RENATA GONÇALVES DIAS

CARACTERIZAÇÃO DA INFLAMAÇÃO ARTICULAR INDUZIDA POR FOSFOLIPASE A_2 – GRUPO IIA: DETERMINAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS, COMPORTAMENTAIS E MEDIAÇÃO QUÍMICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2010

RENATA GONÇALVES DIAS

CARACTERIZAÇÃO DA INFLAMAÇÃO ARTICULAR INDUZIDA POR FOSFOLIPASE A_2 – GRUPO IIA: DETERMINAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS, COMPORTAMENTAIS E MEDIAÇÃO QUÍMICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Dra. Yara Cury
Co-orientadora: Dra. Gisele Picolo

São Paulo
2010

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

© reprodução total

Dias, Renata Gonçalves.
Caracterização da inflamação articular induzida por fosfolipase A_2 – grupo II A: determinação das alterações histopatológicas, comportamentais e mediação química / Renata Gonçalves Dias -- São Paulo, 2010.

Orientador: Yara Cury.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Dor e Inflamação

Versão do título para o inglês: Characterization of joint inflammation induced by phospholipase A2 - Group II: determination of the histopathological changes, behavioral and chemical mediation.

Descritores: 1. Dor 2. Fosfolipases 3. Inflamação articular 4. Miotoxina 5. *Bothrops asper* I. Cury, Yara II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0165/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Renata Gonçalves Dias.

Título da Tese: Caracterização da inflamação articular induzida por fosfolipase A2 – grupo IIA: determinação das alterações histopatológicas, comportamentais e mediação química.

Orientador(a): Yara Cury.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Dedico este trabalho aos animais utilizados nos experimentos,

Aos meus avós (*in memoriam*),
Aos meus pais,
Ao meu amado Henrique,
Aos meus irmãos,
Pelo apoio, paciência, incentivo sempre e incondicionável amor,
E ao meu filhote, Pedro Henrique, que desde pequenino me incentivou nas fases finais
e tão decisivas...

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, em especial à Dra. Ida Sano Martins, Dra. Sandra Coccuzo Sampaio nas fases iniciais do projeto e ao Dr. Marcelo Santoro pelo inestimável auxílio e apoio durante todo desenvolvimento do projeto.

Ao Departamento de Patologia Experimental e Comparada, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, em especial ao Dr. Luís Idércio Sinhorini e Dr. Claudio Arroio pelo auxílio, dedicação e colaboração desde o início deste trabalho.

Ao Departamento de Farmacologia, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, em especial ao Dr. Fernando Queiroz Cunha e Dra. Ana Guerrero, pela colaboração e apoio nas fases de padronização do projeto.

Ao Laboratório Especial de Dor e Sinalização, do Instituto Butantan, em especial à orientadora deste projeto, Dra. Yara Cury, pela paciência e carinho durante o desenvolvimento do projeto e da mesma forma à co-orientadora, Dra. Gisele Picolo por todos os dias de dedicação e amizade.

Às minhas queridas amigas da jornada científica diária, Van Gutierrez, Lú de Britto, Van Zambelli, Patrícia Brigatte, Carina Paccola, querido Will e toda turminha...pelo maravilhoso convívio que guardarei no meu coração para todo sempre!

Agradeço à todos do fundo do meu coração!

RESUMO

Dias RG. Caracterização da inflamação articular induzida por fosfolipase A_2 – grupo IIA: determinação das alterações histopatológicas, comportamentais e mediação química [tese (Doutorado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2010.

As fosfolipases A_2 secretadas ($sFLA_2$) são encontradas em diversos tecidos animais e, particularmente as FLA_2 do grupo II são abundantes nos venenos de serpentes, incluindo o gênero *Bothrops*. As FLA_2 estão envolvidas em diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos, como inflamação e dor, componentes importantes de diferentes patologias, incluindo artrite. Contudo, não está totalmente caracterizado o papel da FLA_2 para a gênese e manutenção dos quadros de inflamação articular. Assim, este projeto teve por objetivo padronizar um novo modelo de artrite, utilizando uma $sFLA_2$ do grupo IIA (miotoxina II) isolada do veneno da serpente *Bothrops asper*, bem como avaliar a mediação química envolvida no processo nociceptivo presente neste quadro. Os resultados mostraram que esta FLA_2 induz inflamação articular, caracterizada pelo aumento de permeabilidade vascular, infiltrado celular e hiperalgesia. A hiperalgesia é um processo multimediado, envolvendo a participação de bradicinina, endotelina e citocinas (IL-1β, IL-6, TNFα e CINC-1). Apesar desta FLA2 ser desprovida de atividade catalítica, foi detectada participação de prostanóides neste processo, sendo sua produção decorrente da ativação de FLA_2 endógenas. Os resultados indicam ainda que a mobilização de polimorfonucleares é importante para a manifestação do fenômeno nociceptivo. Estes dados sugerem que esta FLA_2 pode se tornar uma ferramenta científica importante para o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nos processo de inflamação articular.

Palavras-chave: Phospholipase A_2. Inflamação articular. Miotoxina. *Bothrops asper*.

ABSTRACT

Dias RG. Characterization of joint inflammation induced by phospholipase A2 - Group II: determination of the histopathological changes, behavioral and chemical mediation [Ph. D. Thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2010.

Secretory phospholipases A_2 ($sPLA_2$) are abundant in different kinds of animal tissues and, particularly group II PLA_2 are found in venom snakes, including snakes from *Bothrops* genus. PLA_2s are proteins involved in many physiological and pathophysiological processes, like inflammation and pain, which are important components of different pathologies including arthritis. However, the involvement of PLA_2 in the genesis and/or maintenance of articular inflammation is not well characterized. Then, the aim of this project is to characterize the articular inflammatory response induced by Lys 49-PLA_2 (IIA group) isolated from *B. asper* snake venom. For this purpose it was analyzed the inflammatory alterations induced by this PLA_2 and determined the chemical mediation of the nociceptive process involved in this disorder, developing a new experimental model of articular inflammation. Our results demonstrated that $sPLA_2$ induces articular inflammation characterized by increase in the vascular permeability, cell migration and hyperalgesia. Hyperalgesia is a multi-mediated process that involves the participation of bradykinin, endothelin and cytokines (IL-1β, IL-6, TNFα e CINC-1). Although this PLA_2 is enzymatically inactive, prostanoids are involved in the nociceptive process, being its production dependent of the endogenous phospholipase activation. In addition, cell mobilization contributes to the sensibility alteration. Together, these data indicate that this PLA_2 could be an important scientific tool for the understanding of the pathophysiological mechanisms involved in articular inflammation processes.

Keywords: Phospholipase A_2. Articular inflammation. Myotoxin. *Bothrops asper*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FLA_2 – fosfolipase A_2

$cFLA_2$ - fosfolipase citosólica

$iFLA_2$ - fosfolipase independente de cálcio

$sFLA_2$ – fosfolipase secretada

Lp FLA_2 - lipoproteínas associadas a fosfolipase

PAF – fator de ativação plaquetária

MII – Miotoxina II

MIII – Miotoxina III

Fc – fator complemento

IL – interleucina

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

NK_1 – natural Killer tipo 1

CGRP – calcitonin gene-related peptide

NO – óxido nítrico

OA – osteoartrite

AR – artrite reumatóide

MMP – metaloproteinase de matriz

IFN-δ - interferon gama

TIMP – inibidor tecidual de metaloproteinase

COX – ciclooxigenase

LTB_4 – leucotrieno

ET- endotelina

MIP-1α - macrophage inflammatory protein 1- α

MCP-1 – monocyte chemotactic protein-1

ENA-78 – epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78

PAR-4 – receptors ativados por proteína 4

LPS- lipopolissacáride

BSA – albumina bovina sérica

EDTA – ethylenediamine tetracetic acid

CTAB – cetyl trimethilammonium bromide

OPD – O- phenylene-diamine

PMN – polimorfonuclear

MN – mononuclear

CO_2 – gás carbônico

CMC – carboximetilcelulose

DMSO – dimetilsulfóxido

AACOCF3 – arachidonyl trifluormethil ketone

PACOCF3 – palmitoyl trifluormethil ketone

PGE_2 – prostaglandina E_2

EIA – ensaio imunoenzimático

HCl – ácido clorídrico

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Número total de leucócitos presentes no exsudato coletado da articulação fêmur tíbio patelar de ratos.....59

Figura 2. Número de leucócitos mononucleares e polimorfonucleares presentes no exsudato coletado da articulação fêmur tíbio patelar de ratos.....60

Figura 3. Extravasamento de Azul de Evans para a articulação fêmur-tíbio- patelar de ratos.....62

Figura 4. Determinação da hiperalgesia articular induzida pela administração de Miotoxina II em ratos.....64

Figura 5. Análise histopatológica da articulação fêmur- tíbio- patelar de ratos, 2 (A) e 4 (B e C) horas após a injeção da Miotoxina II e 4 horas após a injeção de PBS (D).....67

Figura 6. Análise histopatológica da articulação fêmur- tíbio- patelar de ratos, 6 (A), 8 (B e C) e 24 (D) horas após a injeção da Miotoxina II.....68

Figura 7: Análise histopatológica da articulação fêmur- tíbio- patelar de ratos, 3 horas após a injeção da carragenina (A) ou PBS (B).....69

Figura 8. Análise histopatológica da articulação tíbio-tarsal de ratos, 15 minutos (A e B), 4 (C) e 6 horas (D) após a injeção da Miotoxina II.....70

Figura 9. Análise histopatológica da articulação tíbio-tarsal de ratos, 8 horas após a injeção da Miotoxina II (A e C) e após injeção de PBS (B e D) 71

Figura 10. Leucócitos mononucleares e polimorfonucleares presentes na cavidade articular tibio-tarsal (A) e fêmur-tibio-patelar (B) de ratos.....72

Figura 11. Efeito do tratamento com Indometacina (A) ou Celecoxib (B) sobre a hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II.....75

Figura 12. Efeito do tratamento com Zileuton sobre a hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II. A Miotoxina II (10 µg/25µL de PBS) ou PBS (25 µL) foram injetados na articulação tíbio társica.....76

Figura 13. Efeito do tratamento com celecoxib sobre a concentração de prostaglandina E_2 no fluido articular após 30, 120 e 360 minutos da injeção de miotoxina II.....77

Figura 14. Efeito do tratamento com antagonistas de bradicinina sobre a hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II. A Miotoxina II (10µg) ou PBS foram injetados na articulação tíbio-társica.....78

Figura 15. Efeito do tratamento com PACOCF3 OU AACOCF3 sobre a hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II.....80

Figura 16. Efeito do tratamento com LNMMA sobre a hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II. A Miotoxina II (10 µg/25µL de PBS) ou PBS (25 µL) foram injetados na articulação tíbio társica.....81

Figura 17. Efeito do tratamento com metisergida sobre a hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II. A Miotoxina II (10 µg/25µL de PBS) ou PBS (25 µL) foram injetados na articulação tíbio társica.....84

Figura 18. Efeito do tratamento com prometazina sobre a hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II.....85

Figura 19. Efeito do tratamento com antagonistas de endotelina isolados sobre a hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II.....86

Figura 20. Efeito do tratamento com a associação dos antagonistas de endotelina sobre a hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II.....87

Figura 21- Efeito do tratamento com anticorpo anti-IL-1β sobre a hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II.....89

Figura 22. Efeito do tratamento com anticorpo anti-IL-6 sobre a hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II.....90

Figura 23. Efeito do tratamento com anticorpo anti-TNFα sobre a hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II.....91

Figura 24. Efeito do tratamento com anticorpo anti-CINC-1 sobre a hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II.....92

Figura 25- Efeito do tratamento com GM6001 sobre a hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II.....93

Figura 26. Efeito do tratamento com fucoidina sobre a hiperalgesia articular e migração celular induzidas pela miotoxina II.....95

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA 33

2 MATERIAL E MÉTODOS 47

2.1 Animais 47

2.2 Fosfolipase A_2 47

2.3 Injeção intraarticular 47

2.3.1 Injeção na articulação fêmur-tíbio-patelar 48

2.3.2 Injeção na articulação tíbio-ársica 48

2.4 Determinação da migração leucocitária 49

2.4.1 Na articulação fêmur-tíbio-patelar.....49

2.4.2 Na articulação tíbio-ársica 49

2.5 Teste de viabilidade celular 50

2.6 Determinação das alterações de permeabilidade vascular na articulação fêmur-tíbio-patelar 51

2.7 Determinação da nocicepção 51

2.8 Análise histopatológica e morfométrica da articulação fêmur-tibio-patelar e tíbio-tarsal 52

2.9 Tratamentos farmacológicos 53

2.10 Ensaio bioquímico para determinação das concentrações de prostaglandina.....56

3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....57

4 RESULTADOS 58

4.1 Determinação do número de células no exsudato obtido da articulação fêmur-tíbio-patelar de ratos.....58

4.2 Teste de viabilidade celular.....61

4.3 Determinação das alterações da permeabilidade vascular.....62

4.4 Determinação da nocicepção induzida pela Miotoxina II.....63

4.5 Análise histopatológica e dados morfométricos da articulação fêmur-tíbio-patelar e tíbio-tarsal de ratos.....65

4.6 Tratamentos farmacológicos.....73

4.6.1 Participação de eicosanóides na hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II.....73

4.6.2 Determinação da concentração de prostaglandina (PGE_2) no fluido sinovial de animais injetados com a miotoxina II.....73

4.6.3 Participação da bradicina na hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II.....73

4.6.4 Participação das fosfolipases endógenas na hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II.....79

4.6.5 Participação do Óxido Nítrico na hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II.....79

4.6.6 Participação da serotonina na hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II.....82

4.6.7 Participação da histamina na hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II.....82

4.6.8 Participação da endotelina na hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II.....82

4.6.9 Participação das citocinas na hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II.....88

4.6.10 Participação das metaloproteinases na hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II.....88

4.6.11 Contribuição da migração celular induzida pela miotoxina II para o processo hiperalgésico.....94

5 DISCUSSÃO 96

6 CONCLUSÕES 111

REFERÊNCIAS 112

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

As doenças articulares, como a osteoporose e a artrite reumatóide, afetam centenas de milhões de pessoas em todo o mundo, atingindo particularmente a população adulta. Estas doenças podem ter diversas etiologias que resultam na presença de processo inflamatório e alterações do metabolismo ósseo (Artigo para revisão) (Libbrandt e Penninger, 2009). Apesar dos avanços no conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na gênese e manutenção destes distúrbios (Libbrandt e Penninger, 2009; Manzo et al., 2009), estes mecanismos não são ainda totalmente conhecidos e os sintomas decorrentes destas alterações, particularmente alterações funcionais e dor, nem sempre são adequadamente controlados.

Dados de literatura demonstram que nestes quadros inflamatórios articulares, independentemente da etiologia, existe a presença de níveis elevados de fosfolipases no fluido sinovial dos pacientes, em especial, de fosfolipase secretada do tipo II-A (Forster et al., 1985; Hurtig et al., 2001; Leistad et al., 2004). As fosfolipases são as enzimas-chave na liberação de ácido aracdônico, substrato para biossíntese de diversos mediadores lipídicos que desencadeam os processos inflamatórios (Dennis, 1994) entretanto, apesar das evidências de presença de níveis elevados de fosfolipases A_2 no fluido sinovial de pacientes com inflamação articular, não está totalmente caracterizada a contribuição destas enzimas, para a gênese e manutenção das artrites.

As fosfolipases A_2 (FLA_2) constituem uma família de proteínas estruturalmente relacionadas, capazes de hidrolisar a ligação acíl-éster na posição sn-2 de fosfoglicerídeos e liberar quantidades equimolares de ácidos graxos livres, como ácido araquidônico e lisofosfolipídeos (van Scharrenburg et al., 1982; Dennis, 1994). O ácido aracdônico é substrato para biossíntese de mediadores lipídicos envolvidos na resposta inflamatória, tais como prostaglandinas, leucotrienos e fatores de agregação plaquetária (Parente et al., 2001) que são capazes de afetar a permeabilidade vascular e o fluxo de sangue da microcirculação promovendo a infiltração celular para o sítio inflamatório, além de promover dano tecidual pela liberação de enzimas lisossomais,

proteínas catiônicas e espécies reativas de oxigênio (artigo para revisão) (Harris, 1993).

As FLA_2 estão amplamente distribuídas em diversos tecidos de mamíferos, principalmente de humanos, camundongos e bovinos, além de serem encontradas em venenos de serpentes, de abelhas, no lagarto Heloderma, plantas e no caracol marinho Conodipina sp (Ho et al., 2001). As FLA_2 são divididas em quatro principais tipos: as FLA_2 citosólicas ($cFLA_2$), FLA_2 independentes de cálcio ($iFLA_2$), FLA_2 secretadas ($sFLA_2$) e as PAF acetilhidrolases ou lipoproteínas associadas a FLA_2 ($LpPLA_2$) (Burke e Dennis, 2009) e juntas compõem 15 grupos de FLA_2 e muitos subgrupos, cujas enzimas diferem na estrutura e mecanismos catalíticos (Schaloske, 2006; Six e Dennis, 2006; Burke e Dennis, 2009; Magrioti e Kokotos, 2010).

Conforme citado anteriormente, a $sFLA_2$ do tipo II-A está presente no fluido sinovial de pacientes com inflamação articular e por isso estas $sFLA_2$ apresentam particular interesse neste estudo. Neste sentido, as $sFLA_2$ utilizam como unidade catalítica a histidina na posição 48 e o aspartato na posição 99 e requerem quantidades milimolares de cálcio para catálise. São divididas em 11 grupos (I, II, III, V, IX, X, XI, XII, XII, XIIIa e XIV) com base na estrutura primária e na presença de pontes dissulfídicas intramoleculares segundo a revisão de Burke e Dennis (2009). Em 2001, foi relatada por Soragni et al. (2001) a primeira fosfolipase isolada de fungos e bactérias, denominada TbSP1, proposta como pertencente ao grupo XIII destas enzimas. Canaan et al. (2004) propuseram a existência de um grupo adicional de FLA_2 secretadas, constituído por enzimas presentes em parvovírus, que foi caracterizada como do grupo XIV destas enzimas.

As $sFLA_2$ estão amplamente distribuídas, sendo encontradas em animais vertebrados e invertebrados, plantas, bactérias e vírus. Em mamíferos são encontradas 10 isoenzimas com atividade catalíticas (Murakami et al., 2001). As $sFLA_2$ desempenham várias funções fisiológicas, contudo as funções destas enzimas, inclusive na produção de eicosanóides, não estão totalmente esclarecidas (Lambeau e Gelb, 2008).

A caracterização de proteínas de membrana e solúveis, que se ligam as $sFLA_2$ sugere que, além da atividade enzimática, estas enzimas possam funcionar também

como ligantes de alta afinidade. Dois tipos de receptores para FLA_2 foram isolados: receptor tipo N (neuronal), que tem afinidade elevada pelas FLA_2 neurotóxicas de venenos animais, sendo considerado o receptor que medeia os efeitos tóxicos destes venenos; e um receptor tipo M (músculo), que apresenta estrutura semelhante ao receptor para manose de macrófagos e é expresso por células do músculo esquelético, pulmões, rins e fígado (Valentin et al., 2000).

1.1 Fosfolipases A_2 miotóxicas

As $sFLA_2$ são enzimas abundantes nos venenos de serpentes do gênero Bothrops e estão envolvidas em uma ampla variedade de processos fisiológicos, incluindo digestão fosfolipídica e defesa do hospedeiro, além de causarem vários efeitos fisiopatológicos, caracterizados por efeitos neurotóxico, cardiotóxico, anticoagulante, antiplaquetário, hemolítico, inflamatório e mionecrótico (Rosenberg et al., 1986; Harris et al., 1991; Lambeau e Gelb, 2008; Boyanovsky e Webb, 2009).

Algumas das $sFLA_2$ presentes nos venenos das serpentes do gênero Bothrops possuem importante atividade miotóxica (Queiroz et al., 1984; Gutierrez e Lomonte, 1995; Queiroz et al., 2002). Estas fosfolipases são estruturalmente caracterizadas como pertencentes ao grupo II. A atividade miotóxica destas $sFLA_2$ não depende exclusivamente de sua atividade catalítica, visto que apesar da homologia sequencial, algumas fosfolipases, destituídas de atividade enzimática e incapazes de hidrolisar fosfolipídeos, também apresentam atividade miotóxica. Está bem estabelecido que as FLA_2 dos grupos I e II possuem aspartato na posição 49 (Asp49) e apresentam atividade catalítica elevada, como, por exemplo, a miotoxina III de *B. atrox* e de *B. asper*, a miotoxina II de B. godmani, as frações SIII e SIV de B. insularis e as toxinas PLA-B e PLA-N de *Trimeresurus flavoviridis*. No entanto, outras FLA_2 homólogas, com baixa ou nenhuma atividade catalítica, como por exemplo, a miotoxina II da *B. asper*, a Bothropstoxina-I (BTX-I) de *B. jararacussu*, a piratoxina I de *B. pirajaí*, a Moojetoxina I da *B. moojeni*, a BnSp-7 da *B. neuwiedi pauloensis* e as BPI e BPII de *Trimeresurus flavoviridis*, mantém potente atividade miotóxica. Estas FLA_2 têm como característica, a presença de uma lisina na posição 49 (Lys 49) (Gutierrez, 1985; Canduri, Mancuso

et al., 1998). Estudos de cristalografia mostraram que o grupo σ-amino do resíduo Lys49 está localizado na posição ocupada pelo íon cálcio, cofator essencial para a estabilização do intermediário tetraédrico durante a reação de catálise pelas FLA_2-Asp49 (Holland et al., 1990; Arni et al., 1995; Lee e Schmid-Schonbein, 1995), o que explica a baixa ou nenhuma atividade catalítica destas fosfolipases. Apesar da redução ou ausência de atividade enzimática, as $sFLA_2$-Lys49 homólogas mantém a habilidade de lesar membranas biológicas e sintéticas, por um mecanismo pouco conhecido, mas que parece estar relacionado com a capacidade de promover um efluxo de íons potássio e aumentar a liberação de ATP no meio extracelular e induzir a lesão em células vizinhas (Rufini et al., 1992; Gutierrez e Lomonte, 1995; Cintra-Francischinelli et al., 2010).

Tem sido sugerido que sítios ricos em aminoácidos carregados positivamente presentes na molécula destas FLA_2, são importantes para o desencadeamento de sua atividade farmacológica (Lomonte et al., 1994; Landucci et al., 1998; Landucci et al., 2000).

1.2 Efeitos inflamatórios e nociceptivos de fosfolipases miotóxicas

Vários dados de literatura têm mostrado que as FLA_2 isoladas de venenos de serpentes induzem resposta inflamatória e dor (Teixeira et al., 2003) contribuindo significativamente para o quadro inflamatório local observado nos envenenamentos por estas serpentes. Grande parte do conhecimento dos mecanismos farmacológicos envolvidos no processo inflamatório acarretado por estas FLA_2 miotóxicas foi obtido após a descoberta das variantes Lys49, reconhecidas como toxinas homólogas às FLA_2, mas destituídas de atividade enzimática (Ownby et al., 1999).

Dados da literatura têm mostrado que as FLA_2s isoladas de venenos de animais são capazes de induzir inflamação *in vivo*, provavelmente pelo aumento de produção de mediadores inflamatórios lipídicos (Murakami et al., 2001; Kudo et al., 2002; Lambeau et al., 2008). Em relação as FLA_2 obtidas de venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, foi demonstrado que miotoxinas com estrutura de FLA_2 (variantes Lys49 e Asp49) isoladas do veneno de *B. asper* e *B. jararacussu*, induzem a formação

de edema (Ownby et al., 1999; Chaves et al., 1998; Landucci et al., 1998). O edema acarretado por FLA_2 isoladas do veneno da *Bothrops asper* é multimediado, envolvendo a participação de histamina, serotonina, prostaglandina, cininas e óxido nítrico, além de receptores alfa-adrenérgicos (Gutiérrez et al., 1986; Osaka, 1989; Chaves et al., 1998, Chaves et al., 1995; Teixeira et al., 2003; Chaves et al., 2006; Olivo et al., 2007).

Algumas das FLA_2 isoladas de venenos botrópicos acarretam ainda, a desgranulação de mastócitos, com conseqüente liberação de mediadores inflamatórios envolvidos no aumento da permeabilidade vascular (Landucci et al., 1998; Landucci et al., 2000, Fernandez et al., 2010). Estas ações inflamatórias dependem, pelo menos em parte, e em especial, para as FLA_2 variantes Lys49, das propriedades catiônicas destas moléculas (Chaves et al., 1998; Landucci et al., 1998; Lambeau e Gelb, 2008). Estes dados corroboram a hipótese de que estas FLA_2 básicas exercem seus efeitos biológicos por meio de interações eletrostáticas destes resíduos catiônicos com sítios negativos na membrana celular, representados principalmente pelos proteoglicanos, enquanto que resíduos hidrofóbicos, principalmente os aromáticos, interagem e penetram a bicamada fosfolipídica da membrana celular, resultando na sua desestabilização (Nunez et al., 2001).

Além do componente vascular, as fosfolipases miotóxicas afetam também o componente celular da resposta inflamatória. A injeção intraplantar (i.pl) em ratos, da Miotoxina II (FLA_2-Lys49) isolada do veneno de *B. asper*, acarreta intenso infiltrado neutrofílico (Lomonte, 1994). Ainda, em modelo de pleurisia em ratos, foi observado que a Bothropstoxina I e II, duas miotoxinas, variantes Lys49 e Asp49, respectivamente, isoladas do veneno de *B. jararacussu* e a piratoxina I (*B. pirajai*) induzem o recrutamento de leucócitos, por mecanismo independente da atividade enzimática (de Castro et al., 2000). Ensaios *in vitro* evidenciaram que FLA_2 miotóxicas são também capazes de acarretar quimiotaxia de neutrófilos humanos, resultante da liberação de leucotrieno B_4 e PAF (Gambero et al., 2002). Adicionalmente, Zuliani et al. (2005) mostraram que a MII (destituída de atividade enzimática) e a miotoxina III (MIII, com atividade enzimática) obtida do veneno da *B. asper* estimulam, diferentemente o processo de fagocitose e a atividade do “burst” respiratório de macrófagos. Nestes

estudos foi observado que a MII estimula a fagocitose via receptores para Fc da IgG, complemento, manose e β-glucano, enquanto a MIII, que apresenta atividade enzimática é capaz de estimular a fagocitose somente via receptores para manose e β-glucano (Zuliani et al., 2005b). Estudos experimentais têm mostrado ainda, que as MII e a MIII estimulam a produção e liberação de diversos medidadores inflamatórios no local da administração e também em ensaios *in vitro*, tais como: IL-1, IL-6, TNF-α, leucotrienos, tromboxana, prostaglandina E_2 e prostaglandina D_2 (Zuliani et al., 2005; Moreira et al., 2008). Estes estudos têm sugerido ainda que a ciclooxigenase do tipo 2 é a principal isoforma envolvida na síntese de prostaglandinas e leucotrienos induzida por estas FLA_2s (Moreira et al., 2008).

Apesar das inúmeras atividades inflamatórias descritas para FLA_2 isoladas de venenos de serpentes (Pruzanski e Vadas, 1991; Wang e Teng, 1992; Chaves et al., 1998; Landucci et al., 1998; Teixeira et al., 2003), pouco se conhecia sobre os efeitos nociceptivos destas toxinas e sua contribuição para a dor observada nos envenenamentos ofídicos. A primeira evidência de que FLA_2 miotóxicas induzem nocicepção foi apresentada por Chacur e colaboradores (Chacur et al., 2004), demonstrando que a MII e MIII, isoladas do veneno de *Bothrops asper*, acarretam hiperalgesia, quando injetadas na pata de ratos, mas apenas a MIII é capaz de induzir alodinia. Por outro lado, em um modelo de neurite inflamatória induzida também em ratos, ambas as toxinas foram capazes de acarretar alodinia (Chacur et al., 2004). Estudos experimentais sobre a mediação química envolvida no efeito hiperalgésico destas FLA_2, injetadas por via i.pl., mostraram que este fenômeno é um processo multimediado, dependente da ação da bradicinina em receptores B_2, e pelo menos parcialmente, da liberação de histamina, serotonina e citocinas pró-inflamatórias (TNF-α e IL-1). Além disso, foi demonstrado que a hiperalgesia induzida pela MII, destituída de atividade enzimática, é mediada também por prostanóides e por aminas simpatomiméticas (Chacur et al., 2003). A caracterização dos mecanismos centrais (medula espinhal) envolvidos nos fenômenos nociceptivos causados por ambas as fosfolipases mostraram que astrócitos e microglia são essenciais para o desencadeamento destes fenômenos (Chacur et al., 2004). Ainda na medula espinhal, receptores NK_1 (Natural Killer tipo 1) e para CGRP (Calcitonin gene-related peptide),

receptores ionotrópicos para glutamato, a IL-1 (interleucina-1), o NO (óxido nítrico) e prostanóides participam da hiperalgesia induzida por ambas as toxinas (Chacur et al., 2004). Adicionalmente, receptores metabotrópicos para glutamato e o TNFα (Tumor necrosis factor-α) estão envolvidos na hiperalgesia induzida pela MIII. Estes dados sugerem que apesar de não ser essencial para o desencadeamento de hiperalgesia, a atividade catalítica é importante para a determinação da mediação química envolvida neste fenômeno. Os estudos sobre os mecanismos estruturais envolvidos na gênese da hipernocicepção mostraram que para a MII, este fenômeno é decorrente da presença de resíduos catiônicos/hidrofóbicos presentes na região 115-129 da porção C-terminal da molécula (Chacur et al., 2003).

1.3 Inflamação articular

Em 2003, Lebrão e Duarte realizaram levantamento sobre as doenças mais comuns em idosos no município de São Paulo, no Brasil, e demonstraram que os distúrbios articulares correspondem a 31,7% das doenças que acometem pacientes com mais de 60 anos.

As articulações são estruturas constituídas por duas superfícies ósseas, recobertas pela membrana sinovial, formando a cápsula articular. As células do tecido sinovial (sinoviócitos) produzem um líquido transparente (líquido sinovial) que preenche a cápsula, promovendo a lubrificação da articulação, reduzindo o atrito e facilitando o movimento. A manutenção da cartilagem articular, que é composta predominantemente pela matriz extracelular (colágeno, proteoglicanos e ácido hialurônico) e por condrócitos, é dependente do equilíbrio entre as atividades catabólicas e anabólicas. Quando ocorre reparo ou crescimento, os processos anabólicos são mais intensos que os catabólicos. Já em alguns tipos de inflamação, observa-se aumento da atividade catabólica em relação à atividade anabólica (Haupt et al., 2005).

Durante a inflamação articular (ou artrites), ocorrem dois principais processos fisiopatológicos: inflamação e perda da cartilagem articular. O tecido sinovial inflamado apresenta intenso infiltrado celular, caracterizado principalmente por linfócitos e

macrófagos. Células polimorfonucleares, como neutrófilos, estão também presentes no fluído articular, principalmente na fase aguda do processo (Harris, 1990; Yanni et al., 1994), sendo a mobilização destas células mediada por quimiocinas, C5a e leucotrieno B_4. Em relação às células inflamatórias, tem sido demonstrada correlação entre a presença de macrófagos e a lesão cartilaginosa (Mulherin et al., 1996). Os macrófagos, presentes principalmente na membrana sinovial, tornam-se ativados, produzindo diferentes mediadores químicos, além de enzimas da família das metaloproteinases, que podem favorecer a destruição da cartilagem (Mulherin et al., 1996) e do osso. Hiperplasia e hipertrofia sinovial podem ocorrer, com aumento no volume do fluído sinovial. Os sinais clássicos da inflamação estão presentes, incluindo a dor (Evans e Robbins, 1996).

As artrites podem ser de diferentes tipos e origens, como por exemplo, injúria mecânica ou deposição de cristais, como na osteoartrite (OA) ou decorrente de processos autoimunes, como na artrite reumatóide (AR). A OA é o tipo mais comum de artrite, sendo caracterizada por fibrose capsular, formação de osteofito e inflamação da membrana sinovial (Tehranzadeh et al., 2005). A artrite reumatóide é uma doença sistêmica articular degenerativa, caracterizada pela destruição progressiva da cartilagem e de estruturas ósseas das articulações (Firestein, 1991). A OA e AR são caracterizadas principalmente pelo desequilíbrio entre a síntese e a degradação da matriz extracelular da cartilagem articular, estando a degradação dos complexos de proteoglicanos acelerada nestes pacientes (Saxne et al., 1987; Bensouyad et al., 1990; Poole et al., 1994). A perda de proteoglicanos é causada pela grande expressão de proteinases, resultante de um desequilíbrio dessas enzimas e seus inibidores (Schuright et al., 2005). As metaloproteinases de matriz (MMPs) têm papel central na degradação da cartilagem (Martel-Pelletier e Pelletier, 1987). As MMPs são secretadas na forma inativa, pelos condrócitos e por células sinoviais, em resposta à presença de mediadores inflamatórios como IL-1β, TNF-α e IFN-δ (interferon-δ), são armazenadas na matriz e ativadas após clivagem (Palmer et al., 1988; Murrell et al., 1995; Nagase 1997). A estromelisina (MMP-3) e as colagenases são as principais MMPs envolvidas na degradação do colágeno durante inflamação articular (van Meurs et al., 1999; van Kujik et al., 2010). Dentre as colagenases, as MMPs 1, 8 e 13 se distinguem das

outras enzimas pela sua habilidade de clivar o colágeno tipo II, o principal componente da matriz extracelular da cartilagem articular (Mitchell et al., 1996). Em decorrência dos seus efeitos sobre a matriz extracelular, as gelatinases, particularmente a MMP 2 e MMP 9, são também consideradas importantes para a progressão da degradação da cartilagem, durante a artrite (Ahrens et al., 1996; Goldbach-Mansky et al., 2000; Itoh et al., 2002).

A atividade das MMPs é controlada em parte, pelos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (Baker et al., 2002). O desequilíbrio entre estas proteinases e seus inibidores acarreta alteração na proteólise dos componentes da cartilagem articular. Na artrite, a cartilagem tem baixa capacidade intrínseca de recuperação e o processo contínuo de destruição da cartilagem acarreta degradação irreversível da fibra do colágeno.

A inflamação articular consiste em um processo inflamatório multimediado, havendo interação entre os diversos mediadores químicos e estudos in vivo e in vitro têm indicado que o TNF-α e a IL-1 estão envolvidos na gênese e progressão da destruição da cartilagem articular (Goldring, 2001; Pelletier et al., 2001).

Nos processos inflamatórios, de maneira geral, a IL-1β está envolvida com diversas fases deste processo, como o recrutamento leucocitário, febre e aumento da permeabilidade vascular (Goldblum et al., 1988; Moser et al., 1989; Dinarello, 1994). Ainda, é sabido que a IL-1β estimula a expressão de COX-2 e subsequente liberação de prostaglandinas (Bernheim, 1986; Zucali, Dinarello et al., 1986; Crofford et al., 1994), que por sua vez, são capazes de sensibilizar nociceptores e por isso é um importante mediador hipernociceptivo inflamatório (Ferreira et al., 1988). A hipernocicepção induzida por IL-1β é mediada pela ativação de receptores de membrana específicos e subsequente síntese de prostaglandinas (Hori et al., 1990; Oka et al., 1993). No entanto, além da sensibilização de nociceptores por produção de prostanóides, ocorre a participação de outros mediadores inflamatórios como a serotonina, histamina e outras citocinas, entre elas o TNF-α (Doak e Sawynok, 1997; Parada et al., 2001; Oliveira et al., 2005). Tanto o TNF-α como a IL-1 aumentam a produção e secreção de metaloproteinases de matriz e catepsinas em fibroblastos

(Dayer et al., 1985; Lemaire et al., 1997; Vincenti e Brinckerhoff, 2002; Schuright et al., 2005).

Adicionalmente à ativação de MMPs, o TNF-α é capaz de acarretar recrutamento leucocitário (Bombini et al., 2004). Ainda, a IL-6, encontrada em níveis elevados no soro e no fluido sinovial de pacientes com AR (Madhok et al., 1993; Sack et al., 1993; Miyazawa et al., 1999; Nishimoto et al., 2004), está envolvida na ativação das células imunes e produção de anticorpos, osteoclastogênese, perda óssea e com os sintomas de debilidade física associados à resposta de fase aguda, importantes na gênese e manutenção da artrite. A IL-15 também tem sido detectada no líquido sinovial de animais suscetíveis a artrite induzida por colágeno tipo II (McInnes et al., 1996) e o aumento da expressão de RNAm para esta interleucina foi demonstrado no tecido sinovial de pacientes com artrite reumatóide (Thurkow et al., 1997). Da mesma maneira, a presença de IL-17 tem sido relatada em quadros de inflamação como em artrite reumatóide (Arend, 1997; Brennan e McInnes, 2008). Esta interleucina induz recrutamento e ativação de leucócitos, liberação de outras citocinas, quimiocinas e mediadores citotóxicos (Fossiez et al., 1996; Albanesi et al., 1999; Jones e Chan, 2002; Ruddy et al., 2004; Ruddy et al., 2004; Witowski et al., 2004). Dados experimentais tem mostrado ainda, que esta citocina induz nocicepção (Pinto et al., 2010).

A IL-18 também tem papel importante na AR (Naik et al., 1999; Greene et al., 2000). É expressa na sinóvia, favorecendo a artrite por mecanismos que incluem recrutamento de neutrófilos, via TNF-α e LTB_4 (leucotrienos), e ativação de macrófagos (Gracie et al., 1999; Canetti et al., 2003). Assim, a função da IL-18 na artrite clínica e experimental está bem documentada (Gracie et al., 1999; Joosten et al., 2000; Plater-Zyberk et al., 2001; Wei et al., 2001). Verri et al. (2007) sugeriram que a IL-18 está relacionada com a hipernocicepção articular na inflamação induzida por antígeno e com o aumento da produção de IFN-γ, ET-1 (endotelina) e prostaglandina E2. No processo inflamatório não articular, esta interleucina contribui com o edema e migração neutrofílica induzida pela carragenina (Leung et al., 2001).

Vários estudos têm mostrado o envolvimento de outras quimiocinas, como IL-8 (interleucina-8), MIP-1α (Macrophage inflammatory protein 1-α), MCP-1 (Monocyte

chemotactic protein-1) e ENA-78 (Epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide 78), e seus receptores, na artrite. As quimiocinas são produzidas pelas células da sinóvia e cartilagem e estimulam a migração leucocitária e a proliferação e produção de metaloproteinases por fibroblastos (Szekanecz et al., 2003; de Kock et al., 2004).

A endotelina tem sido apontada como importante mediador nos processos de artrite. Em especial, a endotelina-1 é encontrada em níveis elevados no fluido sinovial e no plasma de pacientes com OA e AR, estando correlacionada com a severidade do processo (Nahir et al., 1991; Yoshida et al., 1998). Tem sido mostrado o envolvimento destes mediadores em doenças crônicas com extensa destruição da matriz extracelular. Estes mediadores são capazes de regular a expressão de MMPs, particularmente colagenases (Roy-Beaudry et al., 2003), por meio da interação com receptores ET_A (Podesser et al., 2001). A produção de endotelina-1 por condrócitos é aumentada por citocinas e fatores de crescimento (Khatib et al., 1997). De fato, Conte et al. (2008) demonstraram que as ETs contribuem para a inflamação da articulação do joelho, em modelo de artrite induzida por zimosan em camundongos, via receptores ETA e ETB, modulando a formação de edema, recrutamento neutrofílico e produção de mediadores inflamatórios.

A bradicinina é outro mediador importante na artrite reumatóide (Couture et al., 2001) e na resposta inflamatória articular, tanto via ativação de receptores B1, quanto receptores B2 (Guzzo et al., 2000). A bradicinina é um mediador inflamatório encontrado no fluido sinovial e parece estimular diretamente nociceptores de terminais nervosos sensoriais participando do processo de geração de dor (Wood e Docherty, 1997; Schaible et al., 2002). De fato, Yamashita et al. (1995) relataram que receptores nociceptivos intraarticulares são estimulados pela administração de bradicinina.

Confirmando a participação da bradicinina nestes eventos nociceptivos articulares, MdDougall et al. (2009) demonstraram que a ativação local de PAR-4 (receptores ativados por proteinase tipo 4) induz efeitos pró-inflamatórios e pró-nociceptivos na articulação do joelho de ratos, dependentes do sistema calicreína-cinina, sendo que o bloqueio destes receptores articulares pode ser utilizado como meio de controle da inflamação articular e dor.

Estudos experimentais tem evidenciado ainda, em modelos de artrite, que a bradicina pode acarretar a produção de NO (Guzzo et al., 2000; Couture et al., 2001; Mello et al., 2002). O NO produzido localmente nas articulações, na vigência de osteoartrite e artrite reumatóide (Evans e Robbins, 1996) acarreta a degradação da cartilagem articular (Hashimoto et al., 1998). Neste processo, a atividade da NO sintase está correlacionada ao aumento da atividade de metaloproteinases (Hirai et al., 2001) e o aumento nos níveis de NO, induzido por IL-1, medeia a síntese de metaloproteinases de matriz e de fator de crescimento de fibroblastos, favorecendo a degradação da cartilagem articular e a angiogênese na sinóvia de articulações artríticas (Sasaki et al., 1998).

Dentre os mediadores pró-inflamatórios envolvidos na patogênese da inflamação articular, cabe ressaltar ainda a participação dos eicosanóides (Laufer, 2003; Kojima et al., 2005). Osteoblastos obtidos de indivíduos com OA produzem quantidades variáveis de prostaglandinas e leucotrieno B_4 (LTB_4) (Laufer, 2003) e ambos os eicosanóides são detectados no fluído sinovial de pacientes com artrite reumatóide (Kojima et al., 2005). As prostaglandinas e o LTB_4 regulam a síntese de citocinas pró-inflamatórias e de colágeno e o seu envolvimento nos mecanismos de artrite tem sido demonstrado em modelos experimentais de inflamação articular (Rocha et al., 1997; Bombini et al., 2004; Kojima et al., 2004). Em sinóvia obtida de pacientes com osteoartrite, foi observado, após o tratamento farmacológico com inibidores de ciclooxigenases, desvio do metabolismo do ácido araquidônico para a via das lipoxigenases, estando estes metabólitos envolvidos no aumento na produção de IL-1 (Marcouiller et al., 2005) e metaloproteinases (Martel-Pelletier e Pelletier, 1987).

O principal precursor dos eicosanóides é o ácido araquidônico, o qual é clivado dos fosfolipídios de membrana, pelas FLA_2 citoplasmáticas (tipo IV) ou secretadas (tipo II e V) (Chapman et al., 2000). A FLA_2 citosólica ($cFLA_2$) possui função crítica na patogênese da artrite. Hegen et al. (2003) observaram que animais deficientes desta FLA_2 apresentam redução da inflamação e da formação de pannus ósseo em modelo experimental de artrite induzida por colágeno. Ainda, estudos de reabsorção óssea induzida por LPS indicam que a $cFLA_2$ tem papel importante para esta reabsorção

(Miyaura, 2003). Este efeito parece ser mediado pela PGE_2 (Masuda e Okamoto, 2005).

Está bem estabelecido que o fluido sinovial de pacientes com artrite reumatóide contém alta atividade de $sFLA_2$ e esta atividade tem sido correlacionada com a severidade da doença (Kramer et al., 1989; Pruzanski et al., 1995), Por meio de ensaios bioquímicos e estudos de clonagem molecular, esta atividade têm sido atribuída à $sFLA_2$ do grupo IIA. Em tecidos de pacientes com artrite reumatóide, verificou-se que a $sFLA_2$-IIA é detectada em várias células, como as células sinoviais, condrócitos e fibroblastos (Jamal et al., 1998; Masuda e Okamoto, 2005). Adicionalmente foi observado que a expressão destas enzimas está aumentada em macrófagos sinoviais da artrite reumatóide e em fibroblastos de sinóvias de indivíduos não artríticos (Jamal et al., 1998). A $sFLA_2$-IIA humana causa inflamação aguda quando administrada em articulações de coelhos (Bomalaski et al., 1991) entretanto, $sFLA_2$-IIA de camundongos transgênicos não induz desenvolvimento de artrite. Em 2005, Masuda e colaboradores observaram também a expressão de outras fosfolipases secretadas, em tecidos de AR humana, evidenciando a presença de $sFLA_2$ do grupo IID em folículos linfáticos e no endotélio capilar, do grupo IIE na musculatura lisa vascular e do grupo V, nos fibroblastos intersticiais.

A presença de níveis elevados de FLA_2s, particularmente secretadas, no fluido sinovial, sugere que estas fosfolipases tenham papel importante na artrite. Contudo, os mecanismos envolvidos na ação destas enzimas na gênese das alterações fisiopatológicas e na liberação de mediadores químicos envolvidos na artrite não estão ainda totalmente caracterizados.

Os dados em conjunto sugerem que os mediadores inflamatórios têm importante papel na fisiopatologia dos fenômenos da artrite. Os tratamentos existentes para o controle desta patologia não são ideais ou totalmente eficazes. Assim, é importante a padronização de novos modelos de artrite para a compreensão da fisiopatologia e do controle desta inflamação. Uma vez que as FLA_2 secretadas estão presentes em abundância no fluido sinovial de pacientes com inflamação articular e baseados nos estudos de que a miotoxina II (fosfolipase A_2 secretada do grupo IIA) isolada do veneno da Bothrops asper, tem importante papel na gênese de inflamação

e dor, a utilização desta FLA_2 como ferramenta para indução de inflamação articular pode contribuir para o melhor entendimento do papel das $sFLA_2$ neste processo, bem como para ampliar a caracterização da mediação química e da ativação das células nestes processos inflamatórios.

*

* *

O objetivo geral deste trabalho é caracterizar a resposta inflamatória e nociceptiva articular induzida pela Miotoxina II (variante Lys49) obtida do veneno de serpentes *B. asper*.

Os objetivos específicos são avaliar:

- a resposta inflamatória causada pela injeção intraarticular (i.a.) da FLA_2 por meio da determinação das alterações de permeabilidade vascular e da migração leucocitária;
- as alterações histopatológicas e morfométricas da articulação fêmur-tíbio-patelar e tíbio-tarsal de animais injetados com a miotoxina,
- a resposta nociceptiva induzida pela toxina;
- os mecanismos (mediadores químicos) envolvidos na dor induzidos pela injeção intraarticular de FLA_2.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos (180 a 200g), fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan e mantidos com água e ração *ad libitum* em sala apropriada, com isolamento acústico, temperatura controlada (22 °C ± 1) e ciclo claro-escuro (12:12 h), por um período mínimo de 3 dias antes dos experimentos. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan - CEUAIB (nº 240/05) e do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (nº054/06) e estão de acordo com os princípios éticos da Associação Internacional de Estudo da Dor, segundo Zimmermann (1983).

2.2 Fosfolipase A_2

Foi utilizada uma FLA_2 variante Lys-49 (Miotoxina II), isolada e purificada do veneno bruto de serpentes *Bothrops asper*. O isolamento e purificação foram realizados pelos Drs. José Maria Gutiérrez e Bruno Lomonte, do Instituto Clodomiro Picado da Universidade da Costa Rica, segundo a técnica descrita por Lomonte e Gutiérrez, 1989. A miotoxina, liofilizada, foi mantida a –20 ºC. No momento do uso, a miotoxina foi diluída em solução estéril de PBS e administrada por via intraarticular. Animais controles foram tratados com PBS ou BSA.

2.3 Injeção intrarticular

Foram utilizadas as articulações fêmur-tibio-patelar e tibio-tarsal de ratos para os distintos métodos utilizados. A articulação fêmur-tibio-patelar foi empregada na investigação da determinação das alterações de migração leucocitária, de permeabilidade vascular e nos ensaios bioquímicos para detecção da produção de óxido nítrico e para determinação das concentrações de prostaglandina E_2. A articulação tibio-tarsal foi utilizada para determinação da nocicepção induzida pela

miotoxina II e nos ensaios de detecção de peroxidase nos extratos articulares. A utilização de cada articulação foi escolhida devido ao tipo de técnica empregada em cada teste associada ao meio de coleta do material a ser examinado. As análises histopatológicas e morfométricas foram realizadas em ambas articulações.

2.3.1 Injeção na articulação fêmur-tíbio-patelar

Os animais foram anestesiados por inalação de halotano (Cristália Ltda, Brasil) e colocados em decúbito dorsal. Foi realizada tricotomia da região da articulação fêmur-tíbio-patelar do membro direito. O membro foi flexionado com a finalidade de facilitar a introdução da agulha na porção lateral ao ligamento patelar. Para a injeção dos compostos, foi utilizada seringa de 0,5 mL com agulha (5/16", 30G). Foram administrados os seguintes compostos: Carragenina, como controle positivo (Marine Colloids®, 200 µg/ 50µL), Miotoxina II (em diversas concentrações/ 50µL), ou PBS (50µL).

2.3.2 Injeção na articulação tíbio-társica

Os animais foram anestesiados por inalação de halotano (Cristália Ltda, Brasil) e colocados em decúbito dorsal. Foi realizada extensão do membro para facilitar a introdução da agulha, que foi realizada perpendicularmente à articulação (articulação tíbio-társica direita). Para a injeção dos compostos, foi utilizada seringa de 0,5 mL com agulha (5/16", 30G). Foram administrados os seguintes compostos: Zimosan, como controle positivo (SIGMA®; 30µg/ 25µL), Miotoxina II (10µg/ 25µL), albumina bovina sérica, como controle negativo (BSA: 20 µg/ 25µL) ou PBS (25µL).

2.4 Determinação da migração leucocitária

2.4.1 Na articulação fêmur-tibio-patelar

Em diversos tempos após a administração intraarticular (i.a.) de Miotoxina II, PBS ou ainda carragenina (controle positivo), os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical e as células presentes na cavidade articular do joelho coletadas após lavagem da cavidade com 50 μL de PBS contendo EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid) 4 mM. O número total de células foi determinado em Hemocitômetro de Neubauer, após diluição na proporção de 1:20 (v:v) com azul de metileno 0,1%. A contagem diferencial (mono/polimorfonucleares) foi realizada em exame direto em microscópio óptico, em maior aumento, após diluição de amostras com cristal violeta 0,5%.

2.4.2 Na articulação tíbio-ársica

Adicionalmente à contagem de células realizada na articulação fêmur-tibio-patelar, foi realizada a determinação do influxo celular por ensaio de mieloperoxidase utilizando-se a articulação tíbio-ársica, pois nesta articulação a quantidade de fluido sinovial é menor, o que dificulta a coleta. O ensaio de peroxidase pode ser usado como marcador para número de neutrófilos (Bradley et al., 1982). O ensaio foi realizado após 8h após a injeção intraarticular da miotoxina II (10 μg/articulação) ou PBS (controle), de acordo com o método descrito por Bradley et al. (1982), modificado.

No período determinado, as patas foram cortadas, as articulações tíbio-ársicas retiradas, pesadas e congeladas a – 80 ºC até o momento do uso (entre 1 e 3 dias após). No momento do uso, foi adicionado às articulações, ainda congeladas, 2 mL de CTAB 0,5% (Cetyl trimethylammonium bromide preparado em tampão fosfato potássico 50mM em pH 6,0) aquecido a 37 ºC. As articulações foram picotadas, posteriormente homogeneizadas em banho de gelo e mantidas congeladas a – 80 ºC por 12 horas.

Após este período, as amostras foram descongeladas em banho-maria a 37 ºC e em seguida, o frasco contendo as amostras foi colocado em um recipiente contendo gelo seco com álcool, para congelamento imediato das amostras. Este procedimento (descongelamento seguido de rápido congelamento em gelo seco e álcool) foi repetido 3 vezes. As amostras foram então centrifugadas a 4000 rpm, por 10 minutos, a 4 ºC e o sobrenadante armazenado. Vinte microlitros de cada amostra foi colocado em cada poço de uma placa de Elisa, e adicionado 130 μL de uma solução de OPD (O-Phenylene-diamine, 10 mg, dissolvido em 10 mL de tampão fosfato contendo 10 μL de água oxigenada). Após alteração da cor das amostras (que se tornaram amareladas), a reação foi interrompida com ácido sulfúrico (H_2SO_4) e a leitura realizada em leitor de ELISA (Labsystems Multiskan, USA) em comprimento de onda de 492nm.

2.5 Teste de viabilidade celular

Com a finalidade de avaliar a concentração de Miotoxina II capaz de causar inflamação, porém sem induzir morte celular, foi realizado o teste de viabilidade celular com a utilização da técnica de exclusão do Azul de Tripan (1%). As células polimorfonucleares (PMN) são predominantes no exsudato, obtido no modelo da artrite induzida na articulação do joelho e portanto, na realização deste teste, foram utilizados polimorfonucleares coletados da cavidade peritoneal de ratos. Para tanto, 10 mL de glicogênio foram administrados na cavidade peritoneal de ratos e após 4h os animais foram eutanasiados em câmara de CO_2 e exsanguinados para não haver contaminação da cavidade peritoneal. Os PMN foram então coletados com 10 mL de solução salina 0,9% e incubados ($1x10^6$ células/mL) apenas em meio de cultura RPMI 1640 (controle) ou meio de cultura contendo a Miotoxina II, em diferentes concentrações (5 µg, 10 µg e 15 µg/ml), em placas de 24 poços que foram mantidas em estufa a 37 ºC com CO_2, por um período de 1h. Após este período, alíquotas de 200 µL foram retiradas dos poços, à estas alíquotas foram adicionados 200 µL de corante azul de Tripan 1%. A leitura foi realizada em microscópio de luz, utilizando câmara de Neubauer. Foram consideradas viáveis as amostras com mais de 90% de células íntegras.

2.6 Determinação das alterações da permeabilidade vascular (PV) na articulação fêmur-tíbio-patelar

As alterações da permeabilidade vascular foram avaliadas pela determinação do extravasamento do corante azul de Evans (AE), segundo o protocolo descrito por Lam e Ferrell (Bomalaski et al., 1991), adaptado. Para tanto, azul de Evans, na dose de 75 mg/kg, foi injetado por via intravenosa em volume de 1 mL, 20 minutos antes da retirada da articulação.

Cinco, 15, 30, 60, 240 e 360 min após a administração i.a. da miotoxina MII, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e suas articulações foram excisadas, pesadas e submersas em solução de acetona e sulfato de sódio a 1%, na proporção de 7:3. Estas articulações ficaram 24 horas em agitação contínua e suave e então as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e a concentração de azul de Evans no sobrenadante determinada em leitor de ELISA (Labsystems MultisKan, USA) a 620 nm, a partir de uma curva padrão. Especificamente neste experimento, a miotoxina foi diluída em Ringer lock estéril e os animais do grupo controle foram tratados apenas com Ringer lock estéril por via i.a. Os resultados representam a média de 4 “pools” por tempo, sendo que cada “pool” é composto pelo material obtido de 3 articulações (3 animais). Os resultados estão expressos como µg AE/mL.

2.7 Determinação da nocicepção

A análise comportamental do efeito nociceptivo acarretado pela Miotoxina II ou seus controles (PBS – controle negativo, Carragenina ou Zimosan – controles positivos) foi realizada pelo método de determinação da hiperalgesia articular, utilizando-se o teste de *von Frey* eletrônico, como descrito por Guerrero et al. (2006).

Para a realização do teste, os animais foram colocados em gaiolas plásticas, com fundo de arame, para permitir acesso às patas. Os animais foram colocados nestas gaiolas 30 minutos antes do início dos testes, para adaptação comportamental.

Os testes foram realizados apenas quando os animais ficaram quietos, sem movimentos exploratórios ou defecação e sem lamberem as patas. Neste experimento, uma medida de pressão eletrônica é mensurada através de um transdutor de pressão adaptado por um cabo a um contador digital de força (em gramas). A precisão do aparelho é de 0,1 g e o aparelho é calibrado para registrar uma força máxima de 150 g, mantendo a precisão de 0,1 g até a força de 80 g (Insight Equipamentos Ltda., Ribeirão Preto, Brasil). O contato do transdutor de pressão à pata foi realizado por meio de uma ponteira descartável de polipropileno adaptada. Uma força perpendicular crescente foi aplicada na área central da superfície plantar do membro posterior dos animais, para indução da flexão dorsal da articulação tíbio-társica, seguida da retirada da pata. O aparelho de medida de pressão eletrônica registra automaticamente a intensidade da força aplicada quando o membro é retirado. O teste foi repetido até que se obtivessem três medidas subseqüentes, de tal forma que a variação entre as medidas não fosse maior que 1 g. Os animais foram submetidos à análise da sensibilidade dolorosa em diversos tempos após a administração intraarticular (articulação tíbio-társica) da MII, zimosan, BSA ou de PBS.

2.8 Análise histopatológica e morfométrica da articulação fêmur-tíbio-patelar e tíbio-tarsal

Os estudos histopatológicos foram realizados em ambas articulações, em diversos tempos após a administração i.a. da Miotoxina II (10 µg), PBS ou carragenina (200 µg). Para tanto, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical e o membro posterior direito foi retirado. Os membros foram mantidos por 24 horas em solução de Bouin. Após este período, foram realizados cortes seriados da articulação para o preparo da descalcificação, utilizando-se fluido de descalcificação de Kristensen, por sete dias. O material foi incluso em parafina e então foram realizados cortes de 6 µm de espessura. Estes foram corados com hematoxilina-eosina e avaliados em microscopia de luz, quanto à presença de sinais inflamatórios (presença de edema, congestão e infiltrado celular) na cápsula articular.

Após os procedimentos da análise histológica, o mesmo material foi utilizado na análise morfométrica, realizada por meio do sistema de análise de imagens constituído do software Image Pro-plus 4.0 (Media Cybernetics, USA) e câmera digital acoplada ao microscópio de luz (Zeiss, Alemanha) com integração ao microcomputador que automaticamente realiza a contagem de células. Foram analisados 10 campos microscópicos distintos por seção histológica, com o objetivo de diferenciar células polimorfonucleares e mononucleares presentes no espaço articular e nas regiões circunvizinhas da cápsula articular.

2.9 Tratamentos Farmacológicos

Para caracterização dos mediadores envolvidos na hiperalgesia articular acarretada pela miotoxina II, foram empregados os seguintes tratamentos farmacológicos:

- Indometacina - inibidor de cicloxigenases, administrada por via i.v. (4 mg/kg/200 μl, dissolvida em tampão TRIS 1M, pH 8,0 a 37 ^{o}C e PBS), 30 minutos antes da toxina (Yamamoto e Nazaki-Taguchi, 2002).
- Celecoxib – inibidor seletivo da ciclooxigenase 2, administrado por via oral (10 mg/kg/2000µL, dissolvido em 1% de CMC), 60 minutos antes da toxina (Yamamoto e Nazaki-Taguchi, 2002).
- Zileuton - inibidor da 5-lipoxigenase, administrado por via oral (100 mg/kg/2000μl, dissolvido em 1% de CMC), 60 minutos antes da toxina (Chacur et al., 2003).
- LNMMA - inibidor inespecífico da NOS, administrado por via i.a. (50 µg/25µL, dissolvido em PBS), 60 minutos antes da miotoxina (Picolo e Cury, 2004).
- HOE 140, antagonista de receptores B2 para bradicinina, dissolvido em PBS e administrado por via intraarticular (0,75 μmol/12,5 μl de PBS), 20 minutos antes da miotoxina. A dose de antagonista utilizada foi a dose capaz de

reverter a hiperalgesia acarretada pela bradicinina (administrada por via i.pl.), utilizada como controle positivo (Chacur et al., 2003).

- Lys-(Des-Arg9,Leu8)-bradicinina, antagonista de receptores B1 para bradicinina, dissolvido em PBS e administrado por via intraarticular (10 ou 40 nmol/12,5 μl de PBS), 20 minutos antes da miotoxina. A dose de antagonista utilizada (10 nmol) foi baseada em dados da Literatura (Cruwys et al., 1994, Picolo et al., 2010)
- Metisergida, antagonista de receptores serotoninérgicos, dissolvida em PBS e administrada por via intraperitoneal na dose de 5mg/kg, 30 minutos antes da miotoxina. A dose de antagonista utilizada foi baseada em dados da Literatura (Chacur et al., 2003) e em experimentos prévios em nosso laboratório.
- Prometazina, antagonista de receptores H1 para histamina, dissolvida em PBS e administrada por via intraperitoneal na dose de 5mg/kg, 30 minutos antes da miotoxina. A dose de antagonista utilizada foi baseada em dados da Literatura (Chacur et al., 2003) e em experimentos prévios em nosso laboratório.
- BQ-123, antagonista seletivo de receptores ET-A para endotelina, dissolvido em água destilada e administrado por via intraarticular (10 ou 20 nmol/12,5μl de PBS) 15 minutos antes da miotoxina. A dose de antagonista utilizada foi baseada em dados da Literatura (Daher et al., 2004).
- BQ-788, antagonista seletivo de receptores ET-B para endotelina, dissolvido em água destilada e administrado por via intraarticular (10 e 20 nmol/12,5 μl) 15 minutos antes da miotoxina. A dose de antagonista utilizada foi baseada em dados da Literatura (Daher et al., 2004).
- Anticorpo anti-IL-1β, dissolvido em PBS e administrados por via intraarticular na dose de 1,5 μg/articulação, 30 minutos antes da miotoxina. A dose de antagonista utilizada foi a dose capaz de reverter a hiperalgesia induzida por carragenina (administrada por via i.a.), utilizada como controle positivo.
- Anticorpo IL-6, dissolvido em PBS e administrado por via intraarticular na dose de 4,0 μg/articulação, 30 minutos antes da miotoxina. A dose de

antagonista utilizada foi a dose capaz de reverter a hiperalgesia induzida por carragenina (administrada por via i.a.), utilizada como controle positivo.

- Anticorpo anti-TNFα, dissolvido em PBS e administrado por via intraarticular na dose de 0,5 μg/articulação, 30 minutos antes da miotoxina. A dose de antagonista utilizada foi a dose capaz de reverter a hiperalgesia induzida por carragenina (administrada por via i.a.), utilizada como controle positivo.
- Anticorpo anti-CINC-1, dissolvido em PBS e administrado por via intraarticular na dose de 5,0 μg/articulação, 30 minutos antes da miotoxina. A dose de antagonista utilizada foi a dose capaz de reverter a hiperalgesia induzida por carragenina (administrada por via i.a.), utilizada como controle positivo.
- GM6001 (Ilomastat), inibidor de amplo espectro de metaloproteinases (inibidor das MMPs-1, -2, -3, -8 e -9), dissolvido em DMSO e administrado por via intraarticular (27 ou 71nM, em volume de 12,5 μl de PBS), 30 minutos antes da miotoxina. A dose do inibidor (27nM) está baseada nas instruções do fabricante, e foi capaz de reverter a hiperalgesia induzida por zimosan (administrado por via i.a.), utilizado como controle positivo. O zimosan quando injetado por via intraarticular no joelho de ratos, é capaz de induzir aumento na expressõo de RNAm para as metaloproteinases-2, -3 e -9 no tecido sinovial (van de Loo et al., 2003).
- AACOCF3 (Arachidonyl trifluoromethil ketone), inibidor da fosfolipase citosólica, diluído em DMSO e administrado na dose de 200 µg/articulação, 30 minutos antes da miotoxina. A dose de inibidor utilizada foi baseada em dados de Literatura (Lucas et al., 2005).
- $PACOCF_3$ (palmitoyl trifluoromethyl ketone), inibidor da fosfolipase independente de cálcio, diluído em DMSO(dimetisulfóxido)/salina e administrado na dose de 1 μg/articulação, 30 min antes da miotoxina. A dose de inibidor utilizada foi baseada em dados de Literatura (Schaeffer e Gattaz, 2007).
- Fucoidina, ligante da L-selectina, administrado na dose de 5 mg/kg, por via endovenosa, 15 minutos antes da miotoxina (Zambelli et al., 2008).

Em todos os tratamentos, os grupos controles foram constituídos por animais tratados com a miotoxina e com o diluente específico da cada droga ou com PBS e o inibidor enzimático, nas mesmas condições experimentais.

2.10 Ensaio bioquímico para determinação das concentrações de prostaglandina

A concentração de prostaglandina E_2 (PGE_2) no fluido sinovial de animais injetados com a miotoxina ou PBS (controle) foi avaliada nos tempos de 0,5, 2 e 6h após a injeção dos compostos na articulação fêmur-tíbio-patelar. Nos tempos de 2 e 6h, um grupo controle adicional foi realizado, onde os animais receberam celecoxib, por via oral, antes da administração da miotoxina. Nos tempos determinados, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical e a cavidade articular do joelho lavada com 200 μl de PBS. As amostras foram centrifugadas em 10.000 rpm, por 10 minutos, à 4 ºC, e o sobrenadante congelado a –20 ºC. As concentrações de PGE_2 foram determinadas, no sobrenadante, por ensaio imunoenzimático (EIA). Para tanto, o eicosanóide de cada amostra foi extraído em colunas Sep Pak C-18, ativadas com 10 mL de etanol absoluto, seguido de 20 mL de água deionizada. As amostras foram acidificadas (pH 3,5) com HCl 0,1 N e adicionadas às colunas. Posteriormente, as colunas foram lavadas com água, etanol-água (35%) e com etanol absoluto para eluição da PGE_2 (Pradelles et al., 1985). Os eluatos foram concentrados em atmosfera de nitrogênio a 37 ºC e então ressuspensos em tampão de ELISA e analisados por EIA, utilizando kit comercial (Cayman Chemical, USA). Alíquotas contendo 50 μL de cada amostra foram adicionadas a placas de 96 poços e incubadas com igual volume do eicosanóide (PGE_2) conjugado à acetilcolinesterase e antisoro específico de coelho. Após a adição do substrato, a absorbância das amostras foi determinada em leitor de ELISA (Titertek-Multiskan, USA) em 405 nm. As concentrações de PGE_2 foram estimadas a partir de curva padrão específica e representadas em pg/mL.

3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada por meio de análise de variância (Snedecor et al., 1946) associada ao teste de Tukey (Sokal e Rohlf, 1981), para comparação de mais de duas médias. O índice de significância foi de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Determinação do número de células no exsudato obtido da articulação fêmur tíbio patelar de ratos

A miotoxina, na dose de 10 µg/articulação, acarretou aumento significativo no número de células presentes na cavidade articular dos animais 8 horas após o tratamento, quando comparado aos animais tratados com PBS, sendo que este aumento não foi mais observado na 12ª hora após as injeções (Figura 1). Não foram detectadas alterações significativas com as demais doses de miotoxina (5 e 15 µg/ articulação). Carragenina (200 µg/ articulação), utilizada como controle positivo, também causou aumento significativo no número de leucócitos na 8ª hora após sua administração. Por outro lado, animais tratados com BSA (albumina bovina sérica) não apresentaram alteração significativa no número de células presentes no fluído coletado da articulação dos animais (Figura 1).

Ainda, a análise diferencial indicou que o aumento do número de células totais foi decorrente da mobilização de polimorfonucleares, nos diferentes tempos avaliados, quando comparado aos grupos controles tratados com PBS (Figura 2).

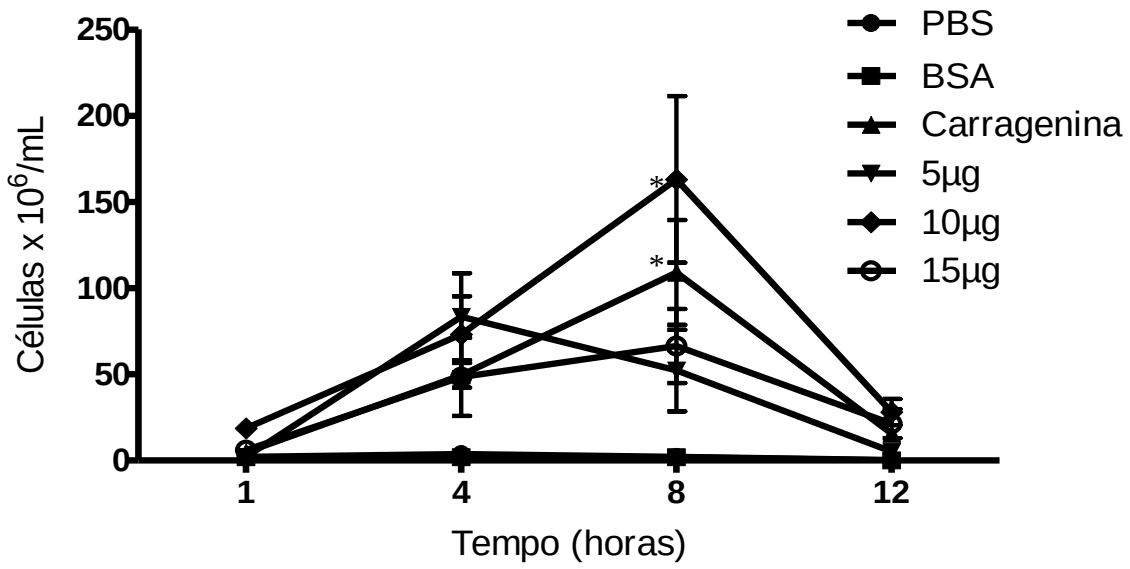


Figura 1. Número total de leucócitos presentes no exsudato coletado da articulação fêmur tíbio patelar de ratos. O exsudato foi coletado 1, 4, 8 e 12 h após a injeção intraarticular das diferentes concentrações de Miotoxina II (5, 10 e 15 µg/50µL de PBS estéril), carragenina (200 µg/50µL de PBS estéril - controle positivo), PBS ou BSA. Após os diferentes tempos, os animais foram sacrificados e as articulações foram lavadas com PBS para a realização da contagem total. Os valores expressam a média ± e.p.m. de pelo menos 5 animais por grupo. *P<0,05 em relação aos valores obtidos nos animais do grupo PBS, no mesmo período.

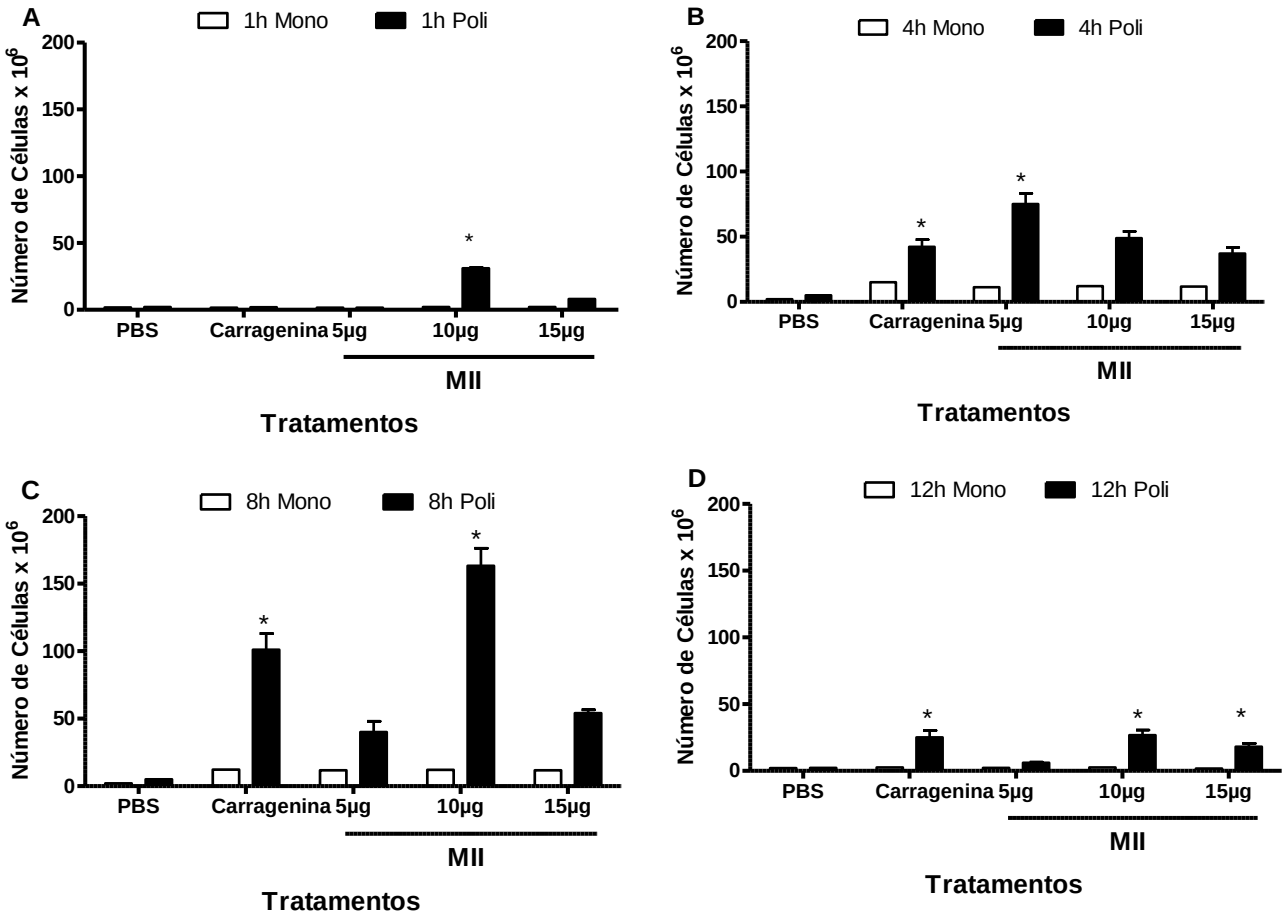


Figura 2. Número de leucócitos mononucleares e polimorfonucleares presentes no exsudato coletado da articulação fêmur tíbio patelar de ratos. A contagem diferencial foi realizada 1h (Painel A), 4 h (Painel B), 8 h (Painel C) e 12 h (Painel D), após a injeção intraarticular das diferentes concentrações de Miotoxina – MII (5, 10 e 15 µg/50µL de PBS estéril), o mesmo volume de PBS estéril (grupo controle) ou carragenina (200µg/50µL de PBS estéril) (controle positivo). Após os diferentes tempos, os animais foram sacrificados e as articulações lavadas com PBS para a realização da contagem diferencial. Os valores expressam a média ± e.p.m. de pelo menos 5 animais por grupo. *P<0,05 em relação aos valores do polimorfonucleares obtidos nos animais do grupo controle (PBS), dos mesmos períodos.

4.2 Teste de viabilidade celular

A determinação da viabilidade celular foi realizada utilizando-se PMN obtidos da cavidade peritoneal dos ratos, uma vez que estas são as células predominantes no exsudato coletado da cavidade articular dos animais injetados com a Miotoxina II. Os resultados apresentados na Tabela 1 abaixo, mostram que a dose de 15 µg da Miotoxina II acarretou alterações da viabilidade celular, uma vez que apenas 50% das células apresentavam-se viáveis. Por outro lado, foi observada 100% de viabilidade para as células obtidas de animais tratados com PBS ou 5 e 10 µg da toxina. Com base nestes resultados, juntamente com os resultados anteriores que demonstraram o aumento significativo na migração de células para a cavidade articular após a administração de 10 µg da miotoxina (Figura 1), os estudos subseqüentes foram realizados utilizando-se a dose de 10µg da Miotoxina II por articulação.

Tabela 1: Efeito da Miotoxina II sobre a viabilidade de PMN obtidos da cavidade peritoneal de ratos

TRATAMENTOS	% DE PMN VIÁVEIS
PBS	100%
MIOTOXINA 15µg	50%
MITOXINA 10µg	100%
MIOTOXINA 5µg	100%

Os PMN foram coletados da cavidade peritoneal de ratos 4h após a injeção i.p. de 10 mL de glicogênio. As células foram incubadas com a Miotoxina II ou PBS, por 1h, a 37 °C, em câmera de CO_2. Os resultados expressam a porcentagem de células viáveis, determinadas por microscopia de luz, utilizando câmara de Neubauer.

4.3 Determinação das alterações da permeabilidade vascular (PV)

Os resultados referentes ao extravasamento de Azul de Evans para a cavidade da articulação fêmur-tíbio-patelar dos ratos demonstram que os animais tratados com Miotoxina, na dose capaz de acarretar aumento do número de células na cavidade articular (10 µg) induziu aumento da permeabilidade vascular, significativo entre 5 e 15 minutos após a injeção da miotoxina, quando comparado ao grupo de animais que receberam Ringer Lock pela mesma via (Figura 3).

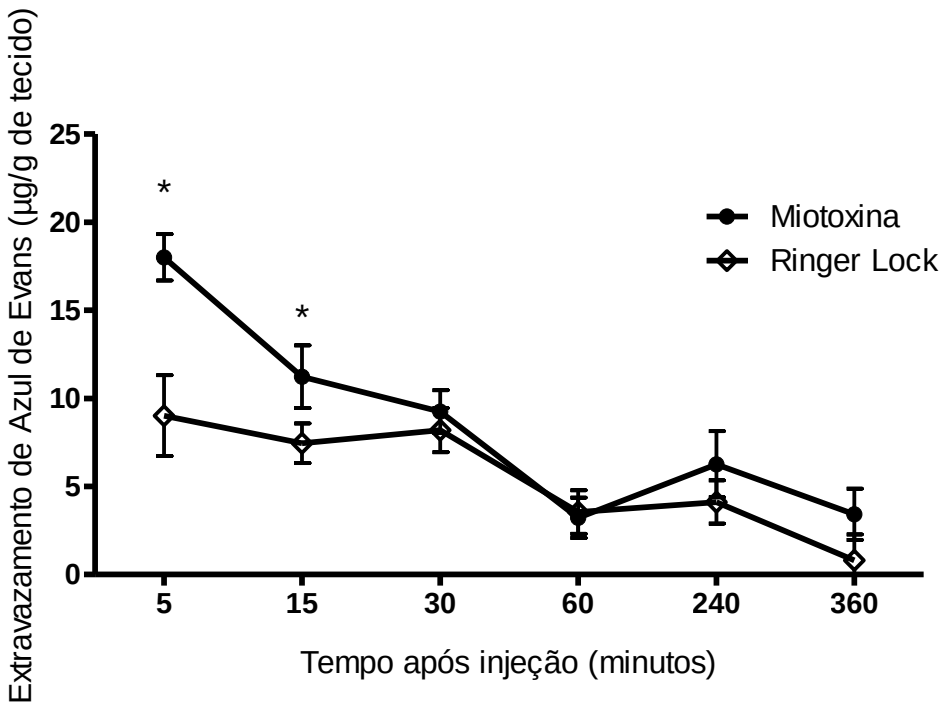


Figura 3. Extravasamento de Azul de Evans para a articulação fêmur-tíbio- patelar de ratos. O extravasamento foi quantificado diversos tempos após a injeção intraarticular de Miotoxina II (10 µg/50µL de Ringer Lock estéril) ou o mesmo volume de Ringer Lock estéril (grupo controle). Os animais foram injetados com o Azul de Evans (75mg/Kg), via intravenosa 20 min antes da coleta. Os resultados representam a média de 4 “pools” por tempo, sendo que cada “pool” é composto pelo material obtido de 3 articulações (3 animais). * $p < 0,05$ por comparação com o grupo Ringer Lock.

4.4 Determinação da nocicepção induzida pela Miotoxina II

Para a determinação do efeito nociceptivo acarretado pela Miotoxina II, foi utilizado o método proposto por Guerrero et al. (2006), utilizando-se o aparelho von Frey eletrônico. Os resultados demonstram que a miotoxina, na dose de 10 µg/articulação, foi capaz de induzir hiperalgesia significativa entre 4 e 8 h após a administração, quando comparada com os animais que receberam PBS (Figura 4). Como controle positivo foi utilizado o Zimosan (30 µg/25µL) (Guerrero et al., 2006), que acarretou hiperalgesia articular avaliada na 8ª hora, quando comparado aos animais tratados com PBS. Um grupo controle adicional foi constituído por animais injetados por via i.a. com BSA (20 µg/25µL de PBS). A injeção de BSA *per se*, não induziu alterações significativas no limiar de dor dos animais quando comparado ao grupo PBS, durante todo o período de experimentação (Figura 4).

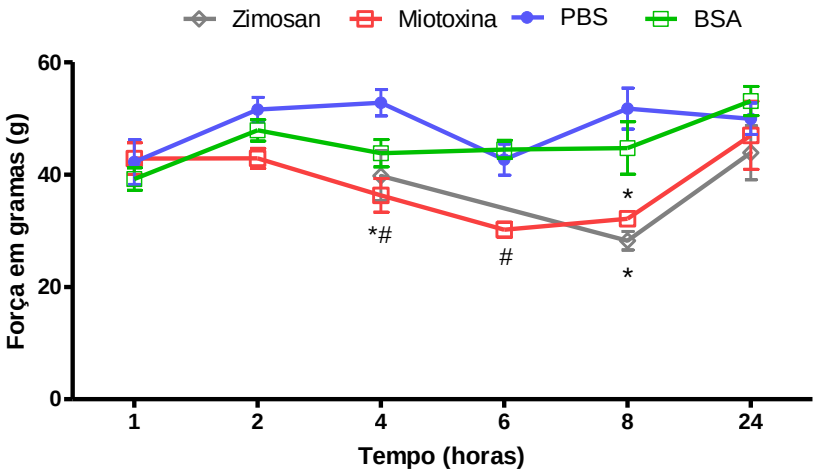


Figura 4. Determinação da hiperalgesia articular induzida pela administração de Miotoxina II em ratos. A hiperalgesia articular foi avaliada utilizando o *von Frey* eletrônico (conforme descrito no item 2.7.), em diversos tempos após os tratamentos com Miotoxina II (10 µg/25µL de PBS), PBS (25µL), Zimosan (30 µg/25µL de PBS- controle positivo) e BSA (20 µg/25µL de PBS- controle negativo). Os dados representam a média ± e.p.m. do limiar da retirada ou "flick" da pata de 8 animais por grupo. * $p < 0,01$ por comparação com o grupo PBS e # $p < 0,05$ por comparação com o grupo BSA.

4.5 Análise histopatológica e dados morfométricos da articulação fêmur tíbio patelar e tíbio-tarsal de ratos

Uma vez demonstrado que a miotoxina II é capaz de induzir alteração no recrutamento de células para a cavidade intraarticular, bem como alterações nos parâmetros de sensibilidade dolorosa dos animais, foram realizadas análises histopatológicas da articulação fêmur-tíbio-patelar e tíbio-tarsal após a injeção da Miotoxina II (10 µg/ articulação), Carragenina (200µg/ articulação- controle positivo) ou PBS

O processo inflamatório foi caracterizado pela presença de 3 elementos básicos na cápsula articular: edema, congestão e infiltrado celular inflamatório.

Na articulação fêmur-tibio-patelar notou-se que após 2h da administração i.a. de Miotoxina II, discreto edema, além de sutil congestão e pequeno infiltrado celular inflamatório, com presença de células polimorfonucleares (PMN) (Figura 5A), indicando início de resposta inflamatória. Ainda na articulação fêmur-tibio-patelar a inflamação articular aguda mostrou-se caracterizada 4h após a administração da miotoxina, onde observa-se presença de edema, congestão e infiltrado celular inflamatório na região intracapsular (Figura 5B e C). Foi observado ainda, quadro de desorganização celular (Figura 5B).

O grupo tratado com PBS e avaliado no período de 4h apresentou processo de edema e congestão em menor magnitude quando comparado com o grupo tratado com a Miotoxina II (Figura 5D).

A análise histopatológica da articulação fêmur-tibio-patelar dos animais, na 6 e 8h após a administração i.a. de Miotoxina II, está representada na Figura 6. Foi observado intensa celularidade e discreto edema após 6 horas (Figura 6A) e presença de edema abundante e aumento da população celular na cápsula articular na 8ª hora (Figura 6B e C). Na 24ª hora, a cápsula articular apresentou ainda edema proeminente, porém observava-se o aparecimento de fibroplasia, sugestivo de início do processo de reparo do tecido lesado (Figura 6D).

O grupo tratado com carragenina na articulação fêmur-tibio-patelar, foi avaliado 3h após a injeção do agente inflamatório. Os resultados representados na Figura 7A

demonstram a presença de edema discreto e aumento de células inflamatórias quando comparadado com os animais que receberam PBS nesta mesma articulação (Figura 7B).

Na articulação tíbio-tarsal, a análise após 15 minutos da adminstração i.a. de Miotoxina II revelou que apesar de discreta celularidade é possível notar a presença de sutil reação inflamatória na cápsula (Figura 8A e B). Após 4 (Figura 8C) e 6 horas da administração houve aumento da celularidade, assim como edema na cápsula articular (Figura 8D). Após 8 horas da administração de Miotoxina II, observou-se intensa celularidade, edema e perda da continuidade da cápsula articular (Figura 9A e 9C) quando comparado com a adminstração de PBS nesta articulação (Figura 9B e 9D) evidenciando a presença de algumas células inflamatórias mais dispersas porém com superfície óssea lisa e cápsula bem aderida.

Além das análises histopatológicas, foram realizadas análises morfométricas de ambas articulações com a finalidade de confirmar a celularidade presente nestes quadros inflamatórios e para tanto, estes leucócitos foram divididos em polimorfonucleares (PMN) ou mononucleares (MN). A análise indicou o predomínio de PMN nos tecidos articulares obtidos de animais tratados com MII, confirmando os dados obtidos na contagem de células presentes no exsudato coletado de animais que receberam o mesmo tratamento (Figura 10).

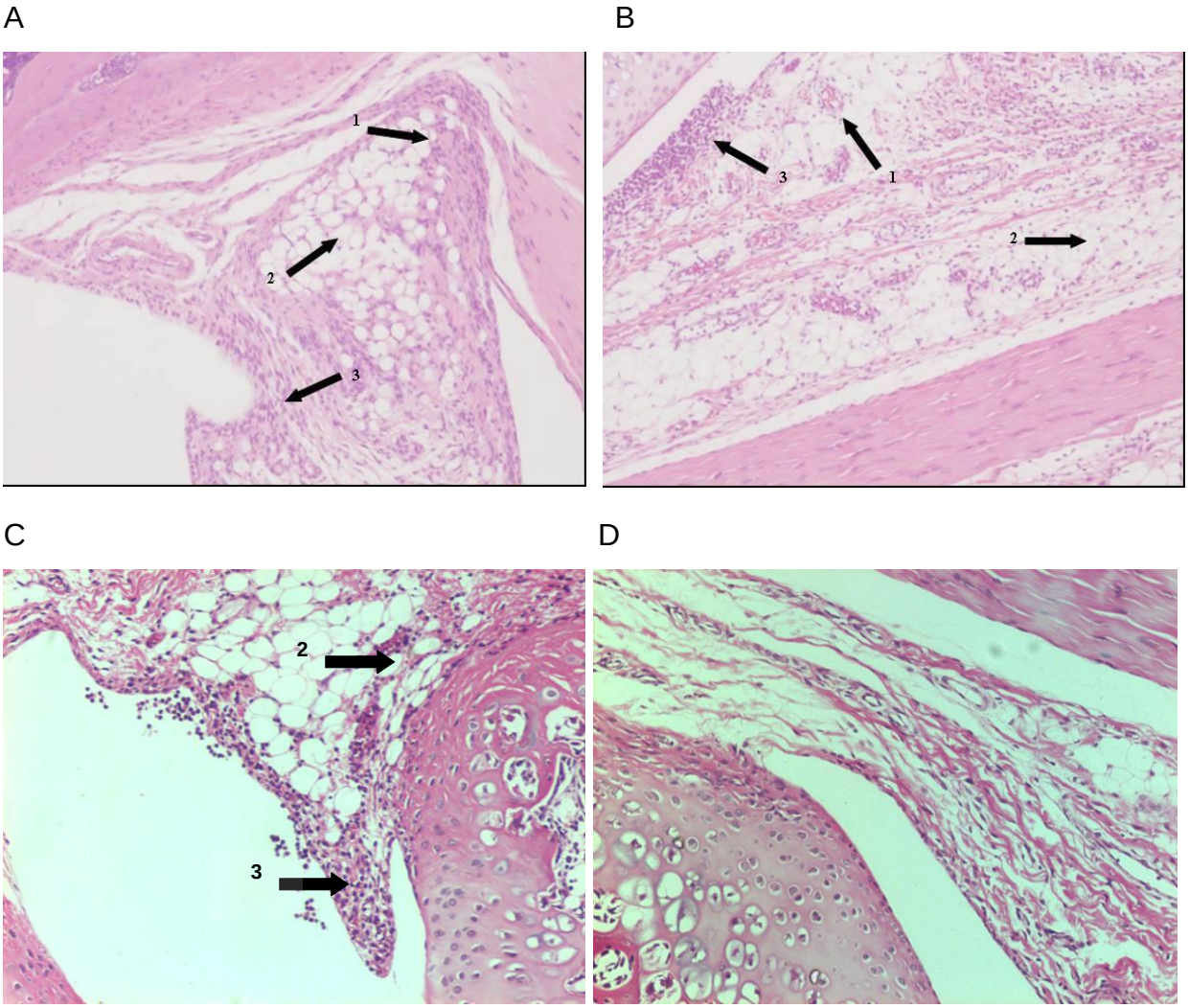


Figura 5. Análise histopatológica da articulação fêmur- tíbio- patelar de ratos, 2 (A) e 4 (B e C) horas após a injeção da Miotoxina II e 4 horas após a injeção de PBS (D). Corte histológico da articulação fêmur-tíbio patelar de ratos tratados com Miotoxina II (10 μg/50 μL de PSB) ou PBS (50 μL de PSB) por via i.a., demonstrando (1) congestão, (2) edema e (3) infiltrado celular. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina-eosina e analisados por microscopia de luz (objetiva 10x).

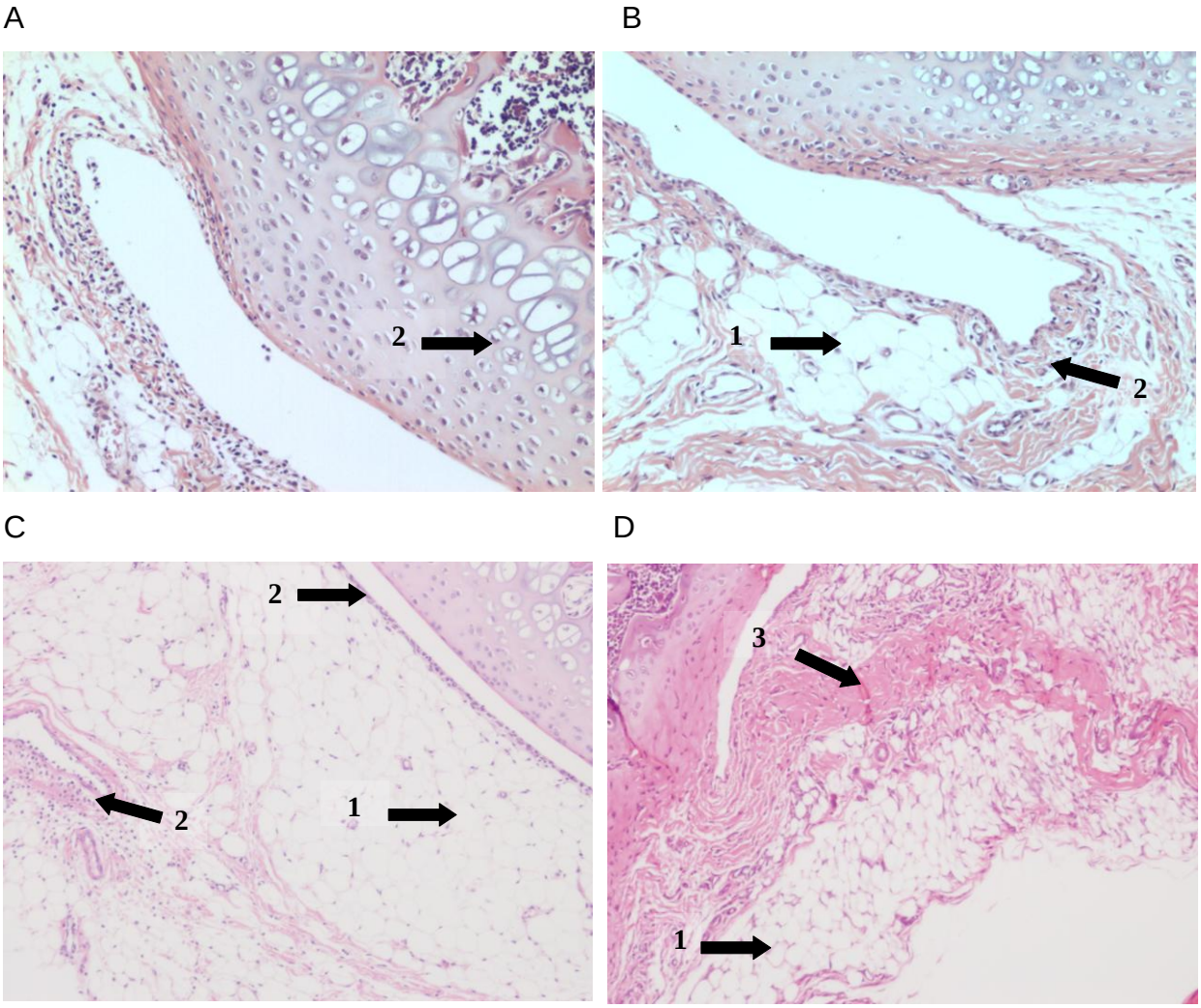
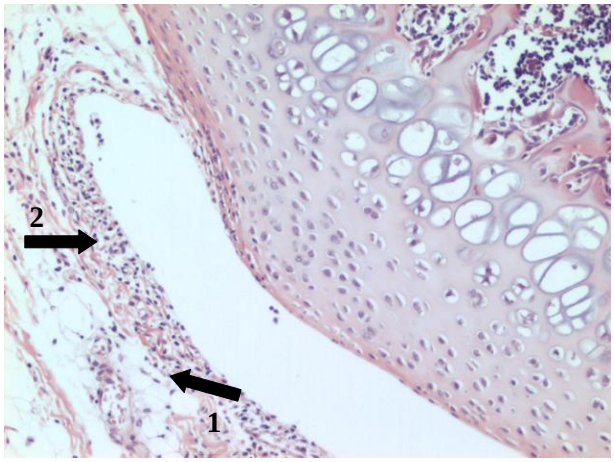


Figura 6. Análise histopatológica da articulação fêmur- tíbio- patelar de ratos, 6 (A), 8 (B e C) e 24 (D) horas após a injeção da Miotoxina II . Corte histológico da articulação fêmur-tíbio patelar de ratos tratados com Miotoxina II (10 μg/50 μL de PBS) por via i.a., demonstrando (1) edema, (2) infiltrado celular e (3) fibroplasia. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina-eosina e analisados por microscopia de luz (objetiva 10x).

A



B

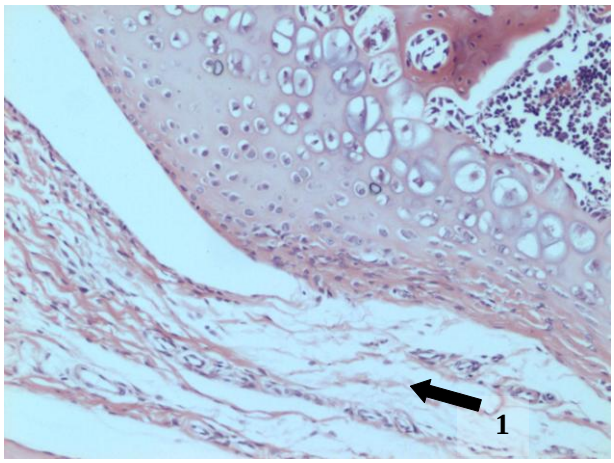


Figura 7. Análise histopatológica da articulação fêmur- tíbio- patelar de ratos, 3 horas após a injeção da carragenina (A) ou PBS (B). Corte histológico da articulação fêmur-tíbio patelar de ratos tratados com Carragenina (200 μg/50 μL de PSB) por via i.a., demonstrando (1) edema, (2) infiltrado celular. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina-eosina e analisados por microscopia de luz (objetiva 10x).

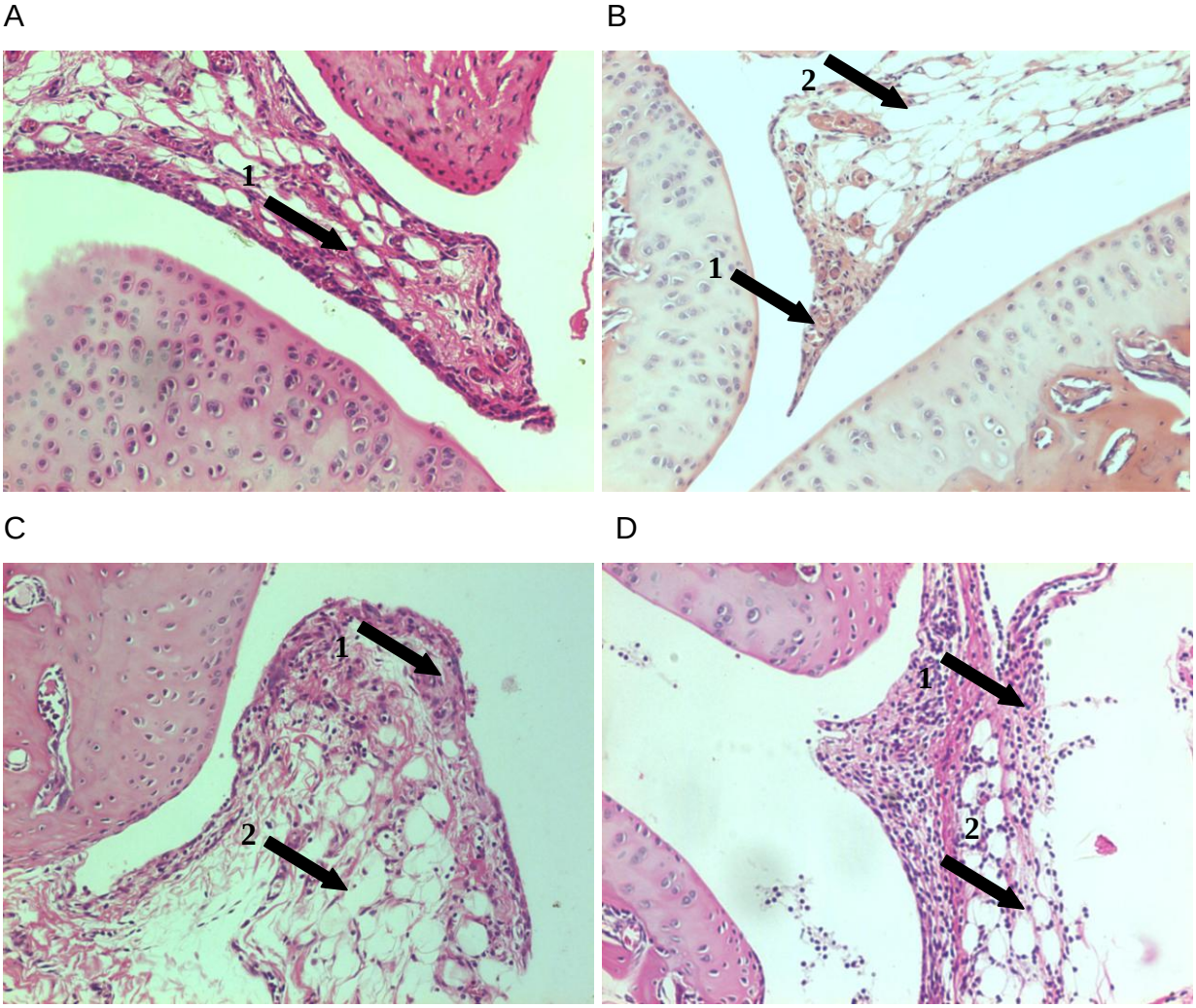


Figura 8. Análise histopatológica da articulação tíbio-tarsal de ratos, 15 minutos (A e B), 4 (C) e 6 horas (D) após a injeção da Miotoxina II . Corte histológico da articulação tíbio-tarsal de ratos tratados com Miotoxina II (10 μg/25 μL de PSB) por via i.a., demonstrando discreto (1) infiltrado celular na cápsula articular e (2) edema. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina-eosina e analisados por microscopia de luz (objetiva 10x).

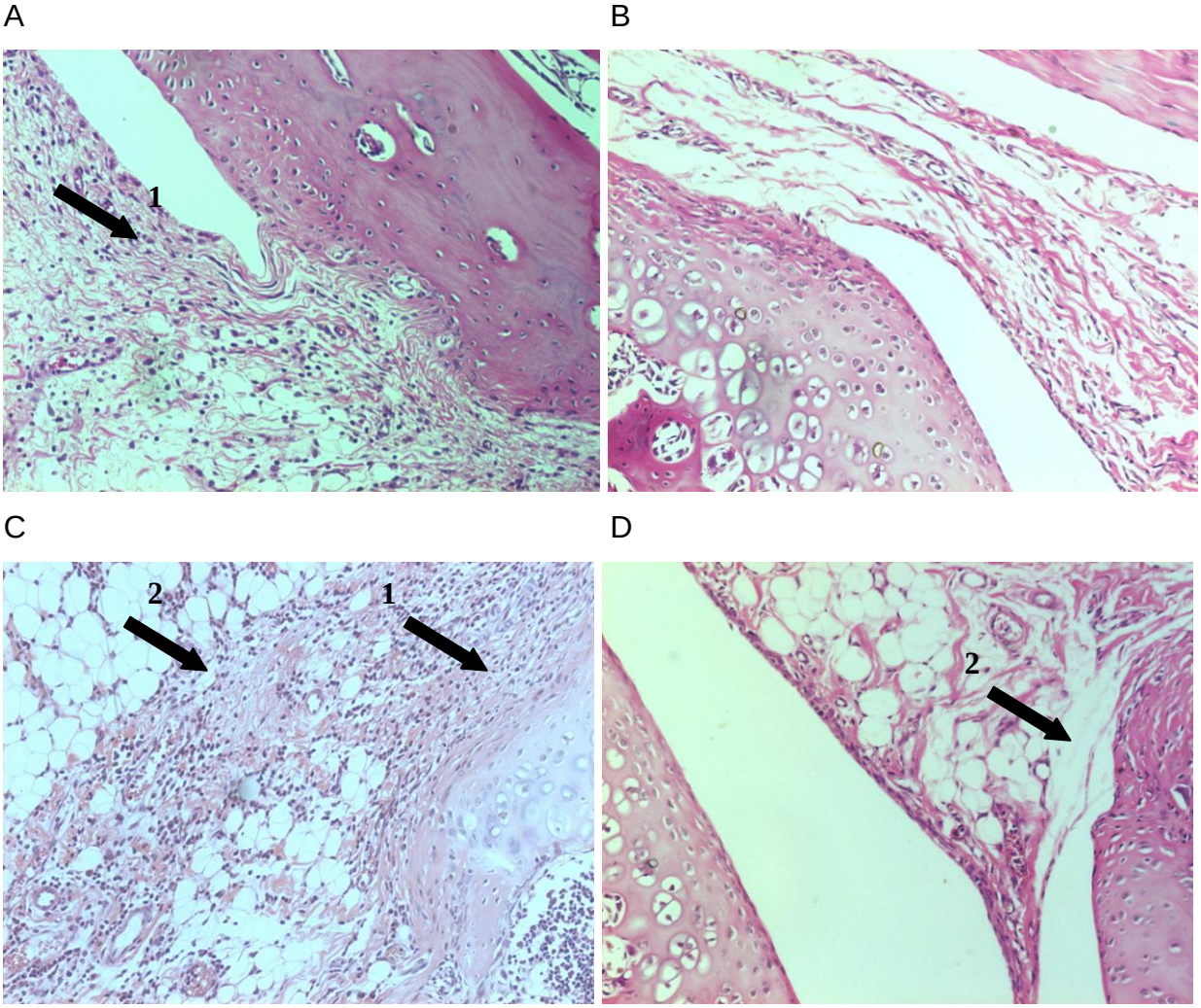
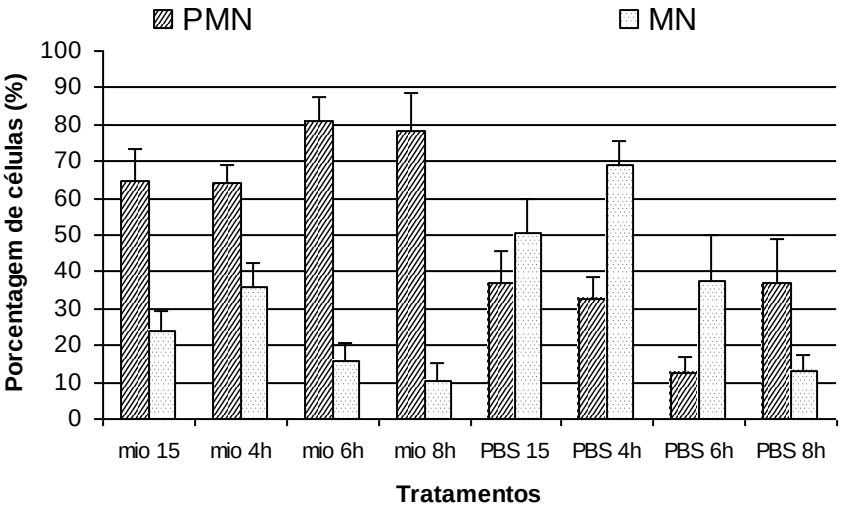


Figura 9. Análise histopatológica da articulação tíbio-tarsal de ratos, 8 horas após a injeção da Miotoxina II (A e C) e após injeção de PBS (B e D) . Corte histológico da articulação tíbio-tarsal de ratos tratados com Miotoxina II (10 μg/25 μL de PSB) por via i.a., demonstrando (1) infiltrado celular na cápsula articular e (2) edema. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina-eosina e analisados por microscopia de luz (objetiva 10x).



B

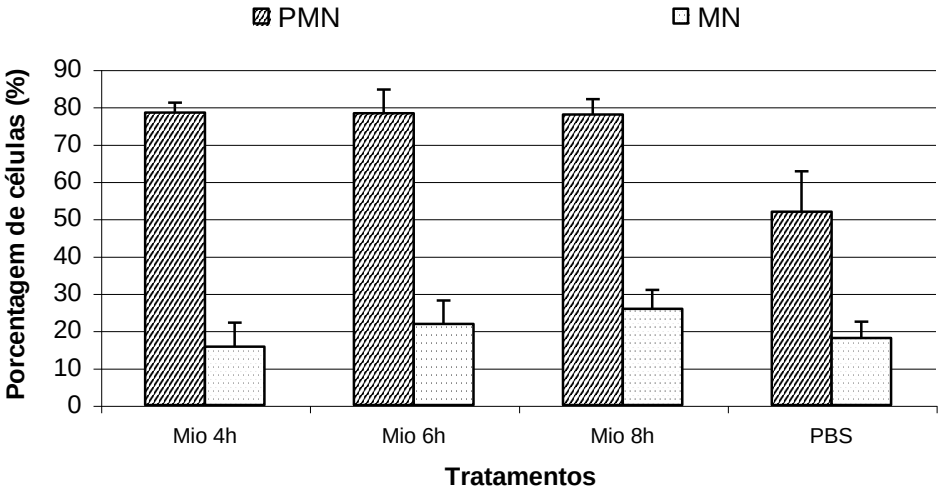


Figura 10. Leucócitos mononucleares e polimorfonucleares presentes na cavidade articular tibio-tarsal (A) e fêmur-tibio-patelar (B) de ratos. A análise dos dados morfométricos foi realizada por meio do sistema de análise de imagens constituído do software Image Pro-plus 4.0 (Media Cybernetics) e câmera digital acoplada ao microscópio de luz (Zeiss, Alemanha), com integração ao microcomputador, utilizando-se 10 campos microscópicos distintos por seção histológica de animais receberam a injeção intraarticular de Miotoxina II (10 µg) em distintos tempos ou o mesmo volume de PBS estéril (grupo controle) na 8ª hora. Os dados estão apresentados em porcentagem (%).

4.6 Tratamentos farmacológicos

4.6.1 Participação de eicosanóides na hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II

O pré-tratamento com indometacina, por via i.v. ou com celecoxib p.o., reverteu a hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II (Figura 11A e 11B). Por outro lado, o tratamento com zileuton, p.o., não interferiu com a resposta hiperalgésica acarretada pela MII (Figura 12). A indometacina, o celecoxib e o zileuton per se não interferiram com os valores em gramas necessários para a indução de retirada da pata, quando comparado aos animais tratados com PBS (Figuras 11 e 12).

4.6.2 Determinação da concentração de prostaglandina (PGE_2) no fluido sinovial de animais injetados com a miotoxina II

Os resultados obtidos no EIA mostraram aumento significativo na concentração de PGE_2 6h após a administração da fosfolipase (Figura 13). Este aumento não foi observado nos animais pré-tratados com celecoxib (Figura 13).

4.6.3 Participação da bradicinina na hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II

O pré-tratamento com HOE-140, antagonista de receptor B2 para bradicinina, por via i.a., reverteu totalmente a hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II (Figura 14A), o antagonista *per se* não interferiu com os valores em gramas necessários para a retirada da pata. Por outro lado, o tratamento com lys-(des-arg9,leu8)-bradicinina, antagonista de receptores B1 não foi capaz de alterar a hiperalgesia induzida pela miotoxina (Figura 14B). Ambos os antagonistas não interferiram, *per se*, com os valores em gramas necessários para a indução da retirada da pata, quando comparado aos animais tratados com PBS (Figuras 14A e 14B).

É importante ressaltar que as concentrações dos antagonistas utilizadas (0,75 μmol para HOE e 10 nmol para lys-(des-arg9,leu8)-bradicinina) foram capazes de

reverter a hiperalgesia mecânica acarretada pela bradicinina, utilizada como controle positivo (Picolo et al., 2010).

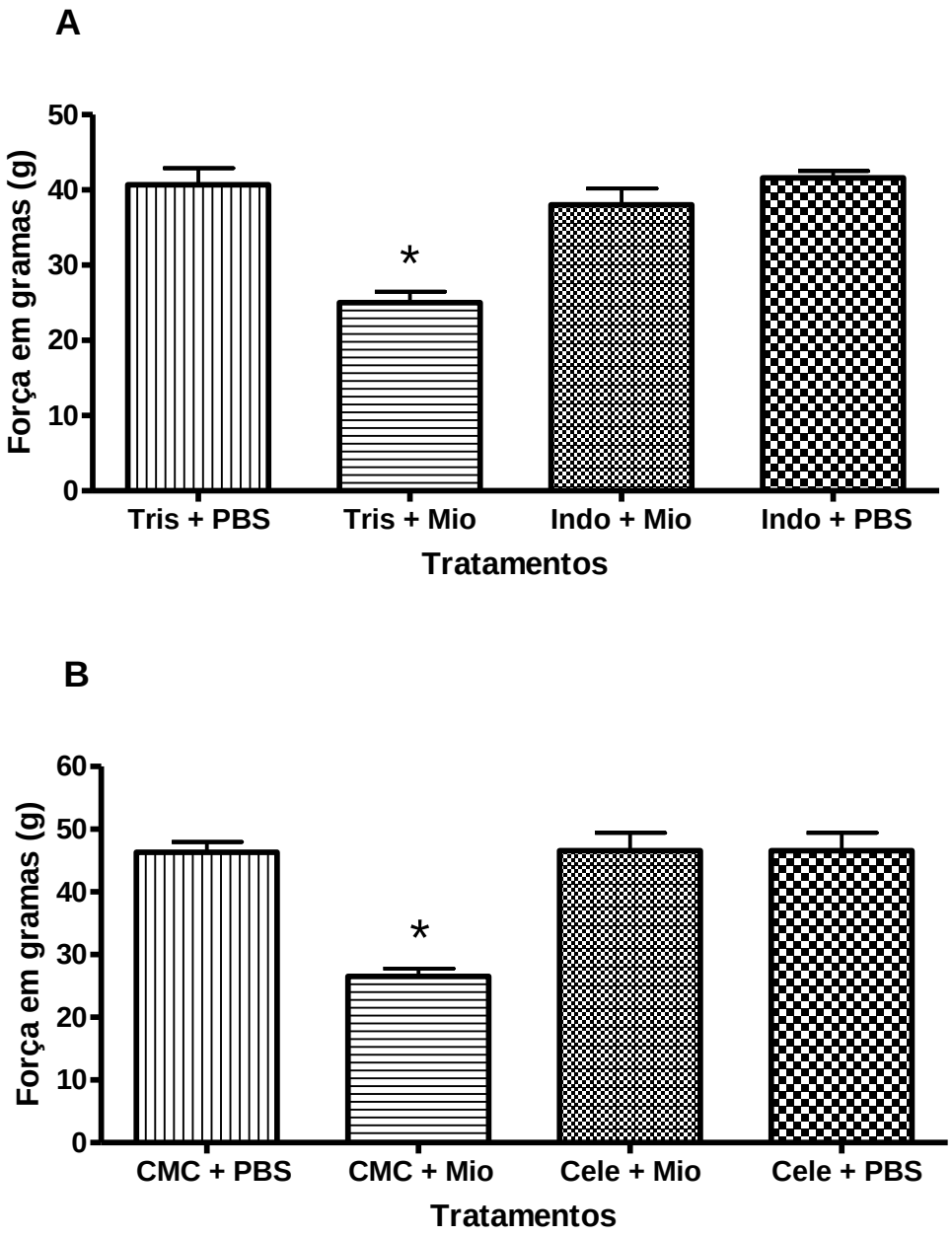


Figura 11. Efeito do tratamento com Indometacina (A) ou Celecoxib (B) sobre a hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II. A Miotoxina II (10 µg/25µL) ou PBS (25µL) foram injetados na articulação tíbio társica. A hiperalgesia articular foi avaliada utilizando o *von Frey* eletrônico (conforme descrito no item 2.7), 8h após. Indometacina (Indo - 4 mg/kg/200µL) ou TRIS (200 µL) foram administrados por via i.v. 30 minutos antes da miotoxina, enquanto que o Celecoxib (Cele - 10 mg/kg/2000µL) ou CMC (carboxi-metilcelulose - 1%) foram administrado por via oral 60 minutos antes. Grupos controles foram constituídos por animais tratados com TRIS+PBS ou Indo+PBS e CMC+PBS ou Cele+PBS. Os dados representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com o grupo TRIS+PBS (A) ou CMC + PBS (B).

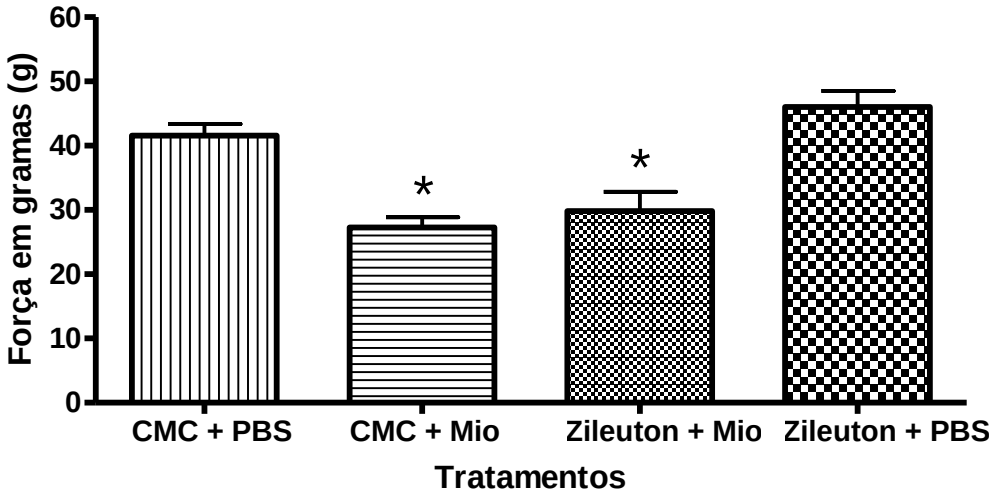


Figura 12. Efeito do tratamento com Zileuton sobre a hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II. A Miotoxina II (10 µg/25µL de PBS) ou PBS (25 µL) foram injetados na articulação tíbio társica. A hiperalgesia articular foi avaliada utilizando o von Frey eletrônico (conforme descrito no item 2.7), 8 h após. Zileuton (Zil - 100 mg/kg/200µL) ou CMC (carboxi-metilcelulose - 1%/ 200 µL) foram administrado por via oral 60 min. antes da miotoxina. Grupos controles foram constituídos por animais tratados com CMC+PBS ou Zil+PBS. Os dados representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com o grupo CMC+PBS.

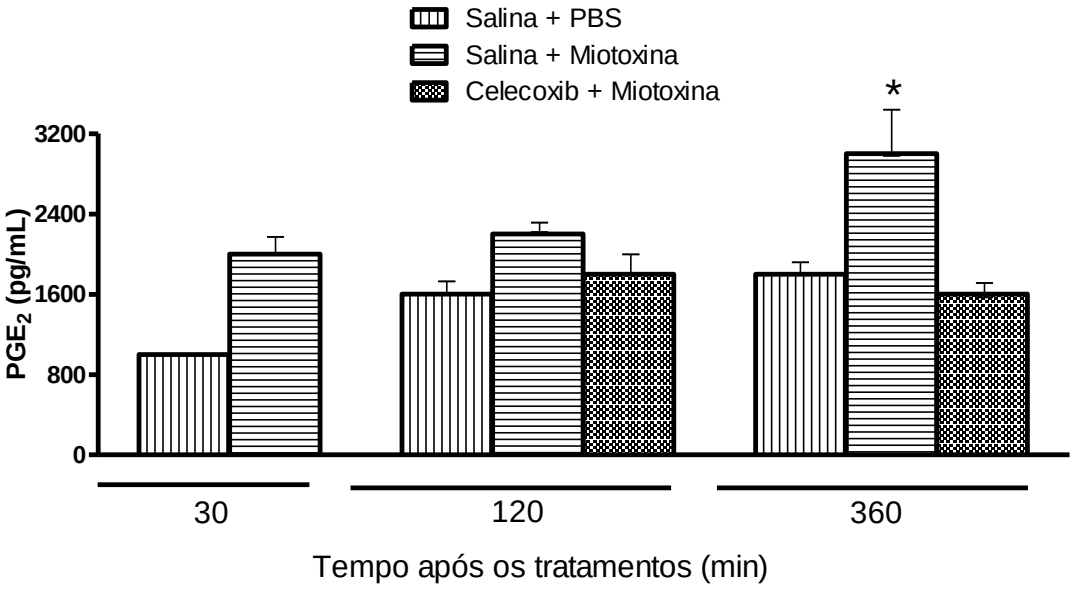


Figura 13. Efeito do tratamento com celecoxib sobre a concentração de prostaglandina E_2 no fluido articular após 30, 120 e 360 minutos da injeção de miotoxina II. A Miotoxina II (10 µg/50µL de PBS) ou PBS (50µL) foram injetados na articulação fêmur-tíbio-patelar. A detecção da concentração de prostaglandina foi realizada conforme descrito no item 2.10 após a administração de celecoxib (10 mg/kg por v.o.) ou solução salina 1 hora antes da miotoxina II. Grupos controles foram constituídos por animais tratados com Salina + PBS. Os dados representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com o grupo Cele + MIO.

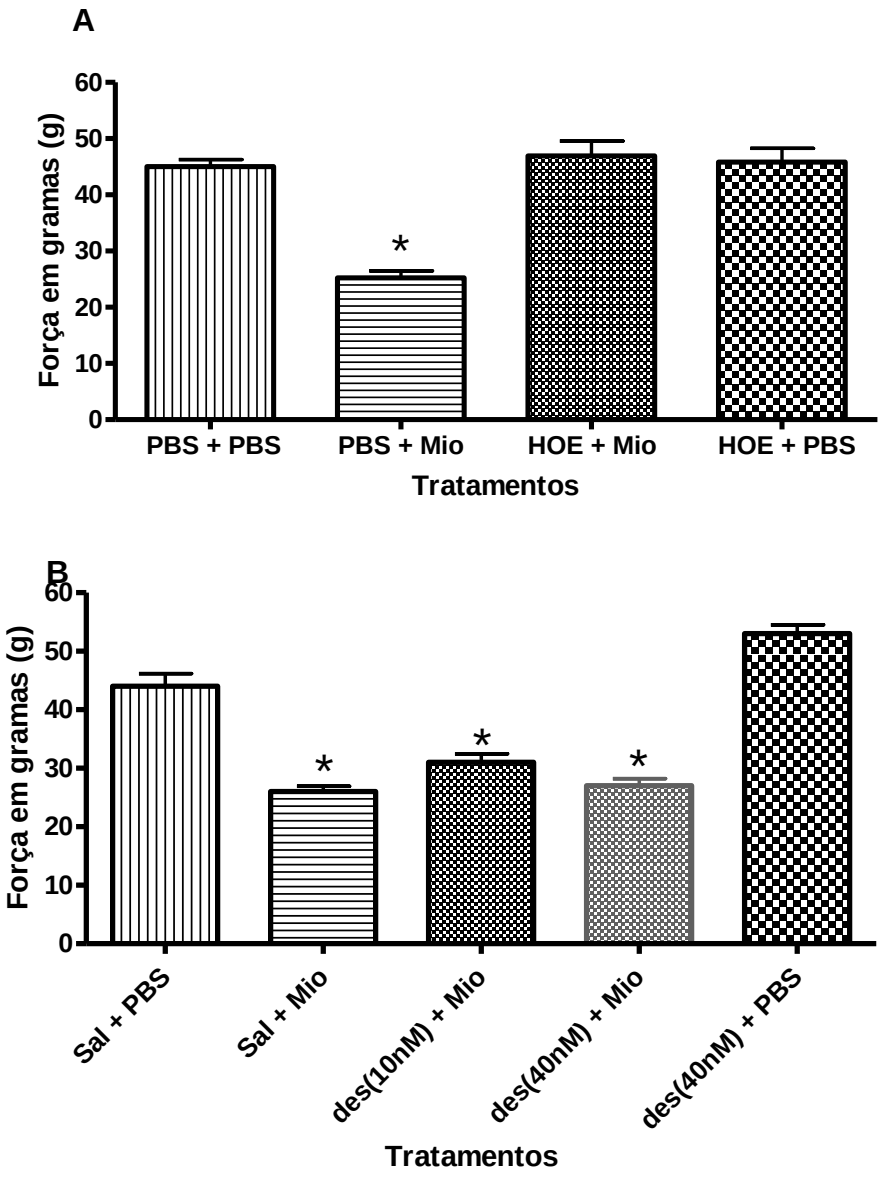


Figura 14. Efeito do tratamento com antagonistas de bradicinina sobre a hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II. A Miotoxina II (10µg) ou PBS foram injetados na articulação tíbio-társica. A hiperalgesia articular foi avaliada utilizando o von Frey eletrônico (conforme descrito no item 2.7), 8 h após. HOE (painel A-0,75 umol) ou lys-(des-arg9,leu8)-bradicinina (des, painel B- 10 e 40 nM) foram injetados, por via I.a., 20 min antes da miotoxina. Grupos controles foram constituídos por animais tratados com PBS+PBS, SAL+PBS, HOE+PBS ou des+PBS. Os dados representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com o grupo controle PBS+PBS.

4.6.4 Participação das fosfolipases endógenas na hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II

Para avaliar a possibilidade da ativação de uma fosfolipase endógena, que pode ocorrer tanto pela ação da miotoxina II como por algum outro mediador liberado neste processo inflamatório, foi realizado o pré-tratamento com o inibidor da fosfolipase citosólica ($AACOCF_3$) e com o inibidor da fosfolipase independente de cálcio ($PACOCF_3$) (Figura 15). Os resultados mostram que ambos inibidores reverteram a hiperalgesia induzida pela miotoxina. Os dois inibidores não interferiram, *per se*, com os valores em gramas necessários para a retirada da pata quando comparado aos animais tratados com PBS (Figura 15).

4.6.5 Avaliação da participação do Óxido Nítrico na hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II

O pré-tratamento com LNMMA, um inibidor inespecífico da NOS, por via i.a., não alterou a hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II (Figura 16). O tratamento com LNMMA per se não interferiu com os valores em gramas necessários para a indução da retirada da pata quando comparado aos animais tratados com PBS (Figura 16).

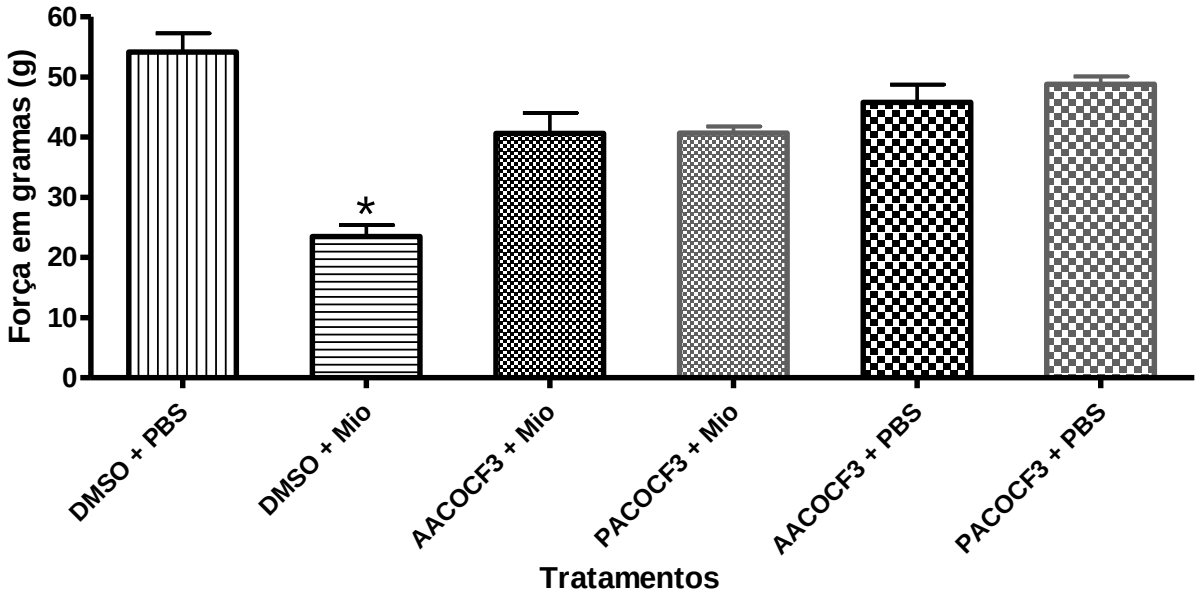


Figura 15. Efeito do tratamento com PACOCF3 OU AACOCF3 sobre a hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II. A Miotoxina II (10 µg/25µL de PBS) ou PBS (25 µL) foram injetados na articulação tíbio társica. A hiperalgesia articular foi avaliada utilizando o *von Frey* eletrônico, 8h após. PACOCF3 (1 µg/25µL de DMSO) ou AACOCF3 (200 µg /25µL de DMSO) ou DMSO (25 µL) foram administrados por via i.a. 30 minutos antes da miotoxina. Grupos controles foram constituídos por animais tratados com PACOCF3+PBS, AACOCF3+PBS ou DMSO+PBS. Os dados representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com o grupo DMSO + MIO.

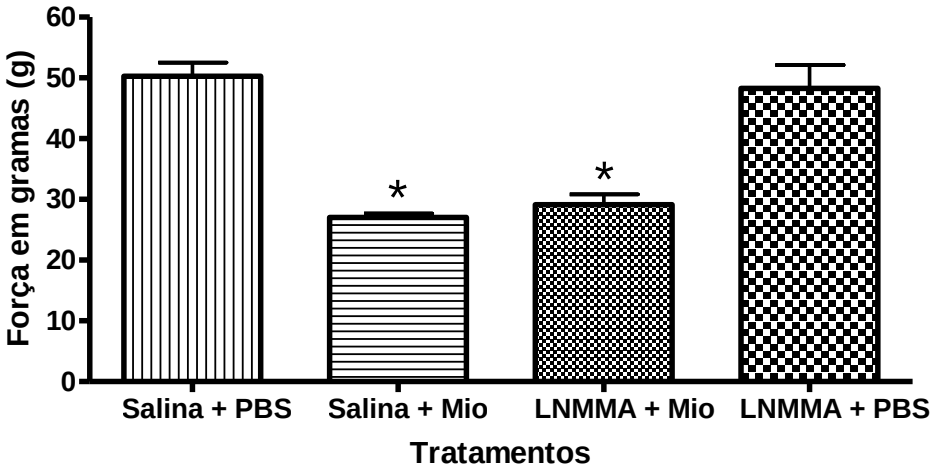


Figura 16. Efeito do tratamento com LNMMA sobre a hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II. A Miotoxina II (10 µg/25µL de PBS) ou PBS (25 µL) foram injetados na articulação tíbio társica. A hiperalgesia articular foi avaliada utilizando o *von Frey* eletrônico (conforme descrito no item 2.7), 8h após. LNMMA (50 µg/25µL de PBS) ou PBS (25 µL)foram administrados por via i.a. 1 hora antes da miotoxina. Grupos controles foram constituídos por animais tratados com Salina+PBS ou LNMMA+PBS. Os dados representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com o grupo PBS + PBS.

4.6.6 Avaliação da participação da serotonina na hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II

Os resultados demonstraram que o pré-tratamento com metisergida, antagonista de receptor serotoninérgico, por via i.p., não alterou a resposta hiperalgésica induzida pela miotoxina (Figura 17). O tratamento com metisergida per se não interferiu com os valores em gramas necessários para a indução da retirada da pata quando comparado aos animais tratados com PBS (Figura 17).

4.6.7 Avaliação da participação da histamina na hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II

O pré-tratamento com prometazina, antagonista de receptor H_1 para histamina, por via i.p., não interferiu na hiperalgesia articular provocada pela miotoxina II (Figura 18). O tratamento com prometazina per se não interferiu com os valores em gramas necessários para a indução da retirada da pata quando comparado aos animais tratados com PBS (Figura 18).

4.6.8 Participação da endotelina na hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II

O pré-tratamento com BQ-123 (Figura 19A) e BQ-788 (Figura 19B), antagonistas seletivos de receptores ET-A e ET-B para endotelina, respectivamente, reverteram parcialmente a hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II. Nenhum dos antagonistas, em nenhuma das doses utilizadas, foi capaz de interferir com os valores em gramas necessários para a retirada da pata quando comparado aos animais tratados com PBS (Figura 19).

É importante esclarecer que a dose aqui utilizada (10 nmol) baseou-se em dados da literatura (Daher et al., 2004). Porém, como obtivemos reversão parcial do efeito da miotoxina, dobramos a dose dos antagonistas para 20 nmol, na tentativa de reverter totalmente a hiperalgesia articular. Novamente, os resultados mostraram que mesmo nesta dose maior, a reversão induzida pelos antagonistas é parcial. Assim,

tentamos ainda associar os dois antagonistas, porém mesmo nestas condições, a hiperalgesia induzida pela miotoxina, não foi alterada (Figura 20).

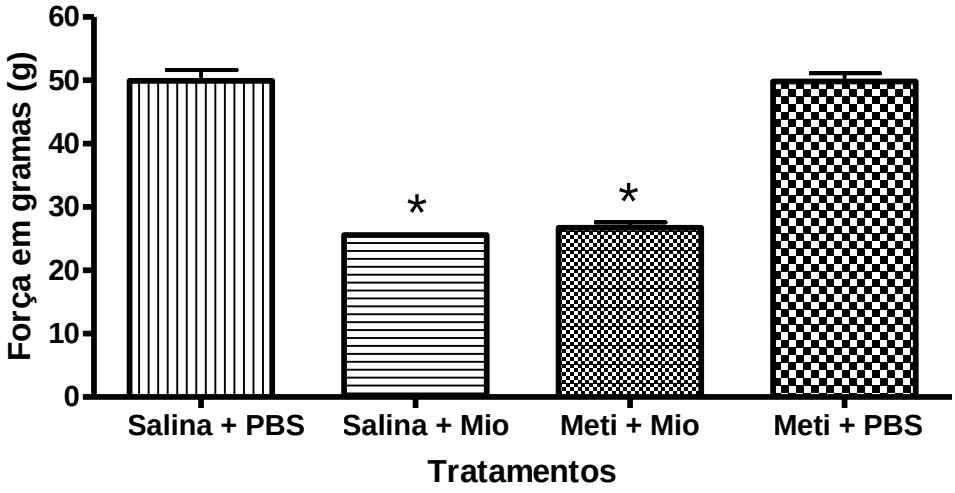


Figura 17. Efeito do tratamento com metisergida sobre a hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II. A Miotoxina II (10 µg/25µL de PBS) ou PBS (25 µL) foram injetados na articulação tíbio társica. A hiperalgesia articular foi avaliada utilizando o *von Frey* eletrônico (conforme descrito no item 2.7), 8 h após. Metisergida (5 mg/kg) ou PBS foram administrados por via i.p. 30 minutos antes da miotoxina. Grupos controles foram constituídos por animais tratados com Salina+PBS ou Meti+PBS. Os dados representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com os grupos controles.

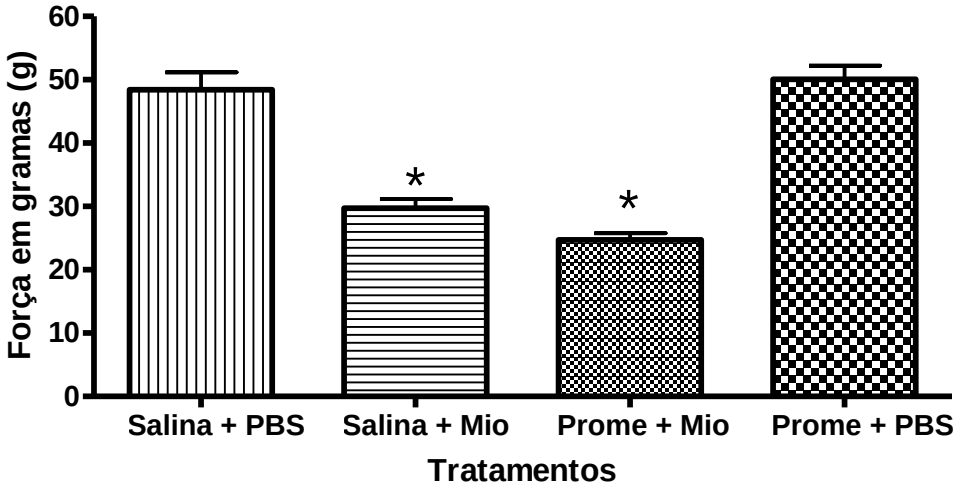


Figura 18. Efeito do tratamento com prometazina sobre a hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II. A Miotoxina II (10 µg/25µL de PBS) ou PBS (25 µL) foram injetados na articulação tíbio társica. A hiperalgesia articular foi avaliada utilizando o *von Frey* eletrônico (conforme descrito no item 2.7), 8h após. Prometazina (5 mg/kg) ou PBS (25 µL) foram administrados por via i.p. 30 minutos antes da miotoxina. Grupos controles foram constituídos por animais tratados com Salina+PBS ou Prome+PBS. Os dados representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com os grupos controles.

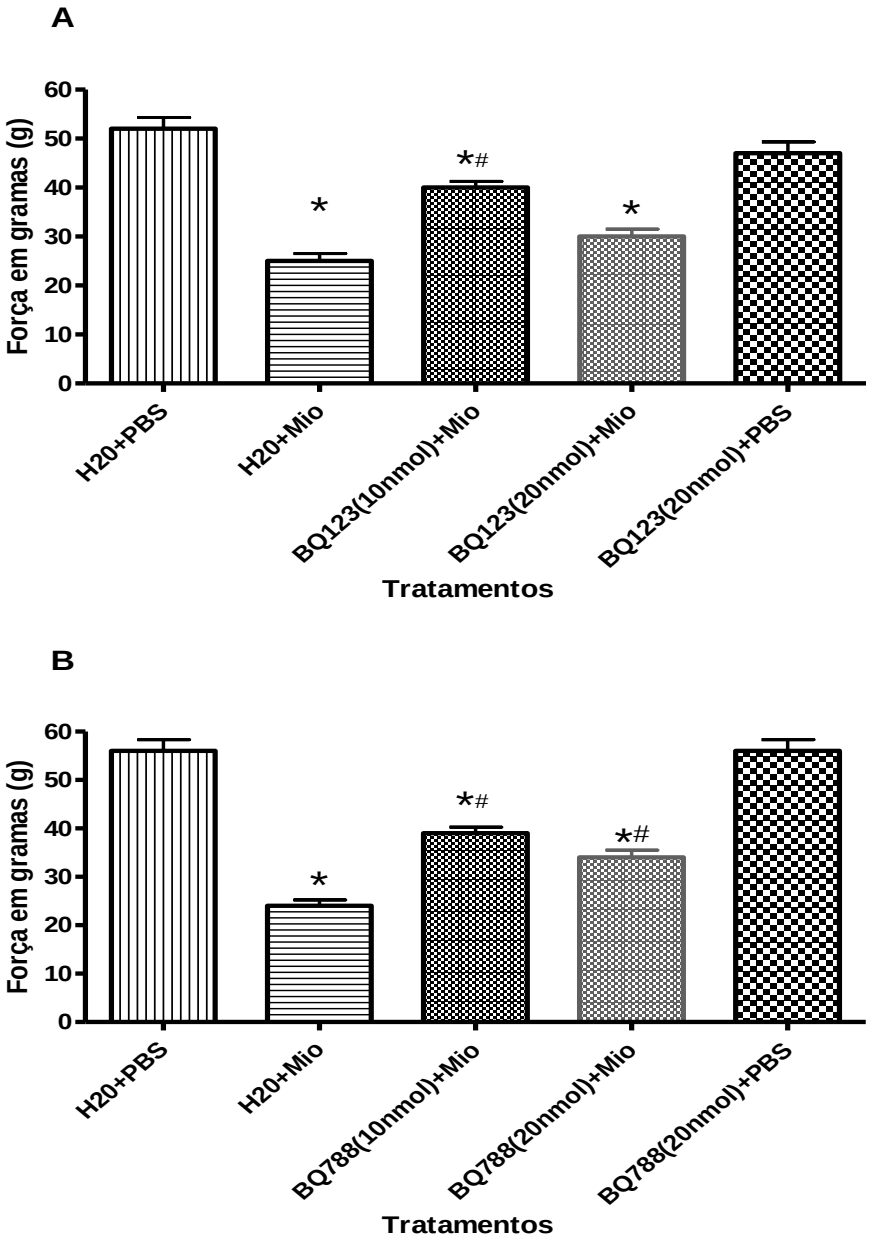


Figura 19. Efeito do tratamento com antagonistas de endotelina isolados sobre a hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II. A Miotoxina II (10 µg/25µL de PBS) ou PBS (25 µL) foram injetados na articulação tíbio társica. A hiperalgesia articular foi avaliada utilizando o von Frey eletrônico, 8 h após administração da miotoxina. BQ-123, antagonista de receptores ET-A (ETA- 10 ou 20 nmol, painel A) ou BQ-788, antagonista de receptores ET-B (ETB- 10 ou 20 nmol, painel B) ou água destilada (H2O) foram administradas por via i.a.15 min antes da miotoxina. Grupos controles foram constituídos por animais tratados com H2O+PBS, ETA+PBS ou ETB+PBS. Os dados representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com o grupo controle H2O+PBS. #p<0,05 por comparação com o grupo H2O+Mio.

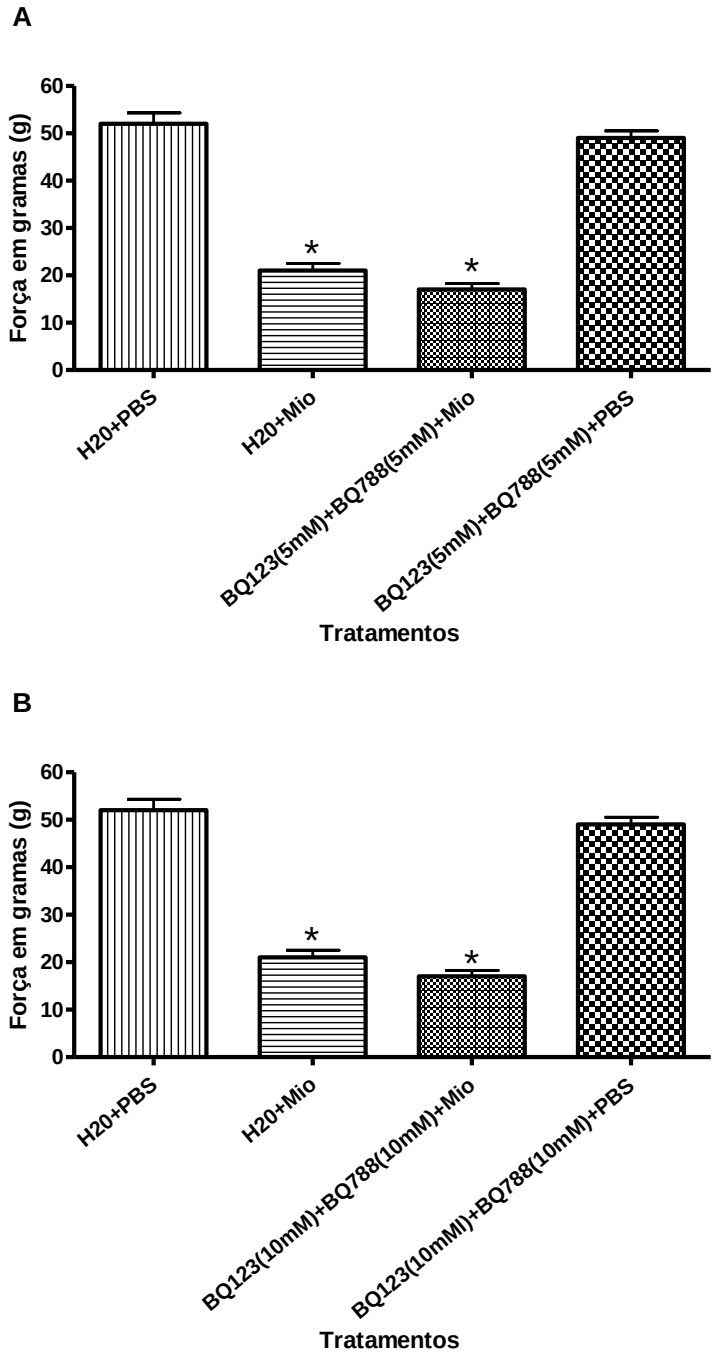


Figura 20. Efeito do tratamento com a associação dos antagonistas de endotelina sobre a hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II. A Miotoxina II (10 µg/25µL de PBS) ou PBS (25 µL) foram injetados na articulação tíbio társica. A hiperalgesia articular foi avaliada utilizando o *von Frey* eletrônico, 8h após. BQ-123, antagonista de receptores ET-A ou BQ-788, antagonista de receptores ET-B foram administradas por via i.a.15 min antes da miotoxina, associados. (A) BQ-123 e BQ-788 (5mM). (B) BQ-123 e BQ-788 (10mM). Grupos controles foram constituídos por animais tratados com H_2O+PBS, ETA+ETB+PBS ou ETA+ETB+PBS. Os dados representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com o grupo controle H2O+PBS. #p<0,05 por comparação com o grupo H2O+Mio.

4.6.9 Participação de citocinas na hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II

O tratamento com anticorpos anti-IL1-β (Figura 21A), anti-IL-6 (Figura 22A) e anti-TNFα (Figura 23A) foram capaz de reverter totalmente a hiperalgesia induzida pela miotoxina II. Já o tratamento com o anticorpo anti-CINC-1 reverteu apenas parcialmente a hiperalgesia induzida pela fosfolipase (Figura 24A). Os tratamentos com os anticorpos *per se* não interferiram com os valores em gramas necessários para a indução da retirada da pata, quando comparado aos animais tratados com PBS. É importante ressaltar que as doses de anticorpo presentemente utilizadas foram determinadas em ensaios de hiperalgesia articular induzida por carragenina (Figuras 21B, 22B,23B e 24B).

4.6.10 Participação de metaloproteinases na hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II

O pré-tratamento dos animais com GM6001 (Ilomastat), inibidor de amplo espectro de metaloproteinases, nas concentrações de 27 nM não foi capaz de alterar a hiperalgesia induzida pela miotoxina II (Figura 25A). Esta mesma droga foi utilizada em concentração maior (71 nM), porém, nesta dose, apesar de ter causado uma pequena reversão na hiperalgesia acarretada pela miotoxina, a droga per se acarretou hiperalgesia (Figura 25A). É importante ressaltar que na concentração de 27nM, o inibidor de metaloproteinases reverteu a hiperalgesia articular induzida por zimosan, utilizado como controle positivo (Figura 25B).

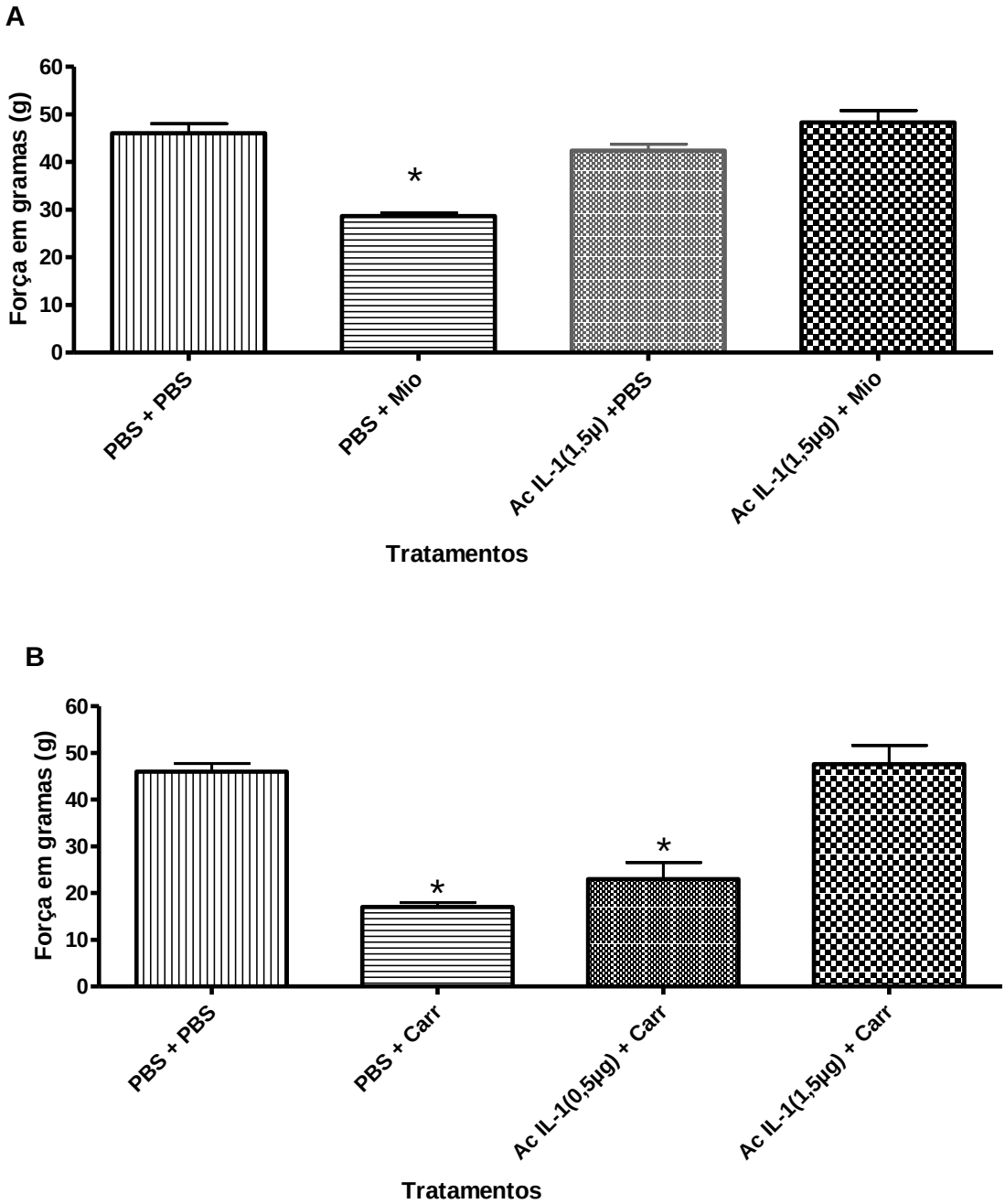


Figura 21. Efeito do tratamento com anticorpo anti-IL-1β sobre a hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II. A Miotoxina II (10µg, painel A) ou carragenina (Carr, 200ug, painel B, controle positivo) ou PBS foram injetados na articulação tíbio társica. A hiperalgesia articular foi avaliada utilizando o *von Frey* eletrônico (conforme descrito no item 2.7), 8h após. Anticorpo anti-IL-1β (AcIL-1- 0,5 e 1,5 ug) ou PBS foram administradas por via i.a. 30 min antes da miotoxina ou carragenina. Grupos controles foram constituídos por animais tratados com PBS+PBS, ou AcIL-1+PBS. Os dados representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com o grupo controle PBS+PBS.

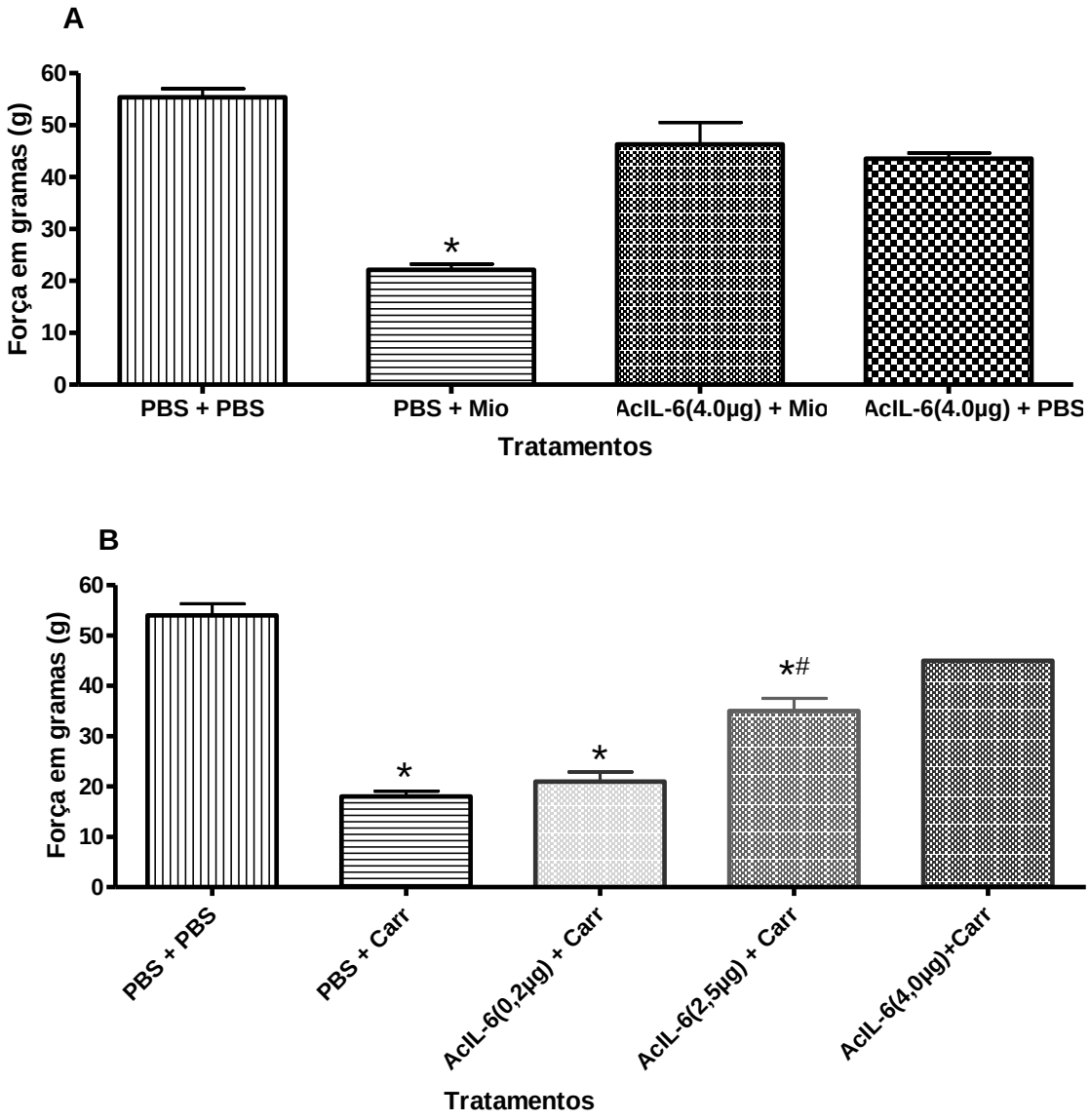


Figura 22. Efeito do tratamento com anticorpo anti-IL-6 sobre a hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II. A Miotoxina II (10µg, painel A) ou carragenina (Carr, 200ug, painel B, controle positivo) ou PBS foram injetados na articulação tíbio társica. A hiperalgesia articular foi avaliada utilizando o *von Frey* eletrônico, 8h após. Anticorpo anti-IL-6 (AcIL-6- 0,2, 2,5 e 4,0 ug) ou PBS foram administradas por via i.a. 30 min antes da miotoxina ou carragenina. Grupos controles foram constituídos por animais tratados com PBS+PBS, ou AcIL-6+PBS. Os dados representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com o grupo controle PBS+PBS. #p<0,05 por comparação com o grupo PBS+Carr.

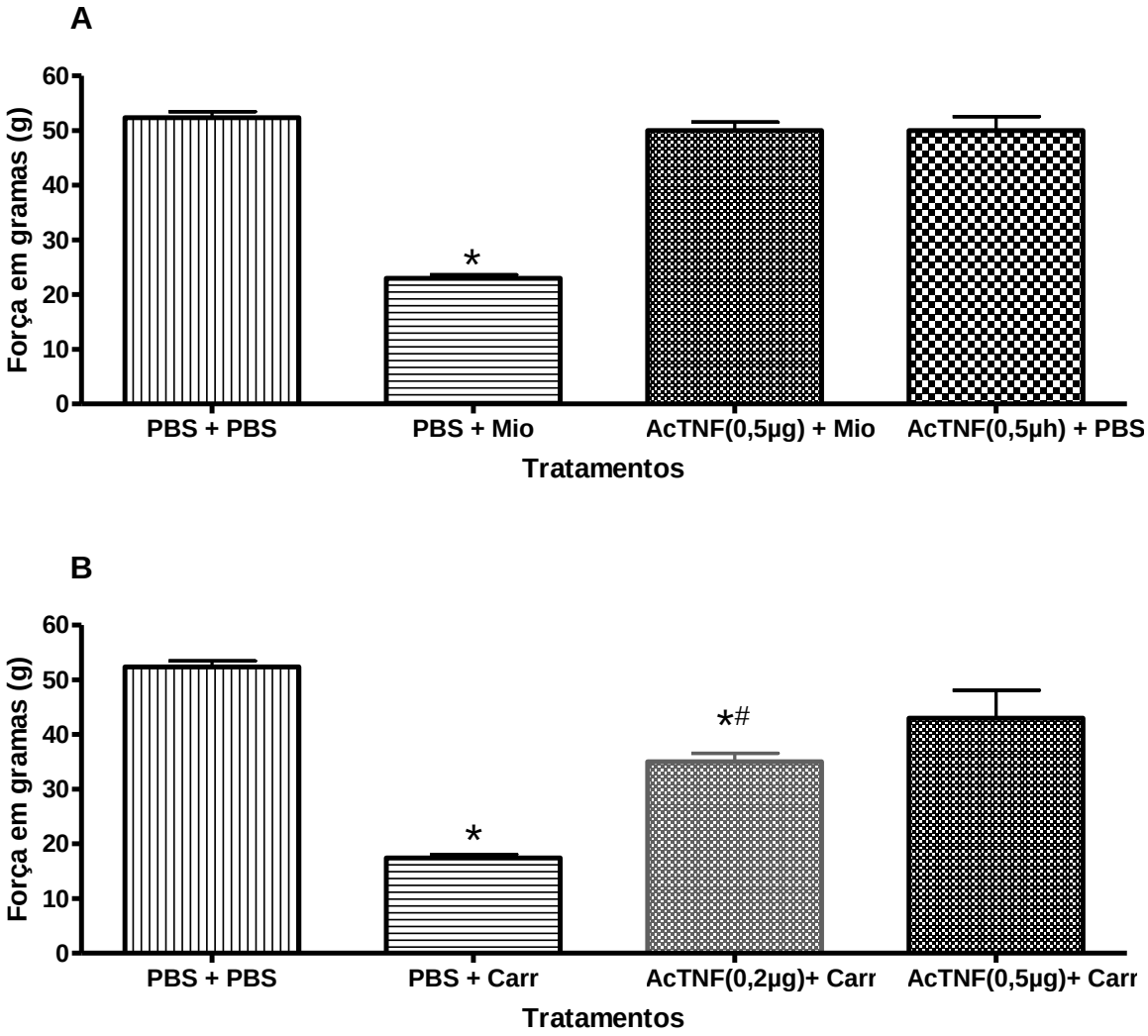


Figura 23. Efeito do tratamento com anticorpo anti-TNFα sobre a hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II. A Miotoxina II (10µg, painel A) ou carragenina (Carr, 200ug, painel B, controle positivo) ou PBS foram injetados na articulação tíbio társica. A hiperalgesia articular foi avaliada utilizando o von Frey eletrônico, 8h após. Anticorpo anti-TNFα (AcTNF- 0,2 e 0,5 ug) ou PBS foram administradas por via i.a. 30 min antes da miotoxina ou carragenina. Grupos controles foram constituídos por animais tratados com PBS+PBS, ou AcTNF+PBS. Os dados representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com o grupo controle PBS+PBS. #p<0,05 por comparação com o grupo PBS+Carr.

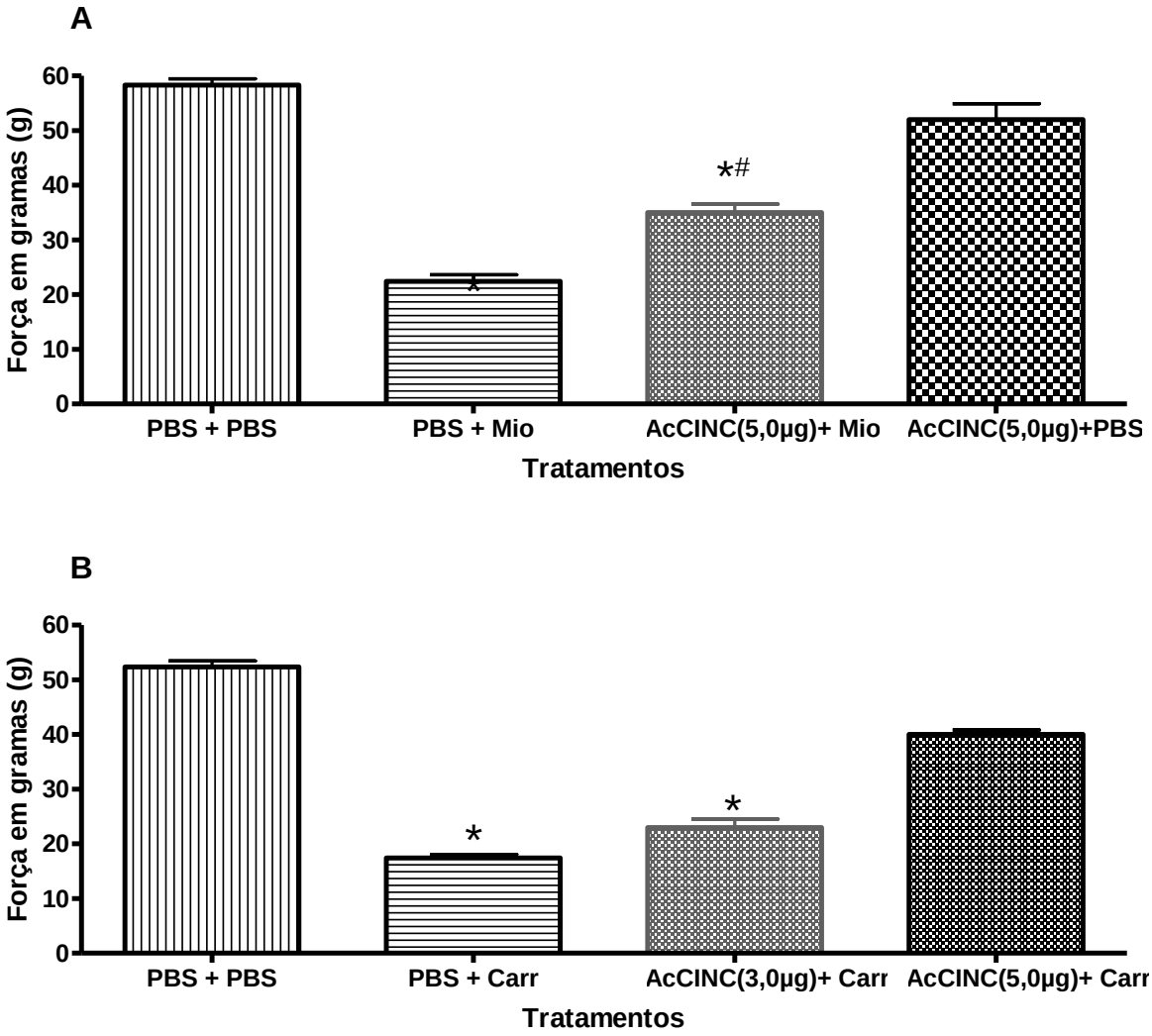


Figura 24. Efeito do tratamento com anticorpo anti-CINC-1 sobre a hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II. A Miotoxina II (10µg, painel A) ou carragenina (Carr, 200ug, painel B, controle positivo) ou PBS foram injetados na articulação tíbio társica. A hiperalgesia articular foi avaliada utilizando o *von Frey* eletrônico, 8h após. Anticorpo anti-CINC-1 (AcCINC-1- 3,0 e 5,0 ug) ou PBS foram administradas por via i.a. 30 min antes da miotoxina ou carragenina. Grupos controles foram constituídos por animais tratados com PBS+PBS, ou AcCINC-1+PBS. Os dados representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com o grupo controle PBS+PBS. #p<0,05 por comparação com o grupo PBS+car.

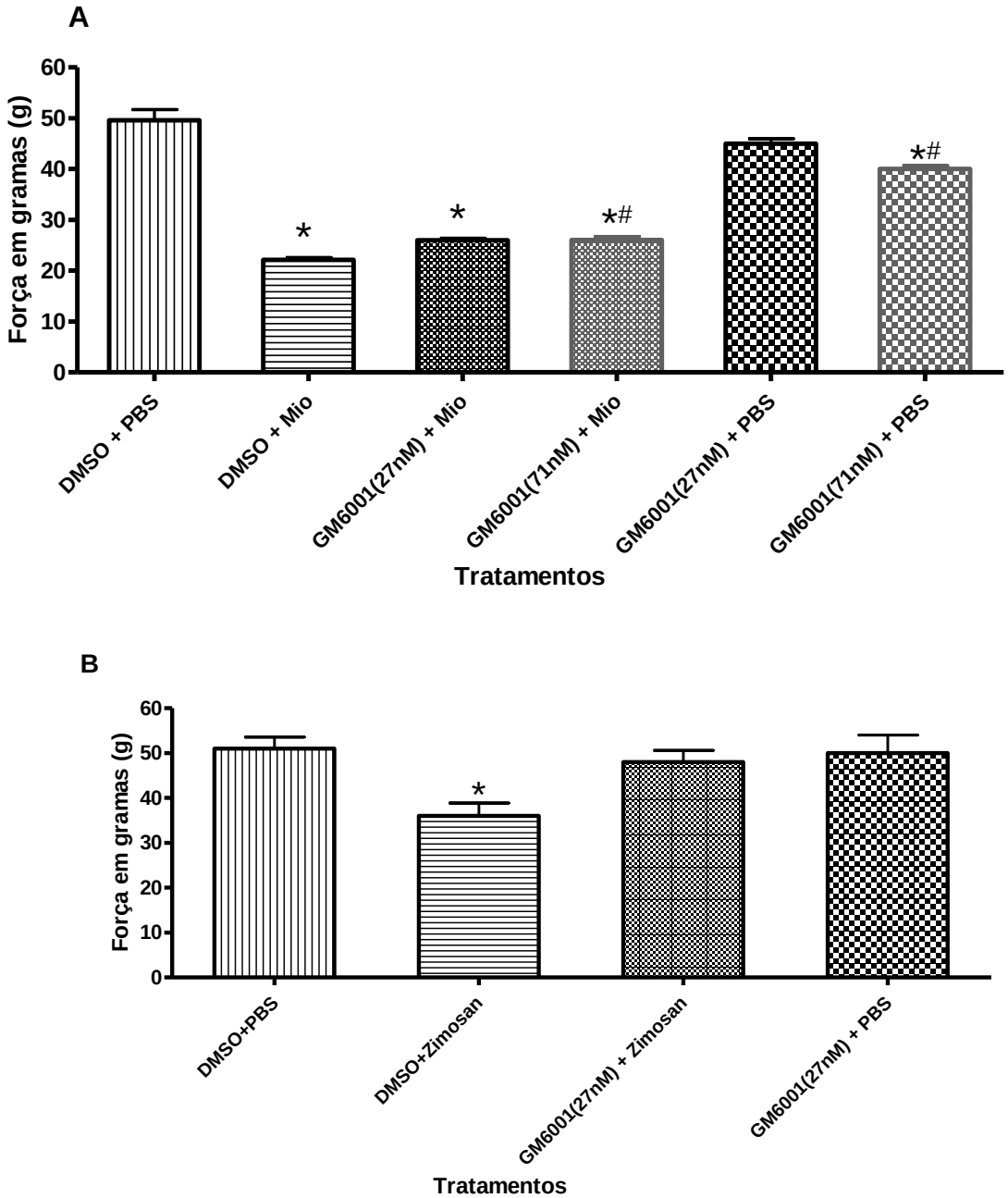


Figura 25- Efeito do tratamento com GM6001 sobre a hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II. A Miotoxina II (10µg, painéis A e B) ou Zimosan (30ug, painel C, controle positivo) ou PBS foram injetados na articulação tíbio társica. A hiperalgesia articular foi avaliada utilizando o von Frey eletrônico, 8h após. GM6001, nas doses de 27 ou 71 nM (painel A) ou DMSO+PBS foram administradas por via i.a. 30 min antes da miotoxina ou zimosan. Grupos controles foram constituídos por animais tratados com DMSO+PBS, ou GM6001+PBS. Os dados representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com o grupo controle DMSO+PBS. #p<0,05 por comparação com o grupo DMSO+Mio.

4.6.11 Contribuição da migração celular induzida pela miotoxina II para o processo hiperalgésico

O pré-tratamento com fucoidina, um ligante da L-selectina, por via i.v., reverteu a hiperalgesia articular induzida pela miotoxina II (Figura 26A). Como controle positivo, foi realizado o ensaio de mieloperoxidase para comprovação de que, na dose utilizada, a fucoidina reverteu a migração celular (Figura 26B).

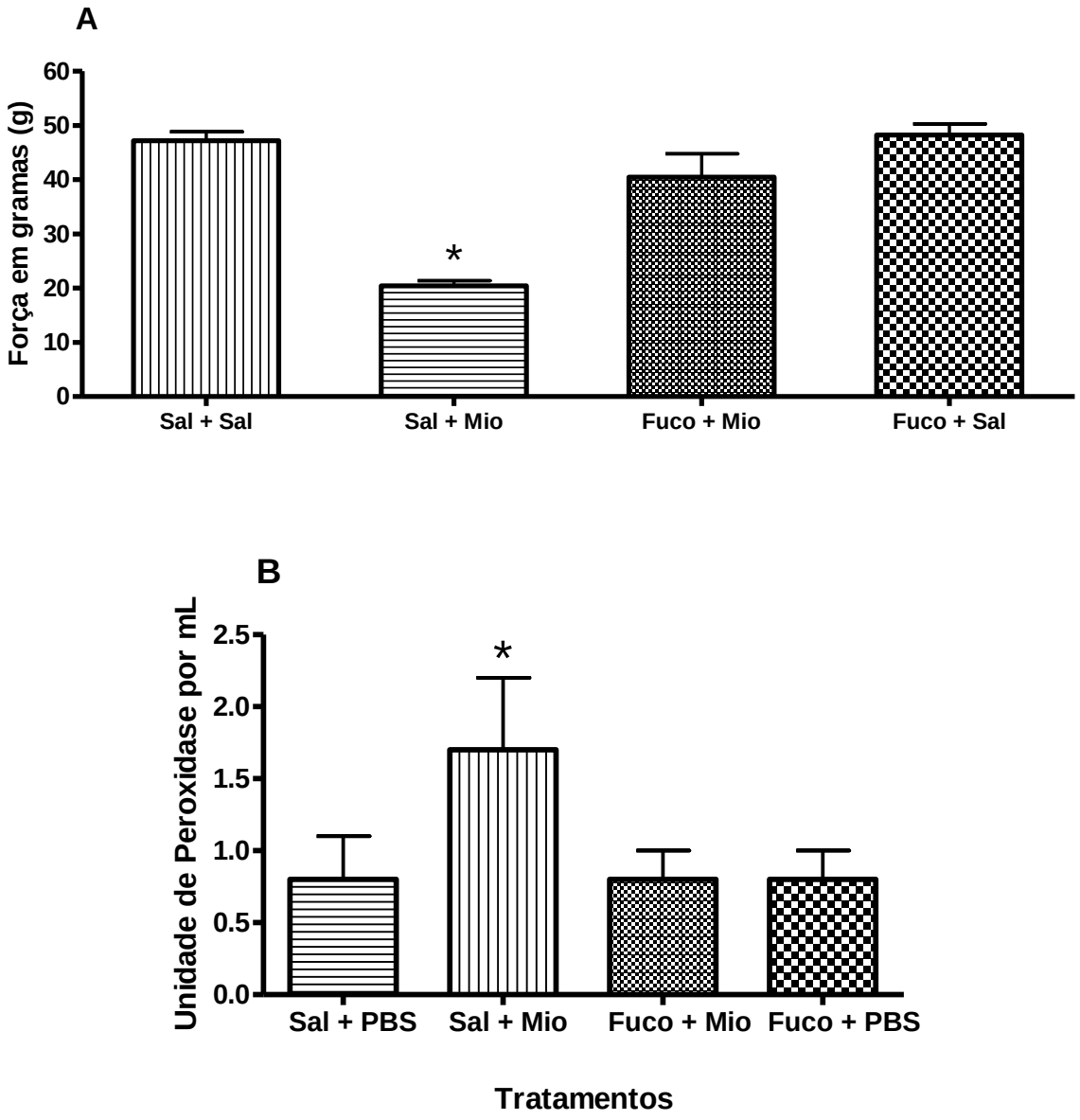


Figura 26. Efeito do tratamento com fucoidina sobre a hiperalgesia articular e migração celular induzidas pela miotoxina II. A Miotoxina II (10 µg/25µL de PBS) ou PBS (25 µL) foram injetados na articulação tíbio társica. Fucoidina (5 mg/kg) ou salina foram administrado por via endovenosa 15min antes da miotoxina. Grupos controles foram constituídos por animais tratados com Sal+PBS ou Fuco+PBS. (A) A hiperalgesia articular foi avaliada utilizando o von Frey eletrônico, 8 h após. (B) A migração celular qualitativa foi avaliada por ensaio de mieloperoxidase. Os dados representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *$p<0,05$ por comparação com o grupo controle Sal+PBS.

5 DISCUSSÃO

Como mencionado na Introdução, a artrite é uma inflamação das articulações, ou seja, é o conjunto de sintomas e sinais que resultam de lesões articulares, de diversas etiologias e que envolve resposta inflamatória multimediada e apresenta, entre outros sintomas, dor, aumento da temperatura, vermelhidão, aumento do volume e diminuição de mobilidade (Evans e Robbins, 1996; Mulherin et al., 1996; Tehranzadeh et al., 2005; Harris, 1990; Yanni et al., 1994; Goldring, 2001; Pelletier et al., 2001).

As fosfolipases A2 secretadas, particularmente do grupo IIA, estão presentes em altas concentrações no fluido sinovial de pacientes com artrite reumatóide, contudo, não é ainda conhecido o papel destas FLA_2 para a gênese e manutenção dos quadros de inflamação articular. Baseados nos estudos de que a miotoxina II (fosfolipase A_2 secretada do grupo IIA) isolada do veneno da *Bothrops asper* tem importante papel na gênese de inflamação e dor, este trabalho teve como objetivo utilizar esta FLA_2 como ferramenta para indução de inflamação articular e melhor compreender o papel das $sFLA_2$ neste processo.

Inicialmente, foi realizada a padronização das doses de Miotoxina II a serem utilizadas, analisando-se as curvas dose- e tempo-resposta da migração leucocitária para a cavidade articular e o efeito nociceptivo induzidos pela injeção intraarticular desta fosfolipase.

Desta maneira, foram administradas, na articulação fêmur-tíbio-patelar, as doses de 5, 10 e 15 µg/articulação da Miotoxina II. A escolha das doses esteve baseada em estudos realizados pelo nosso grupo, sobre o efeito nociceptivo desta fosfolipase injetada por via intraplantar em ratos, mostrando que estas doses são capazes de acarretar hiperalgesia multimediada (Chacur et al., 2003). A carragenina foi utilizada como controle positivo. Conforme apresentado nos Resultados, a dose de 10 µg/articulação de miotoxina e a carragenina (200 µg/articulação) foram capazes de acarretar aumento no número de leucócitos mobilizados para a cavidade articular, significativo na 8ª hora, decaindo a seguir, não sendo mais observado na 12ª hora após as injeções. As demais doses apresentaram ligeiro aumento no número total de

células na cavidade articular, porém este aumento não foi estatisticamente significativo, quando comparado ao grupo controle (PBS).

Como controle adicional foi utilizada albumina sérica bovina (BSA), com o intuito de investigar a possível reação do organismo à quantidade de proteínas injetada na cavidade intraarticular. Para tanto, o BSA foi administrado na mesma concentração protêica da dose mais alta utilizada de miotoxina, avaliada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Os resultados indicaram que o BSA não acarreta migração celular, uma vez que os resultados obtidos com este tratamento não foram significativamente diferentes dos resultados obtidos no grupo PBS (controle negativo).

Ainda, a análise diferencial para todas as concentrações de MII e para a carragenina indicou que o aumento do número de células totais foi decorrente da mobilização de polimorfonucleares. Contudo, durante a contagem das células em microscópio óptico, observou-se, para a dose de 15 µg da fosfolipase, a presença de alterações na morfologia das células, sugerindo alteração da viabilidade celular. Para melhor confirmar esta observação, PMN coletados da cavidade peritoneal de ratos normais, foram incubados com as diferentes doses de Miotoxina II e a viabilidade analisada pelo método de exclusão do azul de Tripan. Os dados mostraram que para a dose de 15 µg, ocorreu 50% da perda da viabilidade celular. Desta forma, para os experimentos subseqüentes, foi utilizada a dose de 10 µg/articulação da Miotoxina II, uma vez que esta dose foi capaz de acarretar migração celular significativa para a articulação dos animais sem alterar a viabilidade celular. É importante salientar que Mora e colaboradores (2006), em estudos *in vitro* utilizando células CRL-8062, uma linhagem linfoblastóide B, observaram necrose associada à ruptura da membrana plasmática apenas em doses acima de 25 µg/ml desta mesma Miotoxina.

É importante ressaltar que os trabalhos mostrando o efeito das Miotoxinas com estrutura de fosfolipase A_2, isoladas do veneno de *B. asper*, sobre a mobilização e função leucocitárias são ainda escassos e estão preferencialmente relacionados aos estudos sobre macrófagos. Zuliani et al. (2005), estudando o efeito inflamatório das Miotoxinas isoladas do veneno desta serpente, observaram que a injeção intraperitoneal de Miotoxina II em camundongos, acarreta a mobilização de leucócitos, na sexta hora, com migração preferencial de PMN. Contudo, este efeito só foi

observado para a dose de 40 µg/animal, não sendo detectada migração de leucócitos após a administração de 10 ou 20 µg da Miotoxina II. Vale ressaltar que a diferença no local da injeção da miotoxina, entre nossos estudos (cavidade intraarticular) e os realizados por Zuliani et al. (2005) (cavidade peritoneal) pode explicar as diferenças nos efeitos das diferentes doses da toxina.

Ainda, nossos dados mostrando que a carragenina é capaz de acarretar aumento celular com predomínio de PMN estão de acordo com dados da literatura. Yang et al. (1997) avaliando a migração leucocitária para o fluido sinovial de ratos induzida após a injeção intraarticular de carragenina, demonstraram, também, aumento de células no com predomínio de PMN.

Dando prosseguimento aos estudos de caracterização da inflamação articular induzida pela miotoxina II, avaliamos as possíveis alterações de permeabilidade vascular acarretadas por esta fosfolipase. Os resultados indicam que a miotoxina II é capaz de causar rápido aumento na permeabilidade vascular dos animais, uma vez que este fenômeno foi observado aos 5 minutos, porém significativo apenas aos 15 minutos após a injeção. Esta alteração desaparece também rapidamente, uma vez que a partir dos 30 minutos não há mais diferença significativa na permeabilidade vascular entre os animais tratados com miotoxina e PBS.

Estes dados, mostrando que a miotoxina II é capaz de acarretar aumento de permeabilidade vascular na articulação fêmur-tíbio-patelar, estão de acordo com observações anteriores demonstrando a capacidade desta fosfolipase em induzir aumento de permeabilidade vascular após sua administração na pata e na cavidade peritoneal de roedores (Lomonte et al., 1994; Chaves et al., 1998; Landucci et al., 1998; Zuliani et al., 2005). Ainda, o rápido aumento na permeabilidade vascular (iniciado aos 5 minutos, com pico aos 15 minutos após a injeção) corrobora os dados de Zuliani et al. (2005). Neste trabalho, estes autores sugerem que este rápido extravasamento plasmático é indicativo de ser, este fenômeno, anterior a formação das fendas endoteliais nos vasos da microcirculação, e, ainda, mediado por mediadores vasoativos derivados de mastócitos. Apesar dos mediadores envolvidos neste fenômeno não terem sido avaliados até o momento, Landucci et al. (1998) demonstraram anteriormente a capacidade da fosfolipase Lys-49 em induzir

desgranulação de mastócitos. É importante ressaltar que os mediadores derivados de mastócitos podem contribuir não só para o aumento de permebilidade vascular, mas também para a dor articular (McDougall et al., 2006), e que Chacur et al. (2003) demonstraram anteriormente, a participação da histamina e da serotonina na hiperalgesia induzida por esta miotoxina. A participação deste mediadores na inflamação articular induzida pela miotoxina II será discutida posteriormente.

Apesar de existir diferença significativa na permeabilidade vascular observada entre os grupos miotoxina e PBS, o grupo PBS também foi capaz de acarretar aumento na permeabilidade vascular dos animais, nos tempos iniciais. Estes resultados, relacionados a este aumento de permeabilidade vascular observado no grupo tratado com PBS, diferem dos dados em relação a este mesmo fenômeno observado por Zuliani et al. (2005) na cavidade peritoneal de camundongos. Esta diferença pode ter ocorrido devido a diferença do local de avaliação da permeabilidade vascular em ambos os trabalhos (cavidade articular fêmur-tíbio-patelar em nosso trabalho e cavidade peritoneal no trabalho de Zuliani et al), sendo que o aumento de permeabilidade no grupo PBS, observado presentemente, pode ser decorrente do trauma da injeção.

Ainda, com relação ao aumento de permeabilidade vascular induzido por fosfolipases, Zuliani et al. (2005), estudando a capacidade de alteração da permeabilidade vascular das fosfolipases Lys-49 e Asp-49 (miotoxinas II e III, sem e com atividade catalítica, respectivamente) isoladas do veneno da *B. asper*, observou que a atividade enzimática da fosfolipase, apesar de seu papel importante neste evento, não é essencial, uma vez que ambas as fosfolipases foram capazes de acarretar aumento de permeabilidade vascular. Estes resultados estão de acordo com diversos dados da literatura que demonstram que diferentes fosfolipases enzimaticamente inativas são capazes de induzir aumento de permeabilidade vascular e edema (Lomonte et al., 1994; Landucci et al., 1998; Zuliani et al., 2005). Em conjunto, estes dados sugerem que o aumento da permeabilidade vascular induzido pela miotoxina II possa ocorrer por mecanismos não relacionados à hidrólise fosfolipídica, e ainda, indicam a existência de regiões diferentes do sítio catalítico, nestas moléculas, que podem contribuir para este fenômeno (Zuliani et al., 2005).

Em relação à capacidade desta miotoxina em alterar parâmetros de sensibilidade dolorosa, no presente estudo foi utilizada metodologia descrita por Guerrero et al. (2006) para avaliação da dor articular, denominada hiperalgesia articular. Neste método, é empregado, para avaliação da hiperalgesia, o *von Frey* eletrônico, aplicado à superfície plantar de uma das patas posteriores do rato. Neste caso, a articulação submetida ao processo inflamatório é a articulação tíbio-társica destes animais. Para avaliação do fenômeno de hiperalgesia articular, uma força (em gramas) crescente é aplicada na superfície plantar do membro posterior dos animais, para indução da flexão dorsal da articulação tíbio-társica, seguida da retirada da pata. Neste caso, na vigência de inflamação nesta articulação, os animais respondem a uma força de menor intensidade, comparativamente a uma articulação não inflamada, caracterizando o fenômeno de hiperalgesia. A avaliação no *von Frey* eletrônico evidenciou a presença de hiperalgesia, para a dose de 10 µg da Miotoxina/articulação, entre a 4ª e 8ª horas após a injeção da toxina, com pico na sexta hora (47% em comparação com o BSA).

Neste método, como controle positivo foi utilizado zimosan, um agente comumente usado como indutor de inflamação articular (Guerrero et al., 2006). O zimosan foi capaz de acarretar hiperalgesia articular estatisticamente significante na 8ª h, quando comparado aos animais tratados com PBS, não sendo mais observado este efeito na 24ª h. Estes dados diferem daqueles obtidos por Guerrero et al. (2006), os quais mostraram que o zimosan, injetado na mesma articulação, porém em camundongos, apesar de apresentar pico de efeito hipernociceptivo na 7ª h, semelhante aos nossos dados, induz hiperalgesia significativa entre 3 e 96h. Diferenças na espécie de animal utilizada podem ter contribuído para as diferenças observadas.

Para que pudéssemos caracterizar, histopatologicamente, o processo inflamatório acarretado pela miotoxina, foi necessário a presença de 3 elementos básicos: edema, congestão e infiltrado celular inflamatório. Nossos dados mostraram que o processo inflamatório na articulação fêmur-tíbio patelar inicia-se na 2ª h após a administração da Miotoxina, podendo ser totalmente caracterizado como artrite aguda na 4ª h. O grupo controle tratado com PBS e avaliado neste mesmo período (4h)

apresenta apenas sinais discretos de alteração vascular que podem ser decorrentes do trauma da injeção. O quadro de inflamação aguda causada pela Miotoxina II ainda pode ser observado na 8ª h, com a presença marcante de células PMN na cápsula articular, corroborando os dados obtidos nos estudos de migração celular. As alterações celulares e vasculares observadas nas análises histopatológicas, sugerindo um processo de inflamação articular, são coincidentes com a cinética dos fenômenos nociceptivos observados nos estudos comportamentais, indicando então que esta fosfolipase foi capaz de induzir resposta inflamatória e nociceptiva quando injetada na cavidade articular. Porém, baseado nestas observações nossos resultados ainda não nos permitem sugerir se os mecanismos envolvidos na gênese da inflamação e da dor estão interrelacionados. Após 24h da administração da Miotoxina, foi observado o aparecimento de fibroplasia, sugestivo de início do processo de reparo do tecido lesado.

Ainda, com a finalidade de confirmar os dados da determinação do número de células no exsudato da articulação fêmur-tibio-patelar realizamos a análise morfométrica, confirmando que o infiltrado PMN é predominante nas articulações que receberam Miotoxina II.

Demonstrada a capacidade da miotoxina II em induzir migração celular, hiperalgesia e alterações histopatológicas características de uma resposta inflamatória, investigamos os mediadores envolvidos nas alterações induzidas pela miotoxina. Nestes estudos, foi utilizado como parâmetro, a nocicepção, avaliada pelo método Guerrero et al. (2006), uma vez que, de acordo com dados da Organização Mundial da Saúde, a principal causa de perda de mobilidade e função das articulações, nos casos de artrite, é a dor (crônica ou mesmo esporádica), e que esta é responsável ainda por alterações psicológicas e prejuízo na qualidade de vida dos pacientes (World Health Organization, 2010).

Nossos dados sugerem que os prostanóides tem papel importante neste fenômeno nociceptivo, uma vez que a indometacina, inibidor das ciclooxigenases, foi capaz de reverter totalmente a hiperalgesia induzida pela miotoxina. Por outro lado, o tratamento com o zileuton, inibidor da lipoxigenase, não foi capaz de acarretar qualquer alteração neste fenômeno, sugerindo a ausência da participação de

mediadores derivados da lipoxigenase neste fenômeno. Uma vez que foi detectado o envolvimento de prostanóides, avaliamos a contribuição da ciclooxigenase tipo 2 na gênese destes eicosanóides. Nossos dados indicam que a ciclooxigenase tipo 2 tem papel relevante neste processo, uma vez que o celecoxib, inibidor seletivo desta enzima, inibiu a hiperalgesia acarretada pela Miotoxina II. É importante ressaltar que este dados, relacionados a presença de prostanóides e ausência de leucotrienos na hiperalgesia induzida pela miotoxina II estão de acordo com os dados de Chacur et al., que detectaram o envolvimento de prostanóides no efeito hiperalgésico da miotoxina quando injetada na pata de ratos e avaliada pelo método de pressão de pata (Chacur et al., 2003).

Apesar do fato de nossos resultados indicarem a participação de prostaglandinas no efeito hiperalgésico da miotoxina II, cabe lembrar que esta fosfolipase é desprovida de atividade enzimática. Assim, para melhor confirmar a capacidade desta miotoxina de acarretar direta ou indiretamente, aumento/estimulação nos níveis de prostaglandina E_2 realizamos a dosagem deste eicosanóide no fluído sinovial. Nossos resultados indicam aumento nos níveis de PGE_2 já a partir de 30 min, porém estatisticamente significativo apenas 6 h após a administração da miotoxina. O aumento observado na 6ª h, apesar de não ser tão intenso quanto o observado para fosfolipases com atividade enzimática (Zuliani et al., 2005), corresponde a uma concentração de prostaglandina aproximadamente 46% maior, quando comparado ao grupo controle. Ainda, este aumento na produção de PGE_2 foi revertido por celecoxib, mostrando ser uma resposta modulada e em concordância com nossos dados anteriores.

Assim, é provável que a ação da miotoxina sobre a geração de prostanóides não seja um ação direta sobre a ciclooxigenase, mas indireta, via algum outro mediador liberado nesta resposta. Ainda, deve ser considerada a possibilidade da produção de prostanóides ocorrer através da ativação de fosfolipases endógenas.

Baseado nestas possibilidades investigamos primeiramente a participação da bradicinina no efeito hiperalgésico da miotoxina II. Trabalhos têm mostrado que alguns mediadores da resposta inflamatória, como por exemplo a bradicinina, são capazes de sensibilizar nociceptores através da geração de ácido araquidônico e prostanóides

(Gammon et al., 1989; Allen et al., 1992). Nossos resultados mostraram que o HOE (icatibant), um antagonista de receptores B2 para bradicinina, reverteu totalmente a hiperalgesia induzida pela miotoxina. Já a administração de lys-(des-arg9,leu8)-bradicinina, um antagonista de receptores B1 para bradicinina, não foi capaz de alterar o fenômeno induzido pela fosfolipase. É importante ressaltar que a concentração dos antagonistas presentemente utilizada (HOE- 0,75 umol e lys-(des-arg9,leu8)-bradicinina- 10 nM), foi baseada em dados da literatura, e foi avaliada sobre a hiperalgesia induzida por bradicinina, injetada por via i.pl., como controle positivo. Ainda assim, como o antagonista de receptores B1, nesta dose, não foi capaz de alterar os efeitos da miotoxina, utilizamos uma dose maior deste antagonista. Os dados obtidos confirmaram a ausência de participação dos receptores B1 no efeito da miotoxina.

Apesar de não termos realizado ainda estudos específicos, nossos dados, mostrando a participação da bradicinina, via receptores B2, no efeito acarretado pela miotoxina, poderiam explicar a geração dos prostanóides na hiperalgesia induzida por esta fosfolipase desprovida de atividade enzimática. Como mencionado anteriormente, dados da literatura têm demonstrado que a geração de prostanóides pela bradicinina envolve liberação de ácido araquidônico e aumento na expressão de COX-2 (Hecquet et al., 2006; Brechter e Lerner, 2007).

É importante ressaltar, ainda, que os dados relacionados à presença de prostanóides e bradicinina na hiperalgesia induzida pela miotoxina II estão de acordo com os dados de Chacur et al. demonstrando esta mesma mediação para o efeito hiperalgésico da miotoxina quando injetada na pata de ratos e avaliada pelo método de pressão de pata (Chacur et al., 2003).

Como mencionado anteriormente, a produção de prostanóides pode ser decorrente também da ativação de fosfolipases endógenas. Neste caso, a ativação da fosfolipase endógena poderia ocorrer tanto pela ação direta da miotoxina, como indiretamente por algum outro mediador liberado nesta resposta. Nesse sentido, foi investigada, a participação das fosfolipases endógenas citosólica e independente de cálcio na hiperalgesia induzida pela miotoxina II. Nossos dados sugerem o envolvimento de fosfolipases endógenas, uma vez que tanto o $AACOCF_3$, um inibidor

da fosfolipase citosólica, quanto o $PACOCF_3$, um inibidor da fosfolipase independente de cálcio, reverteram a hiperalgesia induzida pela miotoxina II.

Dados de literatura têm evidenciado que a ativação de fosfolipases endógenas é um fenômeno comum, desencadeado por diversos estímulos pró-inflamatórios, como citocinas, LPS, entre outros (Kuwata et al., 2007). Ainda, Moreira e colaboradores (2008) demonstraram utilizando miotoxina III, uma fosfolipase Asp-49 enzimaticamente ativa, que a liberação de ácido araquidônico, PGD_2 e PGE_2 por macrófagos, *in vitro* é mediada pela ativação de uma fosfolipase citosólica. Os resultados por nós obtidos, indicam pela primeira vez, que uma fosfolipase exógena enzimaticamente inativa pode ativar fosfolipases endógenas e contribuir para a elucidação pelo menos, em parte, em um dos pontos intrigantes deste trabalho, sobre como uma fosfolipase desprovida de atividade enzimática poderia acarretar todos os fenômenos observados em uma resposta inflamatória multimediada.

Em continuidade à determinação dos mediadores envolvidos no efeito hiperalgésico da miotoxina, nossos dados sugerem que o óxido nítrico não está envolvido no efeito nociceptivo da Miotoxina II, uma vez que o L-NMMA, inibidor inespecífico da óxido nítrico sintase, não foi capaz de alterar a hiperalgesia induzida pela fosfolipase. Dados de literatura têm mostrado que o NO é um mediador envolvido em diversos tipos de resposta inflamatória, entre elas as inflamações articulares (Stadler et al., 1991; Mulherin et al., 1996; Guzzo et al., 2000). Assim, mesmo frente aos resultados negativos relacionados a participação do NO na hiperalgesia induzida pela miotoxina, utilizando-se o inibidor da NOS, quantificamos o NO presente no lavado articular e no homogenato da articulação, indiretamente, através da quantificação espectrofotométrica do nitrito presente na amostras pelo método de *Griess* (dados não mostrados). Estes dados não foram apresentados uma vez que não foi possível detectar qualquer quantidade de nitrito nestas amostras, confirmando a ausência da participação do NO neste processo hiperalgésico. O método de *Griess* é um dos métodos mais utilizados para detecção de óxido nítrico em amostras de diferentes origens devido à facilidade na sua execução e baixo custo, contudo diversas limitações no seu uso tem sido evidenciadas. Um destes fatores limitantes é a sua sensibilidade, uma vez que este método só é capaz de detectar concentrações de

nitrito acima da ordem de µM (Stone et al., 1997; Tsikas et al., 2007). Este fato poderia explicar a não detecção de nitrito em nossas amostras. Porém, nossos dados relacionados à ausência da participação de NO na hiperalgesia induzida pela fosfolipase Lys-49 estão de acordo com os dados de Chacur et al. (2003), onde não foi observada a participação do NO na hiperalgesia induzida por esta mesma fosfolipase na pata de ratos.

No presente estudo foi também investigada a participação de serotonina e histamina no efeito hiperalgésico articular. Nossos resultados sugerem que estes mediadores não estão envolvidos neste fenômeno, uma vez que a administração de metisergida e prometazina, antagonista de receptores serotoninérgicos e receptores H1 para histamina, não foram capazes de alterar a hiperalgesia induzida pela fosfolipase.

Dados da literatura têm sugerido a participação de histamina e serotonina em diferentes efeitos induzidos tanto pela mitoxina II quanto por outras fosfolipases desprovidas de atividade enzimática. Landucci et al. (1998, 2000) demonstraram a capacidade de diferentes miotoxinas desprovidas de atividade enzimática, incluindo a fosfolipase Lys-49, em induzir a liberação de aminas vasoativas por mastócitos. Zuliani et al. (2005), avaliando os efeitos pró-inflamatórios acarretados pela miotoxina II isolada de *B. asper*, observaram que esta fosfolipase é capaz de acarretar um rápido extravasamento plasmático, mediado por mediadores vasoativos derivados de mastócitos. Ainda, Chacur et al. (2003) mostraram a participação da histamina e da serotonina na hiperalgesia induzida pela miotoxina II administrada por via intraplantar.

É importante ressaltar que a participação destes mediadores (histamina e serotonina) nos efeitos descritos acima sempre foi detectada precocemente no processo inflamatório ou hiperalgésico. Zuliani et al. (2005), detectaram a participação dos mediadores vasoativos derivados de mastócitos no pico do aumento da permeabilidade plasmática que ocorria entre 5 e 15 minutos após a administração da miotoxina. Chacur et al. (2003) mostraram a participação destes mesmos mediadores no pico da resposta hiperalgésica, que após administração intraplantar, ocorria na 1ª hora. Uma vez que histamina e serotonina são liberadas após desgranulação de mastócitos, o que ocorre no início do processo inflamatório, não descartamos a

participação destes mediadores em tempos anteriores ao tempo por nós avaliado, ou mesmo mediando outros fenômenos (como, por exemplo, o aumento de permeabilidade vascular, que como já demonstrado, ocorre 15 minutos após a administração da miotoxina na articulação).

Em continuidade ao estudo da mediação química da resposta induzida pela miotoxina II, avaliamos o envolvimento da endotelina neste processo. O BQ-123, antagonista seletivo de receptores ET-A e o BQ-788, antagonista seletivo de receptores ET-B reverteram parcialmente a hiperalgesia induzida pela fosfolipase. Ainda, associamos os dois antagonistas, a fim de verificar se era possível obter a reversão total da hiperalgesia. Como a concentração individual de cada antagonista utilizada anteriormente foi de 10nM, utilizamos novamente as concentrações de 5 ou 10nM de cada antagonista. Os resultados demonstraram que a associação dos dois antagonistas não foi capaz de alterar a hiperalgesia induzida pela miotoxina II. Até o momento, não explicamos estes dados, no entanto, cada antagonista administrado individualmente é capaz de reverter parcialmente a hiperalgesia induzida pela miotoxina, e por isso sugerimos a existência de vias paralelas de mediadores liberados nesta resposta, não sendo a liberação de todos eles seqüencial.

Apesar de Barbosa et al., em 2006, terem demonstrado o envolvimento da endotelina nas alterações renais induzidas por uma miotoxina Lys-49 isolada do veneno de serpentes Bothrops moojeni, nossos dados são os primeiros a demonstrar a participação da endotelina na resposta inflamatória/hiperalgésica induzida por uma fosfolipase de veneno.

Como demonstrado até o momento, diversos mediadores inflamatórios participam da hiperalgesia inflamatória articular induzida pela miotoxina II. Além dos mediadores demonstrados até o momento, diversos trabalhos têm demonstrado que as citocinas estão presentes em altas concentrações no fluído sinovial de pacientes com artrite (Mulherin et al., 1996; Bombini et al., 2004; Nishimoto, 2004). Ainda, têm sido demonstrado que a bradicinina é capaz de acarretar a secreção de diversas citocinas, em diferentes processos inflamatórios, incluindo os processos articulares (Ferreira et al., 1993; Lee et al., 2008). Assim, investigamos a participação das citocinas interleucina-1β, interleucina-6, TNFα e CINC-1 neste efeito. Nossos dados

demonstraram que os anticorpos anti IL-1β, anti IL-6 e anti-TNFα reverteram completamente a resposta hiperalgésica induzida pela miotoxina II. Apenas o anticorpo anti-CINC-1 reverteu parcialmente este efeito. É importante ressaltar que as doses dos anticorpos presentemente utilizadas foram determinadas em curvas dose-resposta sobre a hiperalgesia articular induzida pela carragenina (utilizada como controle positivo).

Nossos dados com relação à participação das citocinas na hiperalgesia induzida pela miotoxina II estão de acordo com os dados de Chacur et al, que demonstraram a presença de IL-1β, IL-6 e TNFα na hiperalgesia induzida pelas miotoxinas II e III, quando injetadas na pata ou mesmo ao redor do nervo ciático de ratos (Chacur et al., 2003; Chacur et al., 2004). É interessante notar que nestes trabalhos, os autores avaliaram a participação destas citocinas da 1ª até a 5ª h do processo hiperalgésico. Nossos dados, demonstrando a participação destas citocinas na 8ª h do processo hiperalgésico, em conjunto com os dados de Chacur et al. (2003, 2004), sugerem a importância destas citocinas durante todo processo inflamatório articular.

Alguns dados da Literatura sugerem, ainda, que as citocinas pró-inflamatórias liberadas em processos agudos ou crônicos, são capazes de estimular fosfolipases endógenas (Divchev e Schieffer, 2008). Assim, reafirmamos a possibilidade da ativação das fosfolipases endógena, pela bradicinina, pela própria miotoxina II ou mesmo pelas citocinas.

Em continuação a determinação da mediação da resposta hiperalgésica inflamatória induzida pela miotoxina II, investigamos a participação de metaloproteinases neste processo. Para tanto, utilizamos inicialmente o GM6001 (Ilomastat), um inibidor de amplo espectro de metaloproteinases (inibidor das MMPs-1, -2, -3, -8 e -9). Inicialmente, este inibidor foi utilizado na concentração de 27 nM, segundo instruções do fabricante sobre a concentração de inibição desta droga para cada uma das MMPs (utilizamos a concentração mais alta). Os dados demonstraram que este inibidor não foi capaz de alterar a hiperalgesia induzida pela miotoxina II, apesar de ter inibido a hiperalgesia articular induzida por zimosan. Este composto foi utilizado como controle positivo, uma vez que dados da Literatura demonstram que o zimosan, quando injetado por via intraarticular no joelho de ratos, é capaz de induzir

aumento na expressão de RNAm para as metaloproteinases-2, -3 e -9 no tecido sinovial (van de Loo et al., 2003). Ainda assim, investigamos se uma concentração mais alta (71 nM) deste inibidor seria capaz de alterar a hiperalgesia induzida pela fosfolipase. Os dados demonstraram que, nesta concentração mais alta, apesar de acarretar uma pequena reversão na hiperalgesia, o grupo do inibidor per se mostrou-se alterado em relação ao controle. Ainda assim, a reversão apresentada foi muito pouco significativa. Portanto, consideramos, pelos dados obtidos com a dose indicada pelo fabricante e que reverteu o controle positivo, que não há o envolvimento de metaloproteinases na hiperalgesia induzida pela miotoxina II.

É importante lembrar que em processos de artrite crônica (osteoartrite ou artrite reumatóide), as fosfolipases são continuamente ativadas. Considerando-se que os principais efeitos da metaloproteinases sejam em etapas posteriores ao início da inflamação, ou seja, na degradação da cartilagem, do colágeno e da matrix extracelular (van Meurs et al., 1999; Goldring, 2001; Baker et al., 2002), não excluímos a possibilidade da participação destas enzimas caso a fosfolipase seja injetada repetidas vezes. Porém, nossos dados confirmam que estas enzimas não estão mediando a resposta hiperalgésica aguda na miotoxina II.

Em continuidade à determinação do mecanismo envolvido na hiperalgesia induzida pela miotoxina II, e, uma vez que demonstramos que o pico de migração celular ocorre na 8ª h, o que coincide com o pico da hiperalgesia, investigamos a contribuição da migração celular para processo hiperalgésico.

O tráfego celular entre o sangue e os tecidos é regulado pela expressão de moléculas de aderência na superfície das células do sangue e das células endoteliais (Butcher e Picker, 1996). Dentre as principais moléculas de aderência envolvidas com a transmigração celular está a L-selectina. A L-selectina participa de processo de “rolling” celular, indispensável para aderência e diapedese e conseqüente migração da célula para o tecido (Mayadas et al., 1993; Ley et al., 1995). Assim, utilizamos a fucoidina, uma ligante da L-selectina, em uma dose capaz de inibir a migração celular para o tecido sem alterar o número de leucócitos circulantes (Zambelli et al., 2008). Nossos dados demonstraram que a fucoidina foi capaz de reverter totalmente a hiperalgesia induzida pela miotoxina II. Como controle, foi realizado ensaio de

mieloperoxidade, que confirmou a diminuição da migração celular para a cavidade articular.

A participação de neutrófilos na contribuição ou inibição da resposta hiperalgésica tem sido discutida. Pagano et al. (2002), avaliando o papel dos neutrófilos na dor inflamatória, sugeriram que o influxo de neutrófilos participa de um controle endógeno desta resposta, uma vez que estes autores observaram antinocicepção após peritonite neutrofílica aguda. Esta resposta seria mediada pela liberação, por estas células, de uma proteína ligante de cálcio denominada MRP-14. Em contrapartida, Cunha et al. (2008) demonstraram a importância da migração neutrofílica na cascata de eventos que geram a hipernocicepção mecânica, uma vez que a fucoidina reduz a hipernocicepção induzida por carragenina, mas não interfere com a hipernocicepção induzida por agentes que estimulam diretamente os nociceptores, independente dos neutrófilos, como PGE_2 e dopamina.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram a importância fundamental das células migradas para o tecido articular para o desenvolvimento da resposta hiperalgésica, induzida pela miotoxina II, corroborando os dados de Literatura apresentados por Cunha et al., em 2008.

Nosso dados demonstraram que a administração intraarticular da miotoxina II foi capaz de induzir um processo de inflamação articular com a presença de sinais clássicos de inflamação aguda como migração celular, aumento de permeabilidade vascular, alterações histopatológicas e alterações na sensibilidade dolorosa dos animais.

Em resumo, os dados obtidos nos permitiram demonstrar que a fosfolipase A_2 variante Lys-49, uma fosfolipase enzimaticamente inativa, isolada do veneno de B. asper, é capaz de induzir um processo de inflamação articular, que apresenta os sinais clássicos de inflamação aguda (edema, congestão e infiltrado celular), além de induzir alterações na sensibilidade dolorosa dos animais. Com relação ao aumento na sensibilidade dolorosa, este processo hiperalgésico é multimediado, envolvendo a participação de bradicinina (via receptores B2), endotelina e citocinas (IL-1β, IL-6, TNFα e CINC-1). Ainda, apesar da ausência da atividade catalítica desta fosfolipase, este quadro inflamatório envolve a participação de prostanóides. A produção destes

prostanóides é decorrente da capacidade desta miotoxina, de estimular direta ou indiretamente fosfolipases endógenas. É importante ressaltar que nossos resultados confirmam dados de literatura mostrando que a atividade enzimática das fosfolipases não seria essencial para o desencadeamento dos fenômenos inflamatórios, sendo apenas importante para a regulação da intensidade do fenômeno (Chacur et al., 2003; Chacur et al., 2004; Zuliani et al., 2005).

6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados indicam que:

- A fosfolipase A_2 secretada, variante Lys-49 (Miotoxina II obtida do veneno de *B. asper*) induz inflamação articular, caracterizada pelo aumento de permeabilidade vascular, infiltrado celular e hiperalgesia.
- A presença de infiltrado polimorfonuclear tem papel importante para a gênese da hiperalgesia.
- A hiperalgesia induzida pela FLA_2 é um processo multimediado, envolvendo a participação de bradicinina, endotelina e citocinas (IL-1β, IL-6, TNFα e CINC-1) e prostanóides.
- FLA_2 endógenas são relevantes para a manifestação do fenômeno nociceptivo.
- Estes dados em conjunto, indicam que esta fosfolipase A_2 pode ser uma ferramenta científica importante para o entendimento de alguns dos mecanismos envolvidos na inflamação articular e da contribuição das fosfolipases para este processo.

REFERÊNCIAS*

Ahrens D, Koch AE, Pope RM, et al. Expression of matrix metalloproteinase 9 (96-kd gelatinase B) in human rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1996;39:1576-87.

Albanesi C, Cavani A, Girolomoni G. IL-17 is produced by nickel-specific T lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes: synergistic or antagonist effects with IFN-gamma and TNF-alpha. J Immunol. 1999;162:494-502.

Allen A, Gammon CM, Ousley AH, et al. Bradykinin stimulates arachidonic acid release through the sequential actions of an sn-1 diacylglycerol lipase and a monoacylglycerol lipase. J Neurochem.1992;58:1130-39.

Arend WP. The pathophysiology and treatment of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum.1997;40:595-97.

Arni RK, Ward RJ, Gutierrez JM, Tulinsky A. Crystal structure of a calcium-independent phospholipase-like myotoxic protein from Bothrops asper venom. Acta Crystallogr.1995; D51:311–17.

Baker EA, Stephenson TJ, Reed MW, Brown NJ. Expression of proteinases and inhibitors in human breast cancer progression and survival. Mol Pathol. 2002;55:300-304.

Barbosa P, Martins AM, Alves RS, et al. The role of indomethacin and tezosentan on renal effects induced by Bothrops moojeni Lys49 myotoxin I. Toxicon. 2006;47:831-37.

Bensouyad A, Hollander AP, Dularay B, et al. Concentrations og glycosaminoglycans in synovial fluids and their relation with immunological and inflammatory mediators in rheumatoid arthritis. Ann Rheum. 1990;49:301-7.

Bernheim HA. Is prostaglandin E2 involved in the pathogenesis of fever? Effects of interleukin-1 on the release of prostaglandins.Yale J Biol Med. 1986;59:151-58.

Bignold LP, Lykke AW. Increased vascular permeability induced in synovialis of the rat by histamine, serotonin and bradykinin. Experientia 1975;31:671-72.

Bomalaski JS, Lawton P, Browning JL. Human extracellular recombinant phospholipase A2 induces an inflammatory response in rabbit joints. J Immunol.1991;146:3904-3910.

Bombini G, Canetti C, Rocha FA, Cunha FQ. Tumour necrosis factor-alpha mediates neutrophil migration to the knee synovial cavity during immune inflammation. Eur J Pharmacol. 2004;496:197-204.

* De acordo com: Internactional Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Jpurnal: sample reference. Available from: http://icmje.org [2007May22].

Boyanovsky BB, Webb NR. Biology of secretory phospholipase A2. Cardiovasc Drugs Ther. 2009;23:61-72.

Bradford, M. 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.

Bradley PP, Christensen RD, Rothstein G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. Blood,1982;60:618-22.

Brechter A, Lerner UH. Bradykinin potentiates cytokine-induced prostaglandin biosynthesis in osteoblasts by enhanced expression of cyclooxygenase 2, resulting in increased RANKL expression. Arthritis Rheum. 2007;56:910-23.

Brennan FM, McInnes IB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. J Clin Invest. 2008;118:3537-45.

Buckwalter JA. Osteoarthritis. Adv Drug Deliv Rev. 2006;58:150-67.

Burke JE, Dennis EA. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. J Lip Res. 2009;50:237-42.

Butcher E, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. Science. 1996;272;60-66.

Canaan S, Zádori Z, Ghomashchi F, Bollinger J, et al. Interfacial enzymology of parvovirus phospholipases A2. J Biol Chem. 2004;279:14502-14508.

Canduri F, Mancuso LC, Soares AM, et al. Crystallization of piratoxin I, a myotoxic Lys49-phospholipase A2 homologue isolated from the venom of *Bothrops pirajai*. Toxicon. 1998;36:547-51.

Canetti CA, Leung BP, Culshaw S, et al. IL-18 enhances collagen-induced arthritis by recruiting neutrophils via TNF-alpha and leukotriene B4. J Immunol. 2003;171:1009-1015.

Chacur M, Longo I, Picolo G, et al. Hyperalgesia induced by Asp49 and Lys49 phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom: pharmacological mediation and molecular determinants. Toxicon. 2003;41:667-78.

Chacur M, Gutiérrez JM, Milligan ED, et al. Snake venom phospholipase A2s (Asp49 and Lys49) induce mechanical allodynia upon peri-sciatic administration: involvement of spinal cord glia, proinflammatory cytokines and nitric oxide. Pain 2004;108:180-91.

Chapman WC., Debelak JP, Blackwell TS, et al. Hepatic cryoablation-induced acute lung injury: pulmonary hemodynamic and permeability effects in a sheep model. Arch Surg. 2000;135:667-72.

Chaves F, Barboza M, Gutiérrez JM. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice.Toxicon. 1995;33:31-39.

Chaves F, Leon G, Alvarado VH, Gutiérrez JM. Pharmacological modulation of edema induced by Lys-49 and Asp-49 myotoxic phospholipases A2 isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo).Toxicon. 1998;36:1861-69.

Chaves F, Teixeira CF, Gutierrez JM. Role of nitric oxide in the local and systemic pathophysiological effects induced by *Bothrops asper* snake venom in mice. Inflamm. Res. 2006;55:245–53.

Cintra-Francischinelli M, Caccin P, Chiavegato A, et al. Bothrops snake myotoxins induce a large efflux of ATP and potassium with spreading of cell damage and pain. Proc Natl Acad Sci USA. 2010;107:14140-5.

Conte FP, Barja-Fidalgo C, Verri WA Jr, et al. Endothelins modulate inflammatory reaction in zymosan-induced arthritis: participation of LTB4, TNF-alpha, and CXCL-1. J Leukoc Biol. 2008;84:652-60.

Couture R, Harrison M, Viana RM, Clutier F. Kinin receptors in pain and inflammation. Eur J Pharmacol. 2001;429:161-76.

Crofford LJ, Wilder RL, Ristimaki AP, et al. Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids. J Clin Invest.,1994;93:1095-1101.

Cruwys SC, Garrett NE, Perkins MN, et al. The role of bradykinin B1 receptors in the maintenance of intra-articular plasma extravasation in chronic antigen-induced arthritis. Br J Pharmacol., 1994;113:940-944.

Cunha TM, Verri WAJr, Schivo IR, et al. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. J Leukoc Biol. 2008;83:824-832.

Daher JB, Souza GE, D´Orleans - Juste P, Rae GA. Endothelin ETB receptors inhibit articular nociception and priming induced by carrageenan in the rat knee-joint. Eur J Pharmacol. 2004;496:77-85.

Dayer JM, Beutler B, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. J Exp Med. 1985;162:2163-2168.

de Castro RC, Landucci EC, Toyama MH, et al. Leucocyte recruitment induced by type II phospholipases A(2) into the rat pleural cavity. Toxicon. 2000;38:1773-1785.

de Kock CP, Burnashev N, Lodder JC, et al. NMDA receptors induce somatodendritic secretion in hypothalamic neurones of lactating female rats. J Physiol. 2004;561:53-64.

Dennis EA. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. J Biol Chem. 1994;269:13057-13060.

Dick WC, Greenan DM, Zeitlin IJ, et al. Studies on the relative effects of prostaglandins, bradykinin, 5-hydroxytryptamine and histamine on the synovial microcirculation in dogs. Br J Pharmacol. 1976;56:313-316.

Dinarello CA. Interleukin-1. Adv Pharmacol. 25;21-51:1994.

Divchev D, Schieffer B. The secretory phospholipase A2 group IIA: a missing link between inflammation, activated renin-angiotensin system, and atherogenesis?. Vascular health and risk management. 2008;4:597-604.

Doak GJ, Sawynok J. Formalin-induced nociceptive behavior and edema: involvement of multiple peripheral 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. Neuroscience. 1997;80:939-949.

Evans CH, Robbins PD. Pathways to gene therapy in rheumatoid arthritis. Curr Opin Rheumatology, 1996;8:230-234.

Fernandes CM, Teixeira CFP, Leite AC, et al. The snake venom metalloproteinase BaP1 induces joint hypernociception through TNF-alpha and PGE2-dependent mechanisms. Br J Pharmacol. 2007;151:1254-1261.

Fernandez J, Gutiérrez JM, Angulo Y, et al. Isolation of an acidic phospholipase A2 from the venom of the snake Bothrops asper of Costa Rica: biochemical and toxicological characterization. Biochimie. 2010;92:273-283.

Ferreira S, Lorenzetti BB, Poole S. Bradykinm initiates cytokine-madiated inflammatory hyperalgesia. Br J Pharmacol, 1993;110:1227-1231.

Ferreira SH, Lorenzetti BB, Bristow AF, Poole S. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. Nature. 1998;334:698-700.

Firestein GS. The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. Curr Opin Rheumatology. 1991;3:398-406.

Forster S, Ilderton E, Norris JF, et al. Characterization and activity of phospholipase A2 in normal human epidermis and in lesion-free epidermis of patients with psoriasis or eczema. Br J Dermatol. 1985;112:135-147.

Fossiez F, Djossou O, Chomarat P., et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. J Exp Med. 1996;183:2593-2603.

Gambero A, Landucci EC, Toyama MH, et al. Human neutrophil migration in vitro induced by secretory phospholipases A2: a role for cell surface glycosaminoglycans. Biochem Pharmacol. 2002;63:65-72.

Gammon C, Allen AC, Morell P. Bradykinin stimulates phosphoinositide hydrolysis and mobilization of arachidonic acid in dorsal root ganglion neurons. J Neurochem.1989; 53:95-101.

Goldbach-Mansky R, Lee JM, Hoxworth JM, et al. Active synovial matrix metalloproteinase-2 is associated with radiographic erosions in patients with early synovitis. Arthritis Res. 2000;2:145-153.

Goldblum SE, Yoneda K, Cohen DA, McClain CJ. Provocation of pulmonary vascular endothelial injury in rabbits by human recombinant interleukin-1 beta. Infect Immun., 1988; 56:2255-2263,1988.

Goldring MB. Anticytokine therapy for osteoarthritis. Expert Opin Biol Ther. 2001;1:817-829.

Gracie JA, Forsey RJ, Chan WL, et al. A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. J Clin Invest. 1999;104:1393-1401.

Greene CM, Meachery G, Taggart CC, et al. Role of IL-18 in CD4+ T lymphocyte activation in sarcoidosis. J Immunol, 2000;165:4718-4724.

Guerrero AT, Verri WAJr, Cunha TM, et al. Hypernociception elicited by tibio-tarsal joint flexion in mice: a novel experimental arthritis model for pharmacological screening. Pharmacol Biochem Behav. 2006;84:244-251.

Gutierrez JM, Gene JA, Rojas G, Cerdas L, Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. Toxicon. 1985;23:887–893.

Gutierrez JM, Lomonte B. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. Toxicon. 1995;33:1405–1424.

Gutiérrez JM, Lomonte B, Chaves F, Moreno E, Cerdas L. Pharmacological activities of a toxic phospholipase A isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. Comp Biochem Phisiol C. 1986;84:159-164.

Guzzo ML, Farsky SH, De Nucci G, et al. Role of kinins and nitric oxide on the rabbit arthritis induced by *Bothrops jararaca* venom. Toxicon. 2000;38:1535-1546.

Harris EDJ. Snake Toxins. New York: Pergamon Press; 1991.

Harris EDJ. Pathophysiology and implications for therapy. Rheumatoid arthritis. 1990;322:1277–1289.

Harris EDJ. Rheumathoid arthritis the clinical spectrum. Textbook of Rheumatology. 1993;1:833-873.

Hashimoto S, Takahashi K, Amiel D, et al. Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis. Arthritis Rheum. 1998;41:1266-74.

Haupt JL, Frisbie DD, McIlwraith CW, et al. Dual transduction of insulin-like growth factor-I and interleukin-1 receptor antagonist protein controls cartilage degradation in an osteoarthritic culture model. J Orthop Res. 2005;23:118-126.

Hecquet C, Biyashev D, Tan F, Erdos EG. Positive cooperativity between the thrombin and bradykinin B2 receptors enhances arachidonic acid release. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006;290:H948-958.

Hegen M, Sun L, Uozumi N, et al. Cytosolic phospholipase A2alpha-deficient mice are resistant to collagen-induced arthritis. J Exp Med. 2003;197:1297-1302.

Hirai Y, Migita K, Honda S, et al.. Effects of nitric oxide on matrix metalloproteinase-2 production by rheumatoid synovial cells. Life Sci. 2001;68:913-920.

Ho IC, Arm JP, Bingham CO3rd, et al. A novel group of phospholipase A2s preferentially expressed in type 2 helper T cells. J Biol Chem. 2001;276:18321-326.

Holland DR, Clancy LL, Muchmore SW, et al. The crystal structure of a lysine 49 phospholipase A2 from the venom of the cottonmouth snake at 2.0-A resolution. J Biol Chem. 1990;265:17649-656.

Hori R, Nomura H, Iwakawa S, Okumura K. Characterization of epidermal growth factor receptors on plasma membranes isolated from rat gastric mucosa. Pharm Res. 1990;7:665-669.

Hurtig IM, Raak RI, Kendall SA, et al. Quantitative sensory testing in fibromyalgia patients and in healthy subjects: identification of subgroups. Clin J Pain. 2001;17:316-22.

Itoh T, Matsuda H, Tanioka M, et al. The role of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in antibody-induced arthritis. J Immunol. 2002;169:2643-47.

Jamal OS, Conaghan PG, Cunningham AM, et al. Increased expression of human type IIa secretory phospholipase A2 antigen in arthritic synovium. Ann Rheum Dis. 1998;57:550-558.

Jones CE, Chan K. Interleukin-17 stimulates the expression of interleukin-8, growth-related oncogene-alpha, and granulocyte-colony-stimulating factor by human airway epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol. 2002;26:748-753.

Joosten LA, van de Loo FA, Lubberts E, et al. An IFN-gamma-independent proinflammatory role of IL-18 in murine streptococcal cell wall arthritis. J Immunol. 2000;165:6553-58.

Kanaka R, Schaible HG, Schimidt RF. Activation of fine articular afferent units by bradykinin. Brain Res.1985;327:81-90.

Khatib AM, Lomri A, Moldovan F, et al. Constitutive and inducible expression of endothelin-1 in primary rat articular chondrocyte culture. Cytokine. 1997;9:556-562.

Kojima F, Kato S, Kawai S. Prostaglandin E synthase in the pathophysiology of arthritis. Fundam Clin Pharmacol. 2005;19:255-261.

Kojima F, Naraba H, Miyamoto S, et al. Membrane-associated prostaglandin E synthase-1 is upregulated by proinflammatory cytokines in chondrocytes from patients with osteoarthritis. Arthritis Res Ther. 2004;6:R355-365.

Kramer RM, Hession C, Johansen B, et al. Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipase A2. J Biol Chem. 1989;264:5768-5775.

Kudo I, Murakami M. Phospholipase A2 enzymes. Prostaglandines Other Lip Med. 2002;58:68-69.

Kuwata H, Fujimoto C, Yoda E, et al. A novel role of group VIB calcium-independent phospholipase A2 (iPLA2gamma) in the inducible expression of group IIA secretory PLA2 in rat fibroblastic cells. J. Biol Chem. 2007;282:20124-20132.

Lambeau G, Gelb M. Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. Annual Review of Biochemistry 2008;77:495-520.

Landucci EC, Castro RC, Pereira MF, et al. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A2 homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. Eur J Pharmacol. 1998;343:257-263.

Landucci EC, Castro RC, Toyama M, et al. Inflammatory oedema induced by the lys-49 phospholipase A(2) homologue piratoxin-i in the rat and rabbit. Effect of polyanions and p-bromophenacyl bromide. Biochem Pharmacol. 2000;59:1289-1294.

Laufer S. Role of eicosanoids in structural degradation in osteoarthritis. Curr Opin Rheumatol.2003;15:623-627
.

Lebrão M, Yao D. O Projeto SABE no Município de São Paulo: uma abordagem inicial. OPAS/MS. 2003;15-32

Lee C, Shieh DC, Tzeng CY, et al. Bradykinin-induced IL-6 expression through bradykinin B2 receptor, phospholipase C, protein kinase Cdelta and NF-kappaB pathway in human synovial fibroblasts. Molecular immunology. 2008;45:3693-3702.

Lee J, Schmid-Schonbein GW. Biomechanics of skeletal muscle capillaries: hemodynamic resistance, endothelial distensibility, and pseudopod formation. Ann Biomed Eng.1995;23:226–246.

Leistad L, Feuerherm AJ, Ostense M, et al. Presence of secretory group IIa e V phospholise A2 and cytosolic group IV phospholipase A2 in condrocytes from patients with rheumathoid arthritis. Clin Chem and Lab Med. 2004;42:602-610.

Lemaire R, Huet G, Zerimech F, et al. Selective induction of the secretion of cathepsins B and L by cytokines in synovial fibroblast-like cells. Br J Rheumatol. 1997;36:735-743.

Leung BP, Culshaw S, Gracie JA, et al. A role for IL-18 in neutrophil activation. J Immunol. 2001;167:2879-2886.

Ley K, Bullard DC, Arbonés ML, et al. Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo. J Exp Med. 1995;181:669-675.

Libbrandt A, Penninger JM. RANKL/RANK as key factors for osteoclast development and bone loss in arthropathies. Adv Exp Med Biol. 2009;649:100-113.

Lomonte B, Gutierrez JM. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo).Toxicon. 1989;27:725-733.

Lomonte B, Tarkowski A, Hanson LÅ. Broad cytolytic specificity of myotoxin II, a lysine-49 phospholipase A2 of *Bothrops asper* snake venom. Toxicon. 1994;32;1359–1369.

Lucas KK, Svensson CI, Hua XY, et al. Spinal phospholipase A2 in inflammatory hyperalgesia: role of group IVA cPLA2. Br J Pharmacol. 2005;144:940-952.

Madhok R, Crilly A, Watson J, Capell HA. Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlations with clinical and laboratory indices of disease activity. Ann Rheum Dis. 1993;52: 32-234.

Magrioto V, Kokotos G. Phospholipase A2 inhibitors as potential therapeutic agents for the treatment of inflammatory diseases. Expert Opin. Ther. Patents. 2010;20:1-18.

Manzo A, Bombardieri M. Humby F, Pitzalis C. Secondary and ectopic lymphoid tissue responses in rheumatoid arthritis: from inflammation to autoimmunity and tissue damage⁄remodeling. J. Mol. Recognit. 2009;22:530–537.

Marcouiller P, Pelletier JP, Guévremont, M, et al. Leukotriene and prostaglandin synthesis pathways in osteoarthritic synovial membranes: regulating factors for interleukin 1beta synthesis. J Rheumatol. 2005;32:704-712.

Martel-Pelletier J, Pelletier JP. Neutral proteases in human osteoarthritic synovium: quantification and characterization. J Rheumatol. 1987;14:38-40.

Masuda Y, Okamoto K. Management and treatment of headache in the pain clinic. Nippon Rinsho. 2005;63:1802-1807.

Mayadas T, Johnson RC, Rayburn H, et al. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. Cell. 1993;74:541-554.

McDougall JJ. Arthritis and pain. Neurogenic origin of joint pain. Arthritis Res Ther. 2006;8:220.

McDougall JJ, Zhang C, Cellars L, et al. Triggering of proteinase-activated receptor 4 leads to joint pain and inflammation in mice. Arthritis Rheum. 2009;60:728-37.

McInnes IB, al-Mughales J, Field M, et al. The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. Nat Med. 1996;2:175-82.

Mello SB, Guzzo ML, Lisboa LF, Farsky SH. Pharmacological characterisation of arthritis induced by *Bothrops jararaca* venom in rabbits: a positive cross talk between bradykinin, nitric oxide and prostaglandin E2. Mediators Inflamm. 2002;11:13-16.

Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM. et al. Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. J Clin Invest. 1996;97:761-768.

Miyaura C. Bone metabolism in aromatase-knockout mice. Clin Calcium. 2003;13:1446-48.

Miyazawa K, Mori A, Okudaira H. IL-6 synthesis by rheumatoid synoviocytes is autonomously upregulated at the transcriptional level. J Allergy Clin Immunol. 1999;103:S437-444.

Mora R, Maldonado A, Valverde B, Gutierrez JM. Calcium plays a key role in the effects induced by a snake venom Lys49 phospholipase A2 homologue on a lymphoblastoid cell line. Toxicon. 2006;47:75-86.

Moreira V, Gutiérrez JM, Soares AM, et al. Secretory phospholipases A2 isolated from *Bothrops asper* and from *Crotalus durissus terrificus* snake venoms induce distinct mechanisms for biosynthesis of prostaglandins E(2) and D(2) and expression of cyclooxygenases. Toxicon. 2008;52:428–439.

Moser R, Schleiffenbaum B, Groscurth P, Fehr J. Interleukin 1 and tumor necrosis factor stimulate human vascular endothelial cells to promote transendothelial neutrophil passage. J Clin Invest. 1989;83:444-455.

Mulherin D, Fitzgerald O, Bresnihan B. Synovial tissue macrophage population and articular damage in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1996;39:115-124.

Murakami M, Kudo I. Diversity and regulatory functions of mammalian secretory phospholipase A2s. Adv Immunol. 2001;77:163-194.

Murrell G A, Jang D, Williams RJ. Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage. Biochem Biophys Res Commun. 1995;206:15-21.

Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. Biol Chem. 1997;378151-160.

Nahir AM, Hoffman A, Lorber M, Keiser HR. Presence of immunoreactive endothelin in synovial fluid: analysis of 22 cases. J Rheumatol. 1991;18:678-680.

Naik SM, Cannon G, Burbach GJ. et al. Human keratinocytes constitutively express interleukin-18 and secrete biologically active interleukin-18 after treatment with pro-inflammatory mediators and dinitrochlorobenzene. J Invest Dermatol. 1999;113:766-772.

Neugebauer V, Schaible HG, Schimidt RF. Sensitization of articular afferents to mechanical stimuli by bradykinin. Pflugers Arch. 1989;415:330-335.

Nishimoto N. Anti-cytokine therapy for intractable hematologic diseases using monoclonal antibodies. Nippon Naika Gakkai Zasshi. 2004;93:390-396.

Nishimoto N, Yoshizaki K, Miyasaka N, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. Arthritis Rheum. 2004;50:1761-1769.

Nunez CE, Angulo Y, Lomonte B. Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase A(2) from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane-damaging activities. Toxicon. 2001;39:1587-1594.

Oka T, Aou S, Hori T. Intracerebroventricular injection of interleukin-1 beta induces hyperalgesia in rats. Brain Res. 1993;624:61-68.

Oliveira RB, Sampaio EP, Aarestrup F. et al. Cytokines and Mycobacterium leprae induce apoptosis in human Schwann cells. J Neuropathol Exp Neurol.2005;64: 882-890.

Olivo RA, Teixeira CF, Wallace JL, et al. Role of cyclooxygenases in oedema-forming activity of bothropic venoms. Toxicon. 2007;49:670–677.

Osaka A. Handbook of Experimental Pharmacology. ELCY. New York: Springer, 1989; 480-546. Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms.

Ownby CL, Selistre de Araujo HS, White SP, Fletcher JE. Lysine 49 phospholipase A2 proteins. Toxicon. 1999;37:411-445.

Pagano RL, Dias MAA, Dale CS, Giorgi R. Neutrophils and the calcium-binding protein MRP-14 mediate carrageenan-induced antinociception in mice. Mediators of Inflammation. 2002;11:203-210.

Palloni A. Histórico e natureza do estudo. OPAS/MS. 2003;15-32.

Palmer RM, Rees DD, Aston DS, et al. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. Biochem Biophys Res Commun. 1988;153:1251-56.

Parada CA, Tambeli CH, Cunha FQ, Ferreira SH. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. Neuroscience. 2001;102:937-44.

Parente L. Pros and cons of selective inhibition of cyclooxygenase-2 versus dual lipoxygenase/cyclooxygenase inhibition: is two better than one? J. Rheumatol. 2001;28:2375–82.

Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. Arthritis Rheum. 2001;44:1237-47.

Picolo G, Cury Y. Peripheral neuronal nitric oxide synthase activity mediates the antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* venom, a *sigma* and *kappa* opioid receptor agonist. Life Sciences. 2004;75:559-73.

Picolo G, Hisada M, Moura AB, et al. Bradykinin- related peptides in the venom of the solitary wasp *Cyphononys fulvognathus*. Biochem Pharmacol. 2010;79:478-86.

Pinto LG, Cunha TM, Vieira SM, et al. IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. Pain. 2010;148:247-56.

Plater-Zyberk C, Joosten LA, Helsen MM, et al. Therapeutic effect of neutralizing endogenous IL-18 activity in the collagen-induced model of arthritis. J Clin Invest. 2001;108:1825-32.

Podesser BK, Sieik DA, Eberli FR. et al. ET(A)-receptor blockade prevents matrix metalloproteinase activation late postmyocardial infarction in the rat. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001;280:H984-991.

Poole AR, Ionescu M, Swan A, Dieppe PA. Changes in cartilage metabolism in arthritis are reflected by altered serum and synovial fluid levels of the cartilage proteoglycan aggrecan. J Clin Invest . 1994;94:25-33.

Pradelles P, GRassi J, Maclouf J. Enzyme immunoassays of eicosanoids using acetylcholine esterase as label: an alternative to radioimmunoassay. Anal Chem. 1985;57:1170-1173.

Pruzanski W, Bogoch E, Katz A. et al. Induction of release of secretory nonpancreatic phospholipase A2 from human articular chondrocytes. J Rheumatol. 1995;22:2114-2119.

Pruzanski W, Vadas P. Phospholipase A2-a mediator between proximal and distal effectors of inflammation. Immunol Today, 1991;12:143-146.

Puren AJ, Razeghi P, Fantuzzi G. et al.. Interleukin-18 (IFNgamma-inducing factor) induces IL-8 and IL-1beta via TNFalpha production from non-CD14+ human blood mononuclear cells. J Clin Invest. 1998;101:711-21.

Queiroz LS, Marques MJ, Santo-Neto H. Acute local nerve lesions induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. Toxicon. 2002;40:1483–1148.

Queiroz LS, Santo-Neto H, Rodrigues-Simioni L, Prado-Franceschi J. Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom. Toxicon. 1984;22:339–46.

Rocha FA, Andrade LE, Russo M. et al. PAF modulates eicosanoids and TNF release in immune-complex arthritis in rats. J Lipid Mediat Cell Signal. 1997;16:1-10.

Rosenberg A. Natural Toxins. Oxford: Pergamon Press; 1986.

Roy-Beaudry M, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, et al. Endothelin 1 promotes osteoarthritic cartilage degradation via matrix metalloprotease 1 and matrix metalloprotease 13 induction. Arthritis Rheum. 2003;48:2855-64.

Ruddy MJ, Shen F, Smith JB, et al. Interleukin-17 regulates expression of the CXC chemokine LIX/CXCL5 in osteoblasts: implications for inflammation and neutrophil recruitment. J Leukoc Biol. 2004;76:135-44.

Ruddy MJ, Wong MJ, Liu XK, et al. Functional cooperation between interleukin-17 and tumor necrosis factor-alpha is mediated by CCAAT/enhancer-binding protein family members. J Biol Chem. 2004;279:2559-67.

Rufini S, Cesaroni P, Desideri A, et al. Calcium ionindependent membrane leakage induced by phospholipase-like myotoxins. Biochemistry. 1992;31:12424–30.

Sack U, Kinne RW, Marx T. et al. Interleukin-6 in synovial fluid is closely associated with chronic synovitis in rheumatoid arthritis. Rheumatol Int. 1993;13:45-51.

Sasaki K, Hattori T, Fujisawa T. et al. Nitric oxide mediates interleukin-1-induced gene expression of matrix metalloproteinases and basic fibroblast growth factor in cultured rabbit articular chondrocytes. J Biochem. 1998;123:431-39.

Saxne T, Heinergard D, Wollheim FA. Cartilage proteoglycans in synovial fluid and serum in patients with inflammatory joint disease. Arthritis Rheum. 1987;30:972-79.

Schaeffer EL, Gattaz WF. Requirement of hippocampal phospholipase A2 activity for long-term memory retrieval in rats. J Neural Transm. 2007;114:379-85.

Schaible HG, Ebersberger A, Von Banchet GS. Mechanisms of pain in arthritis. Ann N Y Acad Sci. 2002;966:343-54.

Schaible HG, Grubb BD. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. Pain. 1993;55:5-54.

Schaloske P. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. Biochim Byophis Acta. 2006;1761:1246-1259.

Schuright U, Stopfel N, Huckel M. et al. Local expression of matrix metalloproteinases, cathepsins and their inhibitors during the development of murine antigen-induced arthritis. Arthritis Res Ter. 2005;7:174-88.

Six DA, Dennis EA. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and chatacterization. Biochim Biophys Acta. 2006;1488:1-19.

Snedecor G, Sokal RR, Rohlf FJ. Statistical methods Biometry. New York: Owa State University Press; 1946.

Sokal R, Rohlf FJ. Biometry. New York: Pergamon Press; 1981.

Soragni E, Bolchi A, Balestrini R, et al. A nutrient-regulated, dual localization phospholipase A(2) in the symbiotic fungus Tuber borchii. EMBO J. 2001;20:5079-90.

Stadler J, Stefanovic-Racic M, Billiar TR. et al. Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. J Immunol. 1991;147:3915-20.

Stone J, Doube A, Dudson D, Wallace J. Inadequate calcium, folic acid, vitamin E, zinc, and selenium intake in rheumatoid arthritis patients: results of a dietary survey. Semin Arthritis Rheum. 1997;27:180-85.

Szekanecz Z, Kim J, Koch AE. Chemokines and chemokine receptors in rheumatoid arthritis. Semin Immunol. 2003;15:15-21.

Tehranzadeh J, Booya F, Root J. Cartilage metabolism in osteoarthritis and the influence of viscosupplementation and steroid: a review. Acta Radiol. 2005;46:288-296.

Teixeira CF, Zamunér SR, Zuliani JP. et al. Neutrophils do not contribute to local tissue damage, but play a key role in skeletal muscle regeneration, in mice injected with *Bothrops asper* snake venom. Muscle Nerve. 2003;28:449-459.

Thurkow EW, van der Heijden IM, Breedveld F.C. et al. Increased expression of IL-15 in the synovium of patients with rheumatoid arthritis compared with patients with Yersinia-induced arthritis and osteoarthritis. J Pathol. 1997;181:444-450.

Tsikas D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2007;851:51-70.

Valentin E, Singer AG, Ghomashchi F, et al. Cloning and recombinant expression of human group IIF-secreted phospholipase A(2). Biochem Biophys Res Commun. 2000;279:223-28.

van de Loo F, Bennink MB, Arntz OJ et al. Deficiency of NADPH oxidase components p47phox and gp91phox caused granulomatous synovitis and increased connective tissue destruction in experimental arthritis models. The American journal of pathology. 2003;163:1525-37.

van Kujik AW, DeGroot J, Koeman RC, et al. Soluble biomarkers of cartilage and bone metabolism in early proof of concept trials in psoriatic arthritis: effects of adalimunab versus placebo. PLoS One. 2010;3:e12556.

van Meurs J, van Lent P, Holthuysen A. et al. Active matrix metalloproteinases are present in cartilage during immune complex-mediated arthritis: a pivotal role for stromelysin-1 in cartilage destruction. J Immunol. 1999;163:5633-39.

van Scharrenburg GJ, Puik WC, Egmond MR. et al.. Effects of substitution of the absolutely invariant glutamine-4 and phenylalanine-5 in bovine pancreatic phospholipase A2 on enzymatic activity and substrate binding properties. Biochemistry. 1982;21:1345-1352.

Verri W.AJr, Cunha TM, Parada CA, et al. Antigen-induced inflammatory mechanical hypernociception in mice is mediated by IL-18. Brain Behav Immun. 2007;21:535-43.

Vincenti MP, Brinckerhoff CB. Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. Arthritis Res. 2002;4:157-64.

Wang JP, Teng CM. Roles of PMN leucocytes, platelets and some mediators in rat hind-paw oedema induced by two phospholipase A2 enzymes from Trimeresurus mucrosquamatus venom. J Pharm Pharmacol. 1992;44:300-305.

Wei XQ, Leung BP, Arthur HM, et al. Reduced incidence and severity of collagen-induced arthritis in mice lacking IL-18. J Immunol. 2001;166:517-521.

World Health Organization. Department of Chronic Diseases and Health Promotion. Chronic Respiratory Diseases and Arthritis (CRA). Geneva: Switzerland; 2010.

Witowski J, Ksiazek K, Jorres A. Interleukin-17: a mediator of inflammatory responses. Cell Mol Life Sci. 2004;61:567-579.

Wood JN, Docherty R. Chemical activators of sensory neurons. Annu Rev Physiol. 1997;59:457-82.

Yamashita, H, ten Dijke P, Huylebroek D, et al. Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects. J Cell Biol. 1995;130:217-226.

Yang Y, Leech M, Hutchinson P, et al. Antiinflammatory effect of lipocortin 1 in experimental arthritis. Inflammation. 1997;21:583-96.

Yamamoto T, Nozaki-Taguchi N. The role of cyclooxygenase-1 and -2 in the rat formalin test. Anestg Analg. 2002;94:962-67.

Yanni G, Whelan A, Feighery C. et al. Synovial tissue macrophages and joint erosion in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 1994;53:39-44.

Yoshida H, Imafuku Y, Ohhara M. et al. Endothelin-1 production by human synoviocytes. Ann Clin Biochem. 1998;35:290-94.

Zambelli VO, Sampaio SC, Sudo-Hayashi LS, et al. Crotoxin alters lymphocyte distribution in rats: Involvement of adhesion molecules and lipoxygenase-derived mediators. Toxicon. 2008;51:1357-67.

Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscius animals. Pain. 1983;16:109-110.

Zucali JR, Dinarello CA, Oblon DJ, et al. Interleukin 1 stimulates fibroblasts to produce granulocyte-macrophage colony-stimulating activity and prostaglandin E2. J Clin Invest. 1986;77:1857-63.

Zuliani JP, Fernandes CM, Zamuner SR, et al. Inflammatory events induced by Lys-49 and asp-49 phospholipases A2 isolated from *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity. Toxicon. 2005;45:335-346.

Zuliani JP, Gutiérrez JM, Casais e Silva LL, et al. Activation of cellular functions in macrophages by venom secretory Asp-49 and Lys-49 phospholipases A2. Toxicon. 2005b;46:523–532.