endometriotic stromal cells, possibly through suppression of nuclear factor- κ B activation. **J Clin Endocrinol Metab.** 2005;90:3017-21. doi: 10.1210/jc.2004-1946
- YAMAKI, K.; LI, X.; HOSSAIN, MA.; ALAM, AH. et al. Difference in preventive effects between the phosphodiesterase iv inhibitor rolipram and anti-arthritis drugs on antigen-induced arthritis in mice. **Immunol Invest.** 2007;36(2):131-45. doi: 10.1080/08820130600746008
- YAMAKI, K.; LI, X.; UCHIDA, H.; ALAM, AH. et al. Effects of the phosphodiesterase IV inhibitor rolipram on Th1 and Th2 immune responses in mice. **J Pharm Pharmacol.** 2004;56(7):877-82. doi: 10.1211/0022357023655
- YAMAMOTO, S.; SUGAHARA, S.; IKEDA, K.; SHIMIZU, Y. Amelioration of collagen-induced arthritis in mice by a novel phosphodiesterase 7 and 4 dual inhibitor, YM-393059. **Eur J Pharmacol.** 2007;559(2-3):219-26. doi: 10.1016/j.ejphar.2006.11.079
- YAMASAKI, SC.; MURARI-DO-NASCIMENTO, S.; SILVEIRA, PF. Neutral aminopeptidase and dipeptidyl peptidase IV in the development of collagen II-induced arthritis. **Reg Pept.** 2012;173(1-3):47-54. doi: 10.1016/j.regpep.2011.09.004
- YANG, Z.; REN, Y.; LIU, D.; LIN, F.; LIANG, Y. Prevalence of systemic autoimmune rheumatic diseases and clinical significance of ANA profile: data from a tertiary hospital in Shanghai, China. **APMIS.** 2016;124(9), 805-811. doi: 10.1111/apm.12564
- YANG, C.; SINGH, P.; SINGH, H.; LE, ML. et al. Systematic review: thalidomide and thalidomide analogues for treatment of inflammatory bowel disease. **Alimentary pharmacology & therapeutics.** 2015;41(11):1079-1093. doi: 10.1111/apt.13181
- YAO, X.; HUANG, J.; ZHONG, H.; SHEN, N. et al. Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers. **Pharmacol Ther.** 2014;141(2):125-39. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.09.004
- ZELOVÁ, H.; HOŠEK, J. TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. **Inflamm Res.** 2013;62(7):641-51. doi: 10.1007/s00011-013-0633-0
- ZHANG, XD.; HOU, JF.; QIN, XJ.; LI, WL. et al. Pentoxifylline inhibits intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and lung injury in experimental phosgene-exposure rats. **Inhal Toxicol.** 2010;22(11):889-895. doi: 10.3109/08958378.2010.493900
- ZHU, TY.; GRIFFITH, JF.; QIN, L.; HUNG, VW. et al. Alterations of bone density, microstructure, and strength of the distal radius in male patients with rheumatoid arthritis: a case-control study with HR-pQCT. **J Bone Miner Res.** 2014;29:2118-29. doi: 10.1002/jbmr.2221
- ZHU, TY.; GRIFFITH, JF.; QIN, L.; HUNG, VW. et al. Structure and strength of the distal radius in female patients with rheumatoid arthritis: a case-control study. **J Bone Miner Res.** 2013;28:794-806. doi:10.1002/jbmr.1793
- ZUO, XX.; GONG, YH.; ZHOU, YO.; LUO, H. et al. The plasmic translocation and release of high mobility group box chromosomal protein 1 in peripheral blood monocytes of patients with rheumatoid arthritis and the effect of thalidomide. **Zhonghua Nei Ke Za Zhi.** 2008;47(5):374-7.