EDUARDO EKUNDI VALENTIM

**EFEITOS DIFERENCIAIS DO SULFETO DE HIDROGÊNIO EXÓGENO
E ENDÓGENO NA SINOVITE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR
CARRAGENINA EM RATOS WISTAR**

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**

EDUARDO EKUNDI VALENTIM

**EFEITOS DIFERENCIAIS DO SULFETO DE HIDROGÊNIO EXÓGENO
E ENDÓGENO NA SINOVITE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR
CARRAGENINA EM RATOS WISTAR**

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: Profa. Dra. Soraia Katia Pereira Costa

**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 não autorizada pelo autor

Ekundi-Valentim, Eduardo.

Efeitos diferenciais do sulfeto de hidrogênio exógeno e endógeno na sinovite experimental induzida por carragenina em ratos Wistar / Eduardo Ekundi Valentim. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Soraia Katia Pereira Costa.

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

Versão do título para o inglês: Differential effects of hydrogen sulfide exogenous and endogenous in experimental synovitis induced by Carrageenan in Wistar rats.

Descritores: 1. Sulfeto de hidrogênio 2. Sinovite 3. Alodinia tátil 4. Carragenina 5. IL-1 β 6. Ratos I. Costa, Soraia Katia Pereira II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0183/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Eduardo Ekundi Valentim.

Título da Tese: Efeitos diferenciais do sulfeto de hidrogênio exógeno e endógeno na sinovite experimental induzida por carragenina em ratos Wistar.

Orientador(a): Soraia Katia Pereira Costa.

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:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **064** nas fls. **46** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de **Soraia Kátia Pereira Costa** Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Artrite e dimorfismo sexual**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Eduardo Ekundi Valentim, Livia Camargo, Alexandre Denadai Sousa, Rebeca de Almeida**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEa) em **19.06.2007**.

São Paulo, 20 de junho de 2007.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEa - ICB/USP

Prof. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEa - ICB/USP

*Aos meus pais, Fernando e Marta,
e irmãos pelo apoio na minha formação acadêmica.*

*À minha esposa, Ana pela total compreensão e apoio na
longa ausência;*

*À minha filha Eduany, pela ausência nos seus primeiros
meses de vida que tanto exigiam a minha presença.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, pelas oportunidades, amizades e descobertas,

À Profa. Dra. Soraia Costa, por me ter proporcionado o aprendizado que permitiu a realização deste trabalho. Agradeço-a especialmente pela confiança depositada e me ter aceitado como seu orientando. Agradeço também pelos vários momentos de convívio, e pela sempre pronta disponibilidade na busca de soluções às várias intercorrências mesmo não relacionadas diretamente com a atividade de pesquisa. Soraia, meu eterno agradecimento por tudo, e que este vínculo criado perdure gerando ainda mais frutos...

Ao Prof. Dr. Marcelo Muscará, pelo acompanhamento desde o ingresso no programa até a conclusão deste trabalho. Na prática, o considero co-orientador, com seu rigor e conhecimentos analíticos, norteou o meu aprendizado na padronização da técnica para medida de sulfeto e, atividades das enzimas responsáveis pela geração deste gás. Além disso, suas críticas e sugestões foram fundamentais para o enriquecimento deste trabalho. Marcelo, muito obrigado por tudo...

À Dra. Simone Teixeira, pela competência e paciência no ensino e supervisão dos ensaios bioquímicos, além da amizade e companheirismos ao longo destes anos,

À direção do Instituto Superior de Ciências de Saúde da Universidade Agostinho Neto (Angola), e em especial, à sua Decana Profa. Maria Silva e o Vice Decano para área Científica o Prof. Dr. Manuel Simão, pelo apoio financeiro e incentivo sem os quais a conclusão deste trabalho seria completamente impossível,

Ao Ministério do Ensino Superior Ciência e Tecnologia da República de Angola, que através do Instituto Nacional de Bolsas de Estudo (INABE), financiou parcialmente esta formação,

Aos Profs. Drs. Carol Munhoz e Cristóforo Scavone do Departamento de Farmacologia do ICB que gentilmente auxiliaram na obtenção dos dados relacionados à ativação das vias do NF- κ B e AP-1,

Ao Sr. Dayson Moreira e Prof. Dr. José Belizário do Departamento de Farmacologia do ICB pelo auxílio na avaliação da atividade proteolítica da enzima conversora de IL-1 β ,

À Dra. Fabíola Mônica do Departamento de Farmacologia da UNICAMP que gentilmente nos cedeu os anticorpos que permitiram avaliar a expressão proteica das enzimas geradoras de sulfeto no tecido articular,

Aos Drs. Enilton Camargo, Denadai Souza e Simone Bolonheis pelas contribuições a este trabalho,

À Maria Alice e Irene Gouveia pelo treinamento no manuseio de animais, e pela ajuda em todos os experimentos *in vivo*,

Ao Leandro Rodrigues, Karen Tiago e Cristiane Ramos que participaram diretamente ajudando nos experimentos. Aos colegas de luta Juliana Florenzano, Marcos de Paula, Rodrigo Porto, Paula Campi, Aline Dantas, Viviane e Edira Alfama pelo espírito de interajuda, e os inúmeros momentos de descontração e partilha dos ensinamentos adquiridos,

A todos aqueles que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização desta tese, o meu agradecimento.

*"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis."*

Bertolt Brecht

RESUMO

EKUNDI-VALENTIM, E. **Efeitos diferenciais do sulfeto de hidrogênio exógeno e endógeno na sinovite experimental induzida por carragenina em ratos wistar**. 2010. 116 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O poluente ambiental sulfeto de hidrogênio (H_2S) é também produzido endogenamente em mamíferos, onde é capaz de modular a inflamação. Este estudo se propôs a avaliar o papel do H_2S , administrado exogenamente, e produzido endogenamente na sinovite induzida pela injeção intra articular (i. art.) de carragenina (CGN) no joelho de ratos Wistar machos (250 g), e os possíveis mecanismos envolvidos. Ratos foram tratados (-60 min) com a indometacina, o inibidor da cistationina γ -liase DL-propargilglicine (PGly) ou o doador de H_2S , o reagente de Lawesson (LR), e os parâmetros funcionais e bioquímicos da sinovite foram avaliados após 4h. Os animais com sinovite exibiram dor, alodinia e edema articular no joelho ipisilateral associado ao número elevado de neutrófilos, aumento das atividades de MPO, iNOS (produção NO_x^-), caspase-1 e via do NF- κ B. Ainda, nitração de resíduos protéicos (3-NT) e aumento da IL-1 β foram mensurados no joelho dos animais. O LR (ou indometacina) reduziu significativamente a nocicepção (alodinia secundária) e todos os parâmetros inflamatórios e bioquímicos, exceto a maior atividade da iNOS, NO_x^- e 3-NT. O tratamento com a PGly não afetou a inflamação e dor, mas aumentou o número de macrófagos e as atividades da iNOS (produção NO_x^-) e AP-1. Conclui-se que, enquanto a administração exógena do doador de H_2S produz efeitos antiinflamatórios e anti-nociceptivos, o H_2S produzido endogenamente exerce pouco efeito imunomodulatório neste modelo. Estes dados reforçam a idéia do desenvolvimento e uso de doadores de H_2S como potenciais ferramentas terapêuticas (ou complementares) dos fármacos disponíveis para o tratamento da artrite ou seus sintomas.

Palavras chaves: Sulfeto de hidrogênio. Sinovite. Carragenina. Alodinia tátil secundária. IL-1 β . CSE. CBS. Rato.

ABSTRACT

EKUNDI-VALENTIM, E. **Differing effects of exogenous and endogenous hydrogen sulfide in carrageenan- induced Knee joint synovitis in the wistar rat.** 2010. 116 p. Ph. D. thesis (Pharmacology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

The noxious gas H₂S is produced endogenously, and the physiological concentrations of H₂S are able to modulate pain and inflammation in rodents. The aim of this study was to evaluate the effects of exogenous and endogenous H₂S in inflammatory response on knee joint of rats induced by intra articular injection of carrageenan (CGN) and the possible mechanisms involved in this process. Synovitis was induced in Wistar rats by intra-articular injection of carrageenan (CGN) into the knee joint. Sixty minutes prior to CGN injection, the rats were pretreated with indomethacin, an inhibitor of H₂S formation PGly (DL-propargylglycine) or an H₂S donor LR (Lawesson's reagent). Injection of CGN evoked knee inflammation, pain as characterized by impaired gait, secondary tactile allodynia of the ipsilateral hindpaw, joint swelling, histological changes, inflammatory cell infiltration, increased synovial myeloperoxidase, protein nitrotyrosine residues, inducible NOS (iNOS) activity and NO production, proteolytic activity of interleukin 1 converting enzyme, NF-κB activation. Pretreatment of rats with LR or indomethacin significantly attenuated the pain responses, and all the inflammatory and biochemical changes, except for the increased iNOS activity, NO production and 3-NT. Propargylglycine pretreatment potentiated synovial iNOS activity (and NO production), enhanced macrophage infiltration, and AP-1 activation, but had no effect on other inflammatory parameters. Whereas exogenous H₂S delivered to the knee joint can produce a significant anti-inflammatory and anti-nociceptive effect, locally produced H₂S exerts little immunomodulatory effect. These data support the development and use of H₂S donors as potential alternatives (or complementary therapies) to the available anti-inflammatory compounds used for treatment of joint inflammation or relief of its symptoms.

Keywords: Hydrogen sulfide. Synovitis. Carrageenan. Tactile secondary allodynia. IL-1β. CSE. CBS. Rat.

LISTA DE ABREVIATÖES

AAR -	artrite reumatóide
AFC -	amino-4-trifluorometil cumarina
ATF-2 -	fator 2 ativador de transcriçãõ
AINES	antiinflamatório não esteróide
Akt -	proteína kinases B
AP-1 –	proteína 1 ativadora
CBS -	cistationina-β-sintase
CMC -	carboximetilcelulose
CSE -	cistationina-γ-lyase
CO -	monóxido de carbono
CH ₄ S -	metanetiol
CH ₃ SCH ₃ -	dimetilsulfeto
CGN -	Carragenina
CHH –	o-carboximetil-hidroxilamina – hemihidratado
CHAPS -	3 [(3-Colamidopropil) - dimetilamônio] -1-propanosulfato
CRD -	distensão colorrectal
COX-2 -	Clooxigenase 2
cNOS -	óxido nítrico sintase constitutiva
DMARDs -	drogas antireumáticas que modificam a doença
DTT –	1,4 -ditiotreitól
EGTA -	ácido etileno glicol tetra acético

EDTA -	ácido etilenodiamino tetraacético
ERK -	proteína kinase regulada por sinal extracelular
FAD -	flavina adenina dinucleotídeo
FR -	fator reumatóide
FeCl ₃ -	cloreto férrico
GY4137 –	ácido fosfina dióico p-metoxifenil morfolino
H ₂ S -	Sulfeto de hidrogênio
HEPES -	ácido 2- [4- (2-hidroxietil)-1-piperazinil] etanesulfônico
HCl -	ácido clorídrico
HSP-27 -	proteína 27 do choque térmico
H&E -	hematoxilina e eosina
i. art. -	intra-articular
ICAM-1 -	molécula de adesão intercelular 1
IL-1 -	interleucina-1
IL-6 -	interleucina-6
IL-10 -	interleucina - 10
iNOS -	óxido nítrico sintase induzida
IgG -	imunoglobulina do tipo G
JNK –	proteína janus quinase
K ₂ PO ₄ -	fosfato de potássio
KCl -	cloreto de potássio
LPS -	lipopolisacarídeo

LR -	reagente de Lawesson
MPO -	mieloperoxidase
MPST -	β - mercapto-piruvato-cianeto-sulfotransferase
MAPK -	proteína quinase ativada por mitógeno
MgCl ₂ -	cloreto de magnésio
NaCl -	cloreto de sódio
NaOH -	hidróxido de sódio
NO -	óxido nítrico
NOS -	óxido nítrico sintase
NO _x - -	nitrito e nitrato
NaHS -	hidrosulfeto de sódio
Na ₂ S -	sulfeto de sódio
NF- κ B -	fator de transcrição nuclear κ appa B
NADPH -	nicotinamida adenina dinucleotídio
PBS -	tampão fosfato salina
PGly -	DL-propargilglicina
PKC –	proteína C quinase
PRC –	proteína C reativa
PGE ₂ -	prostaglandina E2
PMSF -	fenil-metil-sulfonil-fluoridro
PI3K -	fosfoinositol 3-quinase
RNA _m -	ácido ribonucléico mensageiro

SO_3^{2-} -	Sulfito
SO_4^{2-} -	sulfato
$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ -	tiossulfato
SOD -	superóxido dismutase
SOCS –	proteína supressora de sinalização de citocinas
STAT –	proteína transdutora de sinal e ativadora da transcrição
TSMT –	tiol-S-metiltransferase
$\text{TNF-}\alpha$ -	fator de necrose tumoral - alfa
TRIS –	tris(hidroximetil) aminometano
TBS-t –	tampão tris salina tween-20
VSE -	velocidade de sedimentação eritrocitária
6-OHDA -	6- hidroxidopamina
3-NT -	3-nitrotirosina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Artrite Reumatoide. Vista esquemática de uma articulação-----	24
Figura 2.	Mecanismos principais de síntese e metabolismo do H ₂ S-----	30
Figura 3.	Curso temporal do edema articular e resposta nociceptiva em ratos com sinovite induzida pela carragenina-----	53
Figura 4.	Efeito do tratamento com o reagente de Lawesson e DL-Propargilglicina sobre o escore de dor, hiperalgesia e edema articular induzida pela carragenina-----	55
Figura 5.	Efeito do tratamento com o LR e PGly sobre o influxo de leucócitos na cavidade articular-----	57
Figura 6.	Microfotografias de articulação do joelho de ratos coradas com hematoxilina & eosina, capturadas sob a luz microcópica-----	59
Figura 7.	Efeito do tratamento com reagente de Lawesson e DL-Propargilglicina sobre o escore histológico-----	60
Figura 8.	Efeito do tratamento com o reagente de Lawesson e DL-Propargilglicina sobre a celularidade na medula óssea-----	62
Figura 9.	Efeito do tratamento com o reagente de Lawesson e DL-Propargilglicina sobre a celularidade no sangue-----	64
Figura 10.	Efeito do tratamento com o reagente de Lawesson e DL-Propargilglicina sobre a atividade da enzima conversora de IL-1 β na membrana sinovial-----	67
Figura 11.	Efeito do tratamento com o reagente de Lawesson e DL-Propargilglicina sobre a concentração de a atividade da NO sintase na membrana sinovial-----	69
Figura 12.	Efeito do tratamento com o reagente de Lawesson e DL-Propargilglicina sobre o conteúdo 3-NT no homogenato de membrana sinovial-----	71
Figura 13.	Efeito do tratamento com o reagente de Lawesson e DL-Propargilglicina sobre a ativação do NF- κ B no homogenato de membrana sinovial-----	73

Figura 14. Efeito do tratamento com o reagente de Lawesson e DL-Propargilglicina sobre a ativação da AP-1 no homogenato de membrana sinovial-----	75
Figura 15. Efeito do tratamento com o reagente de Lawesson e DL-Propargilglicina sobre a concentração de sulfeto total no lavado sinovial e plasma-----	77
Figura 16. Cinética de liberação de sulfeto total pelo reagente de Lawesson na cavidade articular de ratos saudáveis-----	78
Figura 17. Cinética das atividades enzimática da CSE e CBS na membrana sinovial de ratos saudáveis-----	80
Figura 18. Efeito do tratamento com o reagente de Lawesson e DL-Propargilglicina sobre a geração de H₂S in vitro na membrana sinovial de ratos com sinovite-----	81
Figura 19. Efeito do tratamento com o reagente de Lawesson e DL-Propargilglicina sobre a expressão proteica das enzimas CSE e CBS na membrana sinovial de ratos com sinovite-----	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Grupos experimentais-----	38
Tabela 2 -	Efeito dos tratamentos com reagente de Lawesson e DL-Propargilglicina sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO), concentrações de citocinas, e NO_x⁻ no lavado sinovial de ratos com sinovite evocada por injeção i.art de CGN-----	66

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	<i>Considerações gerais.....</i>	23
1.1.1	<i>Inflamação articular e modelos experimentais.....</i>	23
1.1.2	<i>Terapia farmacológica da artrite</i>	26
1.2	<i>Sulfeto de hidrogênio (H₂S): biossíntese e catabolismo</i>	28
1.3	<i>Implicações do H₂S (exógeno e endógeno) na inflamação</i>	32
1.4	<i>Justificativa do estudo.....</i>	34
1.5	<i>Objetivo e estratégias</i>	35
2	MATERIAS E MÉTODOS.....	37
2.1	<i>Animais</i>	38
2.2	<i>Delineamento experimental.....</i>	38
2.3	<i>Indução da inflamação articular aguda pela carragenina (sinovite).....</i>	39
2.4	<i>Avaliação da inflamação articular (edema)</i>	39
2.5	<i>Avaliação do comportamento nociceptivo.....</i>	39
2.6	<i>Coleta do lavado sinovial e análise do número de células</i>	40
2.7	<i>Obtenção e quantificação celular no sangue periférico</i>	41
2.8	<i>Obtenção da medula óssea, preparo e quantificação celular.....</i>	41
2.9	<i>Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)</i>	42
2.10	<i>Análise histopatológica</i>	42
2.11	<i>Quantificação dos níveis de citocinas no fluido sinovial</i>	43
2.12	<i>Avaliação da atividade da caspase-1 na membrana sinovial.....</i>	44
2.13	<i>Avaliação da atividade de NOs no tecido articular ex-vivo.....</i>	44
2.14	<i>Dosagem de nitrito/nitrato (NO_x -) no lavado articular.....</i>	45
2.15	<i>Análise da expressão protéica de 3 - nitrotirosina por Slot blot.....</i>	46
2.16	<i>Avaliação de expressão protéica por Western Blot</i>	46

2.17	Ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética (Gel-shift) para os fatores de transcrição NF-κB e AP-1 na membrana sinovial.....	48
2.18	Dosagem de sulfeto total no lavado articular e plasma.....	48
2.19	Cinética de liberação do sulfeto total pelo LR na articulação do joelho de ratos.....	49
2.20	Determinação da atividade enzimática da CSE e CBS no joelho.....	49
2.21	Análise estatística.....	50

3 RESULTADOS51

3.1	Avaliação dos parâmetros inflamatórios e nociceptivos	52
3.1.1	Avaliação temporal do edema articular e do efeito doloroso na sinovite induzida pela injeção i.art da CGN em joelho de ratos.....	52
3.1.2	Avaliação clínica: dor e edema articular.....	54
3.1.3	Efeito do doador e inibidor da produção de H ₂ S sobre o recrutamento de leucócitos (e atividade de MPO) na cavidade articular em ratos com sinovite	56
3.1.4	Análise histológica	58
3.1.5	Efeito do doador e inibidor da produção de H ₂ S sobre a celularidade na medula óssea de ratos com sinovite	61
3.1.6	Avaliação da celularidade no sangue periférico de animais com sinovite na ausência e vigência do LR, indometacina e PGly	63
3.2	Avaliação de parâmetros bioquímicos.....	65
3.2.1	Produção de citocinas no lavado articular de ratos com sinovite na ausência e presença de doador e inibidor de H ₂ S.....	65
3.2.2	Avaliação da atividade da enzima conversora de IL-1 β (Caspase-1).....	67
3.2.3	Avaliação da atividade da enzima cNOS e iNOS no tecido sinovial de ratos com sinovite na ausência e presença do doador e inibidor do H ₂ S	68
3.2.4	Efeitos do doador e inibidor do H ₂ S sobre a concentração de NO _x no lavado sinovial de ratos com sinovite	70
3.2.5	Efeitos do doador e inibidor do H ₂ S sobre a nitração de proteínas (3-NT) na membrana sinovial de ratos com sinovite.....	70
3.2.6	Efeitos do doador e inibidor do H ₂ S sobre a ativação do NF- κ B na membrana sinovial de ratos com sinovite	72
3.2.7	Efeitos do doador e inibidor de H ₂ S sobre a ativação da AP-1 na membrana sinovial de ratos com sinovite	74
3.2.8	Efeitos dos tratamentos com o doador e inibidor do H ₂ S sobre a concentração de sulfeto total no lavado articular e plasma de ratos com sinovite.....	76
3.2.9	Cinética de liberação de sulfeto total pelo LR no de joelho de ratos naive	78
3.2.10	Determinação da cinética de atividade das enzimas geradoras de sulfeto no tecido articular de ratos naive	79
3.2.11	Determinação da atividade das enzimas geradoras de sulfeto na membrana sinovial de ratos com sinovite	81
3.2.12	Avaliação da expressão proteica das enzimas geradoras de sulfeto no tecido articular ..	82

4	DISCUSSÃO	84
5	CONCLUSÕES	97
	REFERÊNCIAS.....	99
	ANEXO - Differing effects of exogenous and endogenous hydrogen sulfide in carrageenan- induced knee joint synovitis in the rat.....	116

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

1.1.1 Inflamação articular e modelos experimentais

Em geral, as articulações podem ser classificadas em sinartrose (sem movimentos), anfiartroses (movimentos reduzidos) e as diartroses (movimentos amplos / extensos), sendo esta última a de maior importância clínica por constituir-se alvo predileto para a inflamação articular (artrite).

Em mamíferos, a articulação do joelho é formada pela extremidade distal do fêmur, a extremidade proximal da tíbia e a patela (rótula). Essa estrutura compreende ainda as cápsulas (externa e interna) e ligamentos que estabilizam a articulação em conjunto com os meniscos, que estabilizam os joelhos e amortecem o impacto sobre as cartilagens (Figura 1); (ELLIS et al., 2005; KUMAR et al., 2010).

Morfologicamente a cápsula articular externa possui estrutura fibrosa rica em fibras colágenas espessas, enquanto a cápsula articular interna caracteriza-se como uma estrutura altamente flexível, que forma o principal tecido intracapsular e apresenta três camadas: uma íntima (também chamada de militante), a qual elabora o líquido sinovial (ultrafiltrado de plasma), que contém o ácido hialurônico e exerce a importante função de diminuir o atrito das cartilagens durante os movimentos, a camada subíntima, que é amplamente vascularizada e, por fim, a camada externa ou subsinovial, a qual estabelece o limite com a cápsula fibrosa (ELLIS et al., 2005; SKARE, 2007). A camada íntima da membrana sinovial possui dois tipos principais de células: as células do tipo A, semelhantes aos macrófagos, que exibem vários lisossomos e vesículas micropicnóticas e, as células do tipo B, que se assemelham aos fibroblastos (SKARE, 2007).

As células da membrana sinovial não estão limitadas por uma membrana basal verdadeira e repousam numa matriz rica em fibras colágenas e proteoglicanos (SKARE, 2007). Em relação à vascularização, existem complexas redes arteriais e venosas que formam múltiplas fístulas, as quais se comunicam com o suprimento vascular do periósteo e do osso periarticular. A área do leito capilar sinovial é espessa e desempenha papel fundamental na troca de moléculas. Os capilares sinoviais são dotados de fenestrações cobertas por uma membrana fina que facilita a troca de pequenas moléculas com o líquido sinovial. O suprimento nervoso articular é duplo e compreende nervos, que são responsáveis pela inervação da

articulação e músculos, que circundam a articulação do joelho (ELLIS et al., 2005; SKARE, 2007).

Figura 1. Artrite reumatoide. Vista esquemática de uma articulação
Fonte: Modificado de Kumar et al. (2010).

É de conhecimento que a estabilidade da articulação é o resultado de uma articulação saudável. Desta feita, as alterações das articulações e dos seus componentes (exemplo: cartilagens, tendões, músculos e ossos etc.) causadas por lesões mecânicas (fratura), biológicas (geralmente infecções causadas por bactérias ou vírus) ou por um tipo de doença autoimune, que se caracteriza pela presença de reações imunológicas contra os próprios tecidos das articulações (artrite reumatóide), podem levar à inflamação (aguda ou crônica) e subsequente disfunção dessas estruturas como um todo ou de componentes isolados.

De acordo com a estrutura anatômica afetada, a terminologia do processo inflamatório pode variar. Assim sendo, temos que o processo inflamatório da membrana sinovial, independentemente da etiologia, recebe a expressão sinovite (KUMAR et al., 2010). É importante acrescentar que a sinovite é um processo inflamatório, o qual é sabidamente conhecido como uma resposta protetora do organismo, caracterizada por sinais cardinais como rubor, calor, edema e dor.

Os sinais cardinais da inflamação são ferramentas valiosas na monitoração da evolução de um processo inflamatório, o qual é também um fenômeno imunológico. Por exemplo, a artrite reumatóide (AR) é uma doença sistêmica autoimune (crônica e inflamatória), que afeta principalmente as articulações, cuja etiologia é desconhecida e para qual não existe ainda a cura. Estima-se que, aproximadamente, 1% a 2% da população mundial (cerca de 60 a 120 milhões de indivíduos) são acometidos pela AR, sendo as mulheres três a cinco vezes mais afetadas do que os homens, independentemente da raça (SYMMONS et al., 2002). Essa patologia desenvolve-se de forma simétrica nas articulações das mãos, punhos e tornozelos em qualquer faixa etária (WALSH et al., 2005), muito embora predomina-se a faixa etária entre os 40 e 70 anos de idade (FIRESTEIN, 2005; KVIEN e UHLIG, 2006). Pelo fato de acometer principalmente os membros, a AR é considerada uma doença líder de incapacidade física, causando assim sério impacto sócio-econômico (YELIN, 1996; COOPER, 2000).

A AR é uma doença imunológica complexa, que envolve numerosas células do sistema imunológico e as consequências do mal funcionamento deste. Caracteriza-se por distúrbios regulados pelas células T e B (KLARESKOG et al., 2009) e grande aumento na gênese e ativação de citocinas (fator de necrose tumoral, interleucinas 1 β e 6); (CHOY e PANAY, 2001; SILVERMAN et al., 2003), quimiocinas e proteinases, que contribuem para a amplificação da resposta inflamatória e sua interação com as células do hospedeiro, i.e. fibroblastos, condrócitos e osteoclastos, que resulta em alterações nas articulações, tais como a formação do *pannus* invasivo, que leva à destruição do osso e da cartilagem (CONNELL e MCINNIS, 2006).

Na pesquisa farmacológica experimental com a finalidade de se estudar os mecanismos fisiopatológicos que medeiam à artrite e o consequente delineamento de novos agentes terapêuticos, vários modelos experimentais mimetizando a artrite humana foram desenvolvidos ao longo dos anos (para revisão: BENDELE et al., 1999). Esses podem ser divididos em crônicos e agudos: existem três principais modelos de artrite crônica em roedores, que são amplamente usados tais como artrite induzida por adjuvante (PEARSON et al., 1963), artrite induzida por colágeno (TRENTAN et al., 1978) e artrite induzida por antígeno (BRACKERTZ et al., 1977). Quanto aos modelos agudos, destacam-se a monoartrite e / ou sinovite induzida por

carragenina (CGN); (GARDNER et al., 1960), um mucopolissacarídeo sulfatado extraído das algas marinhas *Clondrus* spp. e *Gigartina* spp., também conhecida como Irish Moss ou CGN moss. A estrutura química consiste em resíduos sulfatados de galactose unidos por ligações α 1-3 e β 1-4, onde os locais e extensão das sulfatações e cadeias secundárias variam entre os tipos kappa, lambda e iota. Ademais, outros exemplos de artrite aguda podem ser observadas pela administração articular da mistura de CGN e kaolin (YANG et al., 1996), zimosan (FOLLIARD e TERLAIN, 1988) e, ainda, por injeções de venenos e toxinas ofídicos (MELLO et al., 2002; FERNANDES et al., 2007).

A injeção intra articular (i.art) de CGN isolada desencadeia um quadro agudo de sinovite mono articular (GARDNER et al., 1960), cujas alterações articulares mimetizam alguns dos sinais / sintomas da AR, incluindo o edema (extravasamento plasmático), a dor, infiltração leucocitária e alterações morfológicas e bioquímicas da sinóvia. Contudo, esse modelo tem a particularidade de não ser imunológico, pois sua ação parece inicialmente resultar da incapacidade dos macrófagos degradarem as partículas de CGN. Isto culmina no acúmulo dessas no interior dos lisossomos e, conseqüentemente, leva ao processo inflamatório seguido de morte celular (VINEGAR e SCHREIBER, 1969). Portanto, a ativação das células T não parece ser fator importante nos eventos iniciais desse modelo de inflamação articular, muito embora é sabido que estas células desempenham um papel crucial na AR (FOX et al., 1997).

1.1.2 Terapia farmacológica da artrite

Apesar de lentos, avanços na compreensão da patogenia da AR têm ocorridos na identificação de fatores de risco, tais como fatores genéticos associados (ou não) à variações entre etnias (HUGHES et al., 2008; DAHA et al., 2009) e na terapia farmacológica.

A AR constitui-se numa patologia de progressão importante e com grande variabilidade entre indivíduo. Portanto, a intervenção farmacológica imediata faz-se necessária, pois a destruição articular nesses pacientes começa na fase inicial da doença (EMERY et al., 2008). Esse tratamento farmacológico tem como objetivos principais, controlar os sintomas de dor e rigidez articular, melhorando assim a

função e qualidade de vida dos pacientes, e minimizando o risco de lesão estrutural mediante a redução da inflamação (TAYAR e SUAREZ-ALMAZOR, 2010).

Até o presente momento, o controle parcial dos sintomas da artrite é usualmente feito com antiinflamatórios não esteróides (AINES) e / ou com baixas doses de glicocorticóides (*AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY*, 2002). Ademais, numa grande população de pacientes com artrite, a coadministração de drogas antirreumáticas modificadoras da doença (DMARDs; metotrexato) é necessária para inibir a progressão da doença. É importante acrescentar que, recentemente, uma mudança de paradigma no controle dessa doença vem ocorrendo com a introdução dos agentes biológicos bloqueadores de citocinas ou de seus receptores. Dentre estes, incluem-se os agentes biológicos inibidores das citocinas TNF- α (ex.: infliximab, etanercept, adalimumab, golimumab, e certolizumab) e IL-6 (tocilizumab; NORIHIRO et al., 2007). Além disto, foram introduzidos os antagonistas do receptor de IL-1 (ex.: anakinra); (KARY e BURMESTER, 2003), e do linfócito T citotóxico associado ao antígeno 4 imunoglobulina (ex.: abatacept; MARK et al., 2005) e dos anticorpos anti-CD-20 (ex.: rituximab) ; (JONATHAN et al., 2004)

É de conhecimento que a IL-1 β é liberada de monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas como pró-molécula inativa (WATANABE, 2007), a qual precisa ser clivada (Tyr-Val-His-Asp116/Ala117), pela cisteína-protease denominada caspase-1 (conhecida como enzima conversora de IL-1 β), para ser liberada na sua forma ativa (DINARELLO et al., 2000). Dentre as implicações dessa citocina na artrite, destacam-se a indução do influxo leucocitário na cavidade articular, da hiperplasia e formação do *pannus* invasivo. Esse mediador promove também o aumento na produção de collagenase por células sinoviais e de metaloproteinases por condrócitos (PETTIPHER et al., 1986; ROUX-LOMBARD et al., 1992), contribuindo fortemente para a destruição da cartilagem e do osso.

A ligação da IL-1 β com seu receptor do tipo um (IL-1RI) resulta na ativação das vias de sinalização, capazes de elevar a concentração de cálcio intracelular, ativar as proteínas quinases do tipo C (PKC) e as ativadas por mitógeno (MAPK), além dos fatores de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) e da proteína estimuladora de ligação (AP-1); (BRADDOCK et al., 2004). Semelhantemente a IL-1 β , o TNF - α causa ativação de células endoteliais e do sistema imunológico (IKUTA et al., 1991; MEEKINS et al., 1994). Isto culmina em aumento da expressão de moléculas de

adesão na microcirculação, as quais aumentam o recrutamento de outras células para o foco inflamatório bem como estimulam a biossíntese de outras citocinas, como a IL-6, que está intimamente relacionada à reação de fase aguda, aumento da velocidade de sedimentação eritrocitária e, em particular, na elevação da proteína C-reativa (PRC), um marcador inflamatório importante (SNICK, 1990; KOPF et al., 1994).

Por seu turno, em pacientes sob tratamento com os agentes biológicos evidências mostram que estes exibiram maior incidência do risco de infecções oportunistas (ex: tuberculose); (KROESEN et al., 2003) e câncer de pulmão (WEINBLATT et al., 2006) e pele (GARTLEHNER, 2006). Ademais, quadros exacerbados de hepatite crônica foram diagnosticados nesses indivíduos (ESTEVE et al., 2004; WENDLING et al., 2005; GOMEZ-REINO e CARMONA, 2006). Apesar dos avanços farmacológicos com a terapia biológica, a identificação de pacientes refratários a tal terapia, que adicionada ao custo elevado dos agentes biológicos, acabam limitando este tipo de tratamento a uma grande população de indivíduos em todo mundo (PENG-THIM e KENG-HONG, 2007). Por conseguinte, a descoberta e delineamento de novos candidatos alternativos e / ou complementares para a terapia da AR ainda se faz necessário. Nesse sentido, estudos mostram que banhos em águas sulfuradas promovem efeito antioxidante sobre eritrócitos obtidos de pacientes com AR (WOZAKOWSKA-KAPŁON et al., 2006), além de exercerem efeitos antiinflamatórios em pacientes com osteoartrite, pois estimulam a resposta imunológica destes (IBADOVA et al., 2005).

1.2 Sulfeto de hidrogênio (H_2S): biossíntese e catabolismo

Historicamente, os efeitos tóxicos do gás sulfídrico (H_2S) no meio ambiente, cujo odor característico assemelha-se muitas vezes a ovos podres, são bem conhecidos (NICHOLLS, 1975; REIFFENSTEIN et al., 1992). Recentemente, juntamente com o óxido nítrico (NO) e o monóxido de carbono (CO), os efeitos fisiológicos do H_2S vêm sendo amplamente estudados devido sua recente nomeação como o terceiro gasotransmissor endógeno de importância farmacológica (SZABO, 2007; LOWICKA e BELTOWISKY, 2007).

Em geral, sua produção no meio ambiente decorre pela decomposição de materiais orgânicos, produção do gás natural e petróleo, atividade vulcânica, na rede de tratamento de esgotos e em mais de 70 tipos de produção industrial, dentre elas a produção de fibra sintética, de alimentos, de papel, cerâmica e reciclagem de lixo (DONHAM et al., 1982; HOIDAL et al., 1986; JAAKKOLA et al., 1990; HALL e RUMACK, 1997; WATT et al., 1997). Cabe ressaltar que nesses ambientes de trabalho, a exposição involuntária demasiada de indivíduos ao H₂S, além de tóxica pode ser letal (ARNOLD et al., 1985; KILBURN, 1993; GUIDOTTI, 1994), pois esse gás possui a capacidade de inibir a cadeia de elétrons na mitocôndrias, resultando no bloqueio da enzima citocromo C oxidase (KHAN et al., 1990; DORMAN et al., 2002). Como consequência, tecidos com alta demanda de oxigênio, como o cérebro e coração, podem sofrer graves transtornos do metabolismo oxidativo (AMMANN, 1986).

A biossíntese do H₂S em tecidos de mamíferos é catalizada pelas enzimas cistationina γ liase (tambem conhecida como cistationase; CSE; E.C. 4.4.1.1), cistationina β -sintetase (CBS; E.C. 4.2.1.22) ou pela MPST (β - mercapto-piruvato-cianeto-sulfotransferase); (STIPANUK e BECK, 1982; ERICKSON et al., 1990). As enzimas CSE e CBS utilizam o 5-fosfato de piridoxal (vitamina B6) como co-fator, enquanto a MPST é dependente de zinco (JULIAN et al., 2002). Essas enzimas distribuem-se de forma ampla e diferenciada no organismo. Enquanto no sistema nervoso central de mamíferos a CBS é expressa, aproximadamente, 30 vezes mais do que a CSE (AWATA et al., 1995), tanto no fígado como no rim, destaca-se principalmente a expressão da CSE (STIPANUK e BECK, 1982; ZHAO et al., 2001).

A síntese endógena do H₂S em mamíferos depende da transsulfuração do aminoácido L-metionina e do metabolismo da homocisteína, um aminoácido sulfidrílico que ocupa uma posição regulatória central no metabolismo da metionina, e que está presente no plasma, nas formas reduzida (1%) e oxidada (98 a 99%) (BRUGADA e MARIAN, 1997). A homocisteína reage com a serina em reação catalisada pela CBS formando a cistationina, que é subsequentemente hidrolisada, pela CSE, em cisteína, gerando ainda os produtos amônia e cetobutarato. A cisteína pode ser também hidrolisada pela CBS, formando o H₂S e o produto L-serina ou, em reação de hidrólise catalisada pela CSE, pode gerar o H₂S e os seus produtos piruvato e amônia (Figura 2).

Outra possível via alternativa para a geração do H_2S envolve a catálise da cistina (Cis-S-Cis), pela CSE, em tiocisteína, a qual é subsequentemente hidrolisada, pela CSE, em cisteína e H_2S (HUGES et al., 2009). Paralelamente, vias distintas de biossíntese de H_2S vêm sendo sugeridas na literatura, incluindo a via da reação do 3-mercapto-sulfurtransferase (MPST). Nesta, a cisteína reage com o cetoácido formando o 3-mercaptopiruvato, que sofre subsequente dissulfuração pela MPST, gerando o H_2S e o piruvato (JULIAN et al., 2002; SHIBUYA et al., 2009;). Além disso, a CBS catalisa a reação no tiol da cisteína, formando o S-tiolato (Cis-S-R) concomitantemente com a geração de H_2S . Todavia, a maioria dos estudos sugere que o H_2S é sintetizado, principalmente, pelas vias da CSE e CBS, sendo as demais enzimas menos importantes na biossíntese desse mediador.

Figura 2. Mecanismos de síntese e metabolismo do H_2S *in vivo*

Fonte: Adaptado de Whiteman e Moore (2009).

O gene humano que codifica a CSE está localizado no braço curto do cromossomo 1 (1p31.1) e, até o presente momento, pelo menos duas variantes de RNAm para CSE foram caracterizadas. Contudo, a função específica destas na síntese de H_2S ainda é pouco conhecida (GE et al., 2001). Da mesma forma, o gene que codifica a enzima CBS, localizado no cromossomo 21 (21q22.3), também codifica vários RNAm. No entanto, a função destas isoformas na biossíntese de H_2S é desconhecida (MÜNKE et al., 1988). Da mesma maneira, o catabolismo do H_2S

produzido endogenamente é pouco compreendido, e a maioria das informações advêm de dados da literatura obtidos com o H₂S exógeno ou doadores deste.

O H₂S pode ser eliminado no plasma mediante a reação com a metahemoglobina, uma forma de hemoglobina que não se liga ao oxigênio ou, ainda pode ser eliminada via reação de oxidação intracelular no citosol ou na mitocôndria. No citosol, esse gás é metilado pela tiol-S-metiltransferase (E.C. 2.1.1.9), formando o metanotiol (CH₄S) ou metil mercaptano (CH₃S) e o dimetilsulfeto (CH₃SCH₃; LEVITT et al., 1999; FURNE et al., 2001). Na mitocôndria, o H₂S é rapidamente oxidado a tiosulfato (S₂O₃²⁻) em um processo provavelmente não-enzimático, mas associado à cadeia transportadora de elétrons (SEARCY et al., 1996). Já a reação direta desse gás com a metahemoglobina forma a sulfahemoglobina e, esta, pode atuar como removedora do H₂S circulante. O H₂S pode ser também oxidado para sulfito por neutrófilos ativos (MITSUHASHI et al., 2005) ou, ainda, pode ser consumido por espécies oxidantes endógenas, tais como o peroxinitrito (BATH et al., 2002), hipoclorito (WHITEMAN et al., 2005), anion superóxido (SEARCY et al., 1996; GENG et al., 2004; CHANG et al., 2008), peróxido de hidrogênio (GENG et al., 2004; CHANG et al., 2008) e NO (WHITEMAN et al., 2006).

A geração do sulfito, a partir do tiosulfato, é catalisada pela enzima tiosulfato cianido sulfotransferase (rhodanese, EC 2.8.1.1), a qual transfere o enxofre da molécula de tiosulfato para o cianido ou para outros aceptores. O sulfito, por sua vez, é rapidamente convertido em um metabólito mais estável (sulfato) pela ação da enzima sulfito oxidase (PICTON et al., 2002). É interessante ressaltar que determinados estudos utilizaram como marcadores da intoxicação por inalação ambiental de H₂S, as medidas de concentrações urinária e plasmática de tiosulfato (KAGE et al., 1997; MILBY e BASELT, 1999). Concentrações elevadas de tiosulfato foram detectadas na urina de indivíduos com síndrome de Down, sugerindo que nesses indivíduos ocorre maior produção de H₂S (BELARDINELLI et al., 2001). Em estudo experimental com ratos, a análise das concentrações de sulfito, sulfato e tiosulfato no tecido pulmonar desses animais expostos ao poluente H₂S revelou um aumento marcante das concentrações de sulfito e sulfato, mas não do tiosulfato (DORMAN et al., 2002). Paralelamente, um estudo *in vitro* mostrou que a incubação de tecidos (ex.: fígado, cólon e tecido muscular) ou plasma obtidos de ratos tratados

com o H_2S ou de seu metabólito (metanotiol) resultou na geração de tiosulfato e sulfato (FURNE et al., 2001).

Por seu turno, o tiosulfato ou o sulfato não apresentam características confiáveis para serem eleitos como marcadores específicos da produção de H_2S , uma vez que concentrações significativas de tiosulfato foram detectadas no plasma, e não na urina, de indivíduos intoxicados por H_2S (KAGE et al., 1997; DURAND e WEINSTEIN, 2007). Além disto, concentrações significativas de tiosulfato foram obtidas na urina de indivíduos saudáveis, nas quais os valores variaram consideravelmente mediante às pequenas flutuações atmosférica de H_2S (DURAND e WEINSTEIN, 2007). Grande parte do sulfato eliminado na urina é proveniente da oxidação da cisteína, pela enzima cisteína dioxigenase, ou do sulfito, pela ação da enzima sulfito oxidase (LOWILKA e BELTOSKY, 2007). Apesar disto, a importância do H_2S para a saúde humana e animal (mamíferos) vem sendo bastante discutido, muito embora os mecanismos envolvidos nos processos fisiopatológicos estão longe de serem elucidados.

1.3 *Implicações do H_2S (exógeno e endógeno) na inflamação*

No tocante ao processo inflamatório, os dados existentes são ainda bastante contraditórios. Alguns estudos sugerem que o H_2S exerce um papel protetor, enquanto outros demonstram o contrário. Segundo Bhatia et al. (2005a), a formação de edema e influxo de neutrófilos induzido pela injeção subplantar de CGN na pata de ratos são potencializados pelo aumento da concentração local de H_2S , visto que esses efeitos foram reduzidos pelo tratamento dos animais com a DL-propargilglicina (PGly), um inibidor da CSE. Da mesma forma, na endotoxemia induzida por lipopolissacarídeo (LPS), administração de sulfeto de sódio agravou o dano pulmonar, pois aumentou a atividade da mieloperoxidase, bem como a concentração de $\text{TNF} - \alpha$. O pré tratamento dos animais com a PGly foi capaz de reverter este quadro (LI et al., 2005). Além disto, na pancreatite evocada pela ceruleína, a inibição da CSE com PGly reduziu as lesões hepática, neuromuscular e pancreática observadas na pancreatite (BHATIA et al., 2005b).

Contrariamente, Zanardo et al. (2006) observaram que o edema de pata induzido pela CGN foi reduzido por doadores de H_2S (NaHS e Na_2S), sendo esse

efeito revertido pela betacianoalanina, um inibidor de CSE. O efeito inibitório do H₂S sobre o influxo de mononucleares foi também visualizado no modelo de bolsa de ar cutânea (*air pouch*) frente à CGN em pele de camundongos (ZANARDO et al., 2006), bem como sobre o aumento na produção de malondialdeído e hidroxiprolina no pulmão de ratos com fibrose induzida por bleomicina (FANG et al., 2006). Outros autores observaram que em camundongos submetidos à lesão pulmonar aguda por fumaça, o tratamento destes com o Na₂S reduziu a oxidação de proteínas no pulmão bem como as concentrações de IL-1 β . Tal efeito foi associado ao aumento dos níveis de IL-10 e da taxa de sobrevivência dos animais (EZELICHIE et al., 2008). Em modelos de inflamação alérgica pulmonar induzida por ovalbumina (em ratos), a administração intra peritoneal (i.p.) de NaHS reduziu a inflamação e remodelação das vias aéreas, aumentando também o pico expiratório e reduzindo o depósito de colágeno e do influxo leucocitário no lavado broncoalveolar (CHEN et al., 2009).

O efeito protetor do H₂S foi também visualizado em dois modelos de Parkinsonismo induzido por 6-hidroxidopamina [6-OHDA] e por rotenona (LI-FANG et al., 2010). No primeiro modelo, os níveis endógenos de H₂S na substância negra estavam reduzidos quando comparados ao controle. A injeção sistêmica de NaHS reverteu esse processo e melhorando a disfunção de movimentos, a perda de neurônios positivos à tirosina hidroxilase na substância negra, e reduzindo os níveis elevados de malondialdeído no núcleo estriado lesionado. No segundo modelo, a suplementação com o NaHS inibiu a ativação da microglia na substância negra e reduziu o acúmulo de fatores pro-inflamatórios (TNF- α , óxido nítrico) no núcleo estriado via mecanismo dependente do NF- κ B (LI-FANG et al., 2010). Na sepse induzida por perfuração do ceco em camundongos, Spiller et al. (2010) observaram que os doadores de H₂S (NaHS ou reagente de Lawesson) restauraram o rolamento e a adesão leucocitária na microcirculação mesentérica dos animais. Isto levou, à redução da bacteriemia, hipotensão, lesão pulmonar e, ainda, elevou a taxa de sobrevivência dos animais (SPILLER et al., 2010). Segundo Baumgart et al. (2008), a exposição de ratos anestesiados e ventilados mecanicamente à 100 ppm de H₂S inibiu a inflamação decorrente da instrumentação cirúrgica.

Outrossim, estudos paralelos mostram que os fármacos antiinflamatórios não esteróides (AINES) quando associados à molécula de H₂S (ex.: mesalamina, ATB-343, ATB-337, S-diclofenaco) que, pela sua estrutura química, liberam essa

molécula, mostraram-se potentes agentes antiinflamatórios quando comparado aos AINES comuns, indicando que o H₂S aumenta a atividade antiinflamatória desses compostos (WALLACE et al., 2007; SIDHAPURIWALA et al., 2007), além de apresentarem menor toxicidade gástrica (WALLACE et al., 2010). Da mesma forma, a adição da molécula de H₂S no composto GYY4137 (ácido fosfino dióico p-metoxifenil morfolino) resultou no produto de liberação lenta de H₂S, capaz de reduzir a endotoxemia induzida pelo LPS em ratos (Li et al., 2009), bem como a síntese de mediadores pró inflamatórios (TNF α , IL-1 β , IL-6, óxido nítrico, e prostaglandina E₂ em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (WHITEMAN et al., 2009).

Em modelos de inflamação articular (CGN + Kaolin) o tratamento (i.p.) dos animais com NaHS mostrou-se potente inibidor da infiltração leucocitária, mas não atuou de forma positiva sobre a dor articular (ANDRUSKI et al., 2008). Na artrite induzida por adjuvante em ratos, o fármaco liberador de H₂S (ATB 346), quando administrado (i.p.), reduziu a geração do edema de pata nesses animais (WALLACE et al., 2010). Reforçando estas evidências, estudos *in vitro* utilizando cultura primária de células sinoviais e condrócitos estimulados com cristais de urato de sódio ou com IL-1 β , a co-incubação da cultura com o *diallyl* sulfeto, foi capaz de inibir a expressão da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), bem como a ativação do NF- κ B (LEE et al., 2009). Em cultura de sinoviócitos extraídos de joelho pacientes com AR submetidos à cirurgia de substituição total de joelho, KLOESCH et al. (2010) verificaram que a adição de NaHS reduziu os níveis de IL-6 bem como inibiu a ativação da MAPK (p42/44) nestas culturas.

1.4 Justificativa do estudo

Postula-se que as alterações microvasculares funcionam como ponto chave no desencadeamento de várias condições fisiopatológicas, incluindo o diabetes, artrite e a cicatrização de feridas (DONELLY et al., 2000). Embora estudos em cultura de células (*in vitro*) venham contribuindo sobremaneira para melhor compreensão de fisiopatologias, sabe-se que o mecanismo funcional operante no sistema *in vivo* é bem mais complexo, especialmente em mecanismos relacionados a mudanças do estado fisiológico para o patológico. Consequentemente, a

associação do modelo experimentais *in vivo* e das técnicas *in vitro* é fundamental para a melhor compreensão dos processos fisiopatológicos e o desenvolvimento de alvos terapêuticos.

Apesar dos avanços na terapia da AR, ainda não foi estabelecido, até o presente momento, um tratamento farmacológico satisfatório para todos os pacientes com AR ou um tratamento que promova a cura. Não obstante, os fármacos disponíveis para o tratamento da artrite exercem inúmeros efeitos adversos e, alguns, possuem custos elevados. Por conseguinte, a descoberta e delineamento de novos candidatos alternativos e / ou complementares para a terapia da AR ainda se faz necessária. Neste sentido, poucas evidências clínicas e nenhuma farmacológica mostram que águas sulfuradas promovem efeitos protetor e antiinflamatório em pacientes com AR e osteoartrite (WOZAKOWSKA-KAPŁON et al., 2006; IBADOVA et al., 2005).

Sabendo que a sinovite é um dos sintomas inflamatórios da artrite, e que expressão e atividade dos precursores de H₂S (CSE e CBS) na articulação até o presente momento, este grupo achou pertinente investigar a recente implicação deste gás na progressão e manutenção da resposta inflamatória e dor, usando o modelo experimental de sinovite *in vivo* induzida por CGN.

1.5 Objetivo e estratégias

O objetivo deste estudo consistiu em

1) Avaliar os efeitos protetores do H₂S exógeno e endógeno na modulação da resposta inflamatória articular induzida pela injeção i. art. da CGN no joelho de ratos, e os possíveis mecanismos envolvidos.

As estratégias para o desenvolvimento deste estudo, incluem estratégias *in vivo* e *in vitro*, em que um dos grupos recebeu o tratamento intraperitoneal (i.p.) com a indometacina, um AINE, usado como controle positivo do experimento.

Estratégias

1. Averiguar o efeito farmacológico do agente doador de H₂S (reagente de Lawesson) e do inibidor da síntese de H₂S (PGly) sobre o edema, via medida do diâmetro do joelho com o auxílio do paquímetro digital (Starret 727, São Paulo, Brasil).
2. Avaliar o efeito desses mesmos tratamentos sobre a resposta dolorosa e hipernociceptiva via testes comportamental de escore de deambulação e alodinia tátil secundária na pata traseira injetada, mediante o emprego dos filamentos de Von Frey eletrônico adaptado pela empresa Insight Ltda (Ribeirão Preto, SP, Brasil).
3. Investigar a capacidade dos agentes doadores de H₂S e inibidor da síntese de H₂S modular o influxo de leucócitos e a produção de mediadores/marcadores inflamatórios, i.e. citocinas (ex.: IL-1 β , IL-6, IL-10, e TNF α), atividade proteolítica da enzima conversora de IL-1 β (caspase-1).
4. Avaliar os efeitos do H₂S e sua inibição sobre a produção de NO e nitração de resíduos proteicos (iNOS, cNOS, NO x^- , e 3-nitrotirosina) no lavado sinovial ou membrana articular, por espectrofotometria de cintilação, elisa (absorbância) e Slot blot respectivamente.
5. Explorar o possível envolvimento das vias de transcrição NF- κ B e AP-1 nos efeitos do doador e inibidor da síntese de H₂S pelo ensaio de mobilidade eletroforética (*gel shift*).
6. Padronizar e determinar os níveis de sulfeto total (lavado articular), atividade e expressão proteica das enzimas CSE/CBS (tecido articular), e o efeito dos tratamentos sobre estes parâmetros, por Elisa (fluorimetria) e western blot.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Os experimentos foram realizados sob aprovação do projeto preliminar pelo Comitê de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB; protocolo nº 64, fls nº 46 livro nº 2/2007) da Universidade de São Paulo, cujas normas estão de acordo com os princípios do Colégio Brasileiro em Experimentação Animal (COBEA).

Neste estudo foram utilizados ratos machos Wistar (180-200 gramas) obtidos do Biotério Central do ICB. Os animais, em grupos de cinco, foram mantidos em gaiolas plásticas apropriadas e com água e ração *ad libitum* no Biotério de manutenção do Departamento de Farmacologia do ICB, sob temperatura e ciclo de iluminação controlados (22 °C; claro/escuro, 12/12h).

2.2 Delineamento experimental

Mediante anestesia com a mistura de halotano (3%) em O₂ (TAKAOKA Modelo KT20; São Paulo, SP), o joelho (esquerdo) dos animais foi depilado, com o auxílio de um depilador elétrico (Panasonic[®] ER389K, Tóquio, Japão). A seguir, o joelho dos animais foi submetido ao pré-tratamento (-60 min) com os seguintes agentes testes: reagente de Lawesson (LR; 3,6 µmol/cavidade articular), o inibidor da cistationina-γ-liase DL-Propargilglicina (PGly, 53 µmol/cavidade articular) ou o veículo carboximetil celulose (CMC 0,2%; 50µl; grupo Sham), via injeção intra articular (i.art). Paralelamente, um grupo de animais foi pré-tratado (-60min), pela via intraperitoneal (i.p), com anti-inflamatório inibidor da enzima ciclooxigenase (COX), indometacina (Indo, 6mg/kg; i.p., Tabela 1) previamente à injeção i.art de CGN

Tabela 1 - Grupos experimentais.

Grupos	Tratamento
Sham (CMC 0,2%)	(50 µl i.art.)
Controle (CMC 0,2% + CGN)	(50 µl i.art., -60 min)
Tratado (LR + CGN)	(3,6 µmol/art; 50 µl, -60 min)
PGly + CGN	(53 µmol/art; 50 µl, -60 min)
Indometacina+Carragenina	(6mg/kg, i.p., -60 min)

2.3 Indução da inflamação articular aguda pela carragenina (sinovite)

Com o auxílio de uma seringa e agulha ultrafina (30G; BD Franklin Lakes, NJ, USA), a indução da sinovite foi realizada nos animais anestesiados pela injeção i. art. de CGN (3%, 50 µl) através do ligamento patelar do joelho esquerdo destes (IPSILATERAL; IPSI). Simultaneamente, um grupo de ratos recebeu a injeção i.art de salina (50µl), sendo este nomeado Sham. Após os intervalos de 2, 4, 8, 16, 24, 32, 48, 56 e 72h, os animais foram submetidos à avaliação de parâmetros inflamatórios (edema) e nocicepetivo via medida comportamental. Com base nos resultados preliminares desses intervalos, adotou-se o período de 4h para os tratamentos com os agentes testes em estudo (Tabela 1).

2.4 Avaliação da inflamação articular (edema)

A medida do diâmetro articular (em mm e expresso como edema) do joelho esquerdo dos animais foi realizada, em triplicata, antes e após a injeção i. art. de CGN (3%, 50 µl) ou salina, com o auxílio do paquímetro digital (Starret 727, São Paulo, Brasil) em um ambiente isento de barulho e com iluminação dimerizada. Para isto, os animais foram cuidadosamente imobilizados por outro investigador e a medida do diâmetro lateral do joelho foi feita.

A medida do edema articular foi realizada no intervalo de 4 horas, sendo o edema final considerado como a variação (Δ) da média das três medidas final subtraída da média da medida basal (antes da injeção da CGN).

2.5 Avaliação do comportamento nociceptivo

2.5.1 Escore: o teste comportamental para avaliação da dor consistiu na observação da dificuldade de locomoção e posicionamento das patas traseiras dos animais, baseado no estudo de Otsuki et al. (1986) e com pequenas modificações. Durante o período de observação de 3min, os graus de escore de 0 a 3, foram atribuídos para cada animal, onde o grau zero (0) representa os animais sem dor e, portanto, com deambulação normal. O grau um (1) foi inferido aos animais que apresentaram comprometimento leve da locomoção, caracterizado pela dificuldade em manter passos constantes (mancando). O grau dois (2) foi atribuído aos animais com comprometimento moderado, caracterizado pelo levantamento da pata injetada em

intervalos intermitentes. O grau três (3) designou os animais com comprometimento grave de locomoção, cuja pata injetada manteve-se erguida durante o tempo avaliado. Os resultados foram expressos como grau de escore.

2.5.2 Hipernocicepção mecânica secundária: classicamente, um dos métodos utilizados para avaliar a presença de hiperalgesia/hipernocicepção e, portanto a sensibilidade tecidual ao estímulo mecânico, consiste no emprego do filamento de Von-Frey (VON FREY, 1896). Um modelo digital desse filamento foi adaptado pela empresa Insight Ltda (Ribeirão Preto, SP), e recentemente empregado em nosso laboratório (DENADAI-SOUZA et al., 2009) e outros laboratórios (VIVANCOS et al., 2004). Para avaliação da hipernocicepção, os animais foram condicionados individualmente por 3 dias durante intervalos de 15 a 30min/dia em gaiolas de acrílico de transparente (12 x 20 x 17 cm), cuja base de arame entrelaçado permitia o contato com a pata dos animais. Aproximadamente 30 – 40 cm abaixo da base aramada, um espelho inclinado auxiliava na visualização das patas dos animais, o onde estímulos mecânicos foram aplicados manualmente, com auxílio do transdutor de força (força máxima= 1000 gramas) acoplado a uma ponteira plástica (0,7 mm²). A pressão exercida sobre a base plantar da pata do animal foi necessária para que este apresentasse o reflexo de retirada da pata. A medida da resposta hipernociceptiva consistiu no valor expresso em g da diferença (Δ) obtida entre o valor da pressão exercida nas patas dos animais antes (basal) e 4 horas após o estímulo inflamatório (injeção i.art CGN). As medidas foram sempre realizadas em triplicatas, sendo o intervalo entre cada medida por volta de 60 segundos. Os dados foram expressos como delta (Δ) da média do limiar de retirada (em gramas). Em ambos os testes de dor, as medidas foram feitas por um investigador alheio a origem dos tratamentos.

2.6 Coleta do lavado sinovial e análise do número de células

Após o intervalo de 4h, os animais dos diferentes grupos experimentais foram anestesiados e depois mortos por deslocamento cervical. A pele sobre o joelho dos animais foi removida e, com o auxílio de uma seringa e agulha ultrafina (0,3ml; 30G; BD[®], NJ, EUA), o volume de 0,1ml de solução fisiológica foi injetado lentamente na cavidade da articulação patelo-femural com o membro flexionado (~90°). O volume de solução injetada foi subsequentemente aspirado juntamente com o fluido sinovial

e, depois, foi reservado para quantificação do seu conteúdo celular e/ou submetido a outras dosagens bioquímicas.

Para quantificação celular no lavado sinovial, amostras de 50 µl do lavado articular foram diluídas em solução PBS (150 µl). Para a contagem total, o volume de 10 µl dessa amostra diluída foi adicionado ao volume de 190 µl da solução de Turk (cristal violeta 0,2% em solução aquosa de ácido acético 30%). A seguir, 10 µl dessa solução foram dispostos em câmara de Neubauer, onde foi realizada a contagem total de células, cujo valor foi expresso como número de células $\times 10^5$ /cavidade. A contagem diferencial dos leucócitos no lavado dos joelhos foi feita pela técnica de citocentrífuga (MOD 2400; Fanem; São Paulo, SP). As lâminas foram coradas pelo método de May-Grünwald-Giemsa e as células presentes no lavado foram diferenciadas de acordo com a sua morfologia em neutrófilos, macrófagos e linfócitos com o auxílio de microscópio. Os resultados foram expressos em número de cada tipo celular $\times 10^5$ /cavidade.

2.7 Obtenção e quantificação celular no sangue periférico

Os animais anestesiados foram submetidos à coleta de sangue periférico via artéria abdominal e, em seguida foram eutanasiados por deslocamento cervical. Da amostra de sangue periférico coletado foi retirado um volume de 10 µl e adicionado a um volume de 190 µL da solução de Turk (cristal violeta 0,2% em solução aquosa de ácido acético 30%) para contagem do número total de células usando a câmara de Neubauer. A análise diferencial dos leucócitos do sangue periférico foi efetuada em esfregaços sanguíneos corados com May-Grunwald-Giemsa. Os dados foram expressos como número de células ($\times 10^5$) por ml de sangue.

2.8 Obtenção da medula óssea, preparo e quantificação celular

A coleta de medula óssea foi realizada nos animais dos diferentes grupos experimentais (Tabela 1). Após a anestesia, os animais foram eutanasiados e ambos os fêmurs (esquerdo e direito) foram removidos. Com o auxílio de uma seringa (5ml, BD[®], NJ, EUA) e agulha (0,80 x 25 cm ; BD[®], NJ, EUA) contendo 4 mL do Meio de Dulbecco Modificado por Eagle, esse volume foi injetado numa das extremidades dos fêmures e, em seguida foi aspirado. O lavado medular obtido foi homogeneizado

e alíquotas de 10 µl foram ressuspensas em 190 µl da solução de Turk (cristal violeta 0,2% em solução aquosa de ácido acético 30%). O número total de células no homogenato medular foi quantificado em câmara de Neubauer, enquanto a análise diferencial das células do lavado medular foi feita por técnica de citocentrífuga (MOD 2400; Fanem; São Paulo, SP). Os resultados foram expressos como número de células ($\times 10^7$) por fêmur.

2.9 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

A avaliação da atividade da MPO, utilizada como medida indireta da infiltração de leucócitos, foi realizada na amostra do lavado articular dos joelhos dos animais. Cada amostra (20 µl) de lavado foi diluída em volume equivalente de tampão fosfato de potássio (K_2PO_4 5 mM, pH 6,0) contendo 0,5% de HTAB, e depois aquecida (60 °C) durante 2h para inativação da catalase endógena. Após centrifugação das amostras (10.000 g; 5min), um volume de 10 µl do sobrenadante foi coletado e disposto em microplaca, juntamente com 200 µl do tampão K_2PO_4 (5 mM; pH 6,0) contendo a solução de dihidroclorato de o-dianisidina (0,164 mg/ml) e água oxigenada (0,0005%). A medida de densidade óptica (DO), em comprimento de onda de 460 nm, foi feita em leitor de ELISA (Espectra Max plus 384, Sunnyvale, CA, EUA) durante 10min, em intervalos de 11seg. A atividade de MPO foi expressa em unidades de MPO (UMPO) /cavidade, onde uma unidade de MPO é definida como aquela capaz de degradar um µmol de H_2O_2 por minuto (BRADLEY et al., 1982).

2.10 Análise histopatológica

Ao final das 4h pós-injeção da CGN, os animais foram anestesiados e eutanasiados. Os joelhos (esquerdo) de 4-5 animais por grupo foram removidos e fixados com formaldeído 4% em PBS 0,1M (pH 7,4). Após 24h, as amostras foram lavadas em água destilada e descalcificadas em EDTA 10% (pH 7,0; trocas diárias durante 20 dias). Ao final desse período, os espécimes foram novamente lavados em água corrente (12h) seguido por imersão em álcool 50% (12h), álcool 70% (6h) e, por fim, foram imersos (com duas trocas) em álcool 95% (1h) e, depois em álcool absoluto (4 trocas), xilol (3 trocas) durante 1h) e histosec (3 trocas durante 2h). As

amostras foram então seccionadas na posição sagital (5 µm de espessura), fixadas em lâminas com poli-L-lisina e depois coradas com hematoxilina e eosina (H&E). Para tal, os cortes foram desidratados e diafinizados em dois banhos de concentrações de álcool absoluto e xilol (70 e 95%, respectivamente).

Os cortes histológicos (em duplicatas) foram analisados, com o auxílio de microscopia (Nikon Eclipse E200) de forma semi-quantitativa por um investigador alheio aos protocolos. Para avaliar o padrão e intensidade das alterações morfológicas e infiltrado inflamatório foi utilizado a técnica de escore de inflamação articular com base na metodologia descrita por Roth et al. (2005). Para cada lâmina, o grau de escore de infiltrado celular (polimorfonuclear e mononuclear) na articulação/sinóvia foi definido conforme descrito a seguir: 0= sem alterações, 1 = infiltrado leve, 2 = infiltrado moderado e, 3 = alterações e infiltrado severo. A presença (escore 1) e ausência (escore 0) de exudato fibrinoso no espaço articular bem como a inflamação peri-articular foram avaliados, totalizando um escore máximo de 8.

2.11 Quantificação dos níveis de citocinas no fluido sinovial

As medidas das concentrações das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 nas amostras do lavado foram realizadas pelo teste imunoenzimático (ELISA), segundo as instruções do fabricante (R&D System, MN, EUA). Brevemente, as amostras do lavado sinovial foram centrifugadas (3.000 g, 10min) e os sobrenadantes separados e pipetados (duplicatas) em placas de 96 poços previamente (18h, 4 °C) sensibilizadas com 100µl do anticorpo monoclonal específico para cada citocina: anti-IL1 β , anti-IL-6 e IL-10 preparados em tampão carbonato (0,1M, pH 9,6) e anti-TNF- α em tampão fosfato de sódio (0,2M, pH 6,5). A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro (Espectra Max plus 384; Sunnyvale, CA, EUA) nos comprimentos de ondas que variaram de 450 nm a 570 nm. As concentrações das amostras foram calculadas a partir das curvas-padrão obtidas com as citocinas recombinantes. O limite de detecção para IL-1 β , IL-6 e IL-10 foi 0,98 pg/ml, enquanto para o TNF- α foi 1,95 pg/ml.

2.12 Avaliação da atividade da caspase-1 na membrana sinovial

O tecido articular foi homogeneizado (MARCONI, mod MA 102, São Paulo, Brasil) em tampão de lise HEPES (100mM), contendo sucrose 10%, CHAPS 0,2%, DTT 0,2% e um coquetel de inibidores de protease (PMSF, pepstatina A, E-64, bestatina, leupeptina, aprotinina). Após centrifugação das amostras (4000 g, 4 °C) durante 10min, o sobrenadante foi coletado e transferido para outro tubo plástico, e a concentração de proteínas foi determinada (BRADFORD, 1976).

A atividade proteolítica da caspase-1 foi determinada via método de clivagem de peptídeos e substratos fluorogênicos, segundo Thornberry et al. (1997) com pequenas modificações de Belizário et al. (2001). Para isto, a dosagem de proteínas foi realizada nas amostras contendo 80 µg em tampão de ensaio (sacarose 10%, Hepes 100 mM, EDTA 1 mM e DDT 10 mM, em pH 7,5) em volume q.s.p. 160 µl por poço (quádruplicatas) em placas de 96. O padrão de fluorescência 7-amino-4-trifluorometil cumarina (AFC) foi usado como controle do ensaio. O volume de 20 µl do inibidor da atividade proteolítica da caspase-1 (Ac-YVAD-CHO [acetil-Tyr-Val-Ala-Asp-CHO]; 100 µM) foi adicionado em uma das duplicatas e esta mantida à 37°C durante 15min. A seguir, foi adicionado às demais duas amostras, volumes de 20 µl do substrato da caspase-1 (Ac-YVAD-AMC [acetil-Tyr-Val-Ala-Asp-7-amino-4-metil cumarina], 10 µM). Após leitura dessas amostras em espectrofluorímetro (Molecular Devices Spectra MAX Gemini XS, EUA) no comprimento de 380 nm (excitação) e 460 nm (emissão), a liberação de AFC foi monitorada durante 60 min.

As atividades obtidas nos ensaios regulares foram subtraídas daquelas realizadas na presença do inibidor. A velocidade da reação em unidades de fluorescência/seg (U/seg) foi obtida pelo programa Softmax Pro (Molecular Device) e os resultados plotadas pelo mesmo no decorrer dos 60 min de leitura da reação.

2.13 Avaliação da atividade de NOs no tecido articular ex-vivo

A medida de atividade de NOS na membrana sinovial foi determinada com base na conversão da [³H]L-arginina para [3H]L-citrulina, segundo Förstermann et al. (1990).

Amostras da membrana sinovial dos diferentes animais foram pesadas e homogeneizadas em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) contendo fenil-metil-sulfonil-

fluoreto (PMSF; 1 mM) e L-citrulina (1 mM) na proporção de 1:5 (p/v). Alíquotas de 50 µl (em duplicatas) dessa solução foram incubados (30min) com 100 µl da solução contendo NADPH (1 mM), CaCl₂ (2 mM) e L-arginina (10 µM contendo 100.000 cpm de 2,3,4,5- ³H]L-arginina mono hidrocloreto GE Healthcare, Reino Unido) em temperatura ambiente (22 °C). Posteriormente, a reação foi interrompida pela adição de 1 ml do tampão HEPES (20 mM) contendo EGTA (1 mM) e EDTA (1 mM) em pH 5,4. Após nova centrifugação dessas amostras (10.000 g; 10 min), os sobrenadantes foram aplicados em colunas de troca iônica (0,6 ml de resina Dowex AG 50X-8). Os eluatos coletados da coluna foram diluídos em 10 ml do líquido de cintilação (Hisafe 3, PerkinElmer, MA, EUA) e levados ao espectrofotômetro de cintilação para quantificação (Tris-Carb 2100, Packard, Estados Unidos da América). Para o cálculo das atividades enzimáticas, as contagens (cpm) foram relacionadas à atividade total (os conteúdos destes tubos receberam [2,3,4,5-³H]L-arginina mono hidrocloreto diretamente nas vias de cintilação) pela fórmula abaixo, onde 1000 é a quantidade de L-arginina adicionada à mistura de incubação (em pmols) e 30 é o tempo de incubação (em min): $\text{pmol L-cit/min} = 1000 \times (\text{cpm amostra} - \text{cpm branco}) / \text{cpm totais} / 30$

A atividade enzimática das amostras foi avaliada na ausência de CaCl₂ e presença de EGTA (1 mM) ou L-NAME (1 mM). A atividade da NOs foi expressa como pmols de L-citrulina produzidos por minuto e por mg de proteína. O conteúdo de proteínas foi determinado pelo método de Bradford (1976), utilizando-se kit comercial (Bio Rad, Hercules, CA, EUA).

2.14 Dosagem de nitrito/nitrato (NO_x -) no lavado articular

Volumes de 60 a 70µl do lavado articular foram dispostos em microtubos de 10 kDa (Ultracel YM-10, Millipore, EUA), e submetidos à centrifugação (5000 g, 30min). Em seguida, foi acrescentado nessas amostras volumes de água Milli-Q na proporção de 1:5. Amostras de 100 µl do sobrenadante e da curva-padrão de calibração com NaNO₃ (0,2 a 20 µM) foram incubados (37 °C, 60min) com 160 µl da solução contendo *Aspergillus* nitrato redutase (0,2 U/ml), FAD (5 µM), NADPH (100 µM) e tampão TRIS-HCl (20 mM, pH 7,6). Após incubação, volumes de 20 µl de lactato desidrogenase (135 U/ml,) e 20 µl de ácido pirúvico (90 mM) foram adicionados às amostras e novamente incubados (37 °C, 30min). A seguir, a cada

amostra do lavado, foram acrescentados 50 µl do reagente de Griess (0,2% de naftilenoetilenodiamina e 2% de sulfanilamida em 5% de ácido fosfórico) e após 10 minutos, as amostras foram submetidas à leitura no espectrofotômetro (Espectra Max plus 384, Sunnyvale, CA, Estados Unidos da América) sob comprimento de onda 540 nm.

2.15 Análise da expressão protéica de 3 - nitrotirosina por Slot blot

As amostras de membrana sinovial foram homogeneizadas em tampão TRIS-HCl (50 mM, pH 7,4; contendo 1 mM de PMSF) numa proporção de 1:10. Após centrifugação (10.000g, 5min, 4 °C), o conteúdo de proteínas total foi determinado nos sobrenadantes conforme descrito por Bradford (1976).

Os sobrenadantes foram diluídos em tampão TRIS-HCl (50 mM, pH 7,4), resultando na concentração final de 2,5 µg de proteína para cada 200µl de amostra. A seguir, essas amostras foram transferidas por vácuo para a membrana de nitrocelulose (em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4), e a confirmação deste processo foi constatado mediante o aparecimento da coloração com vermelho de ponceau (0,1% em ácido acético 5%). Após captura da imagem no software ChemImager, foi feita a descoloração com água destilada. Os sítios inespecíficos foram bloqueados pela adição de solução caseína (0,2%) em TBS-t (20 mM de Tris-HCL, 137 mM de NaCl, pH 7,4; 1h), antes da exposição (1h) ao anticorpo primário anti nitrotirosina (anti camundongo 1:500; Upstate, *Cell Signalling Solution*, Estados Unidos da America). O anticorpo primário foi detetado pela incubação (1h) com o anticorpo secundário (cabra policlonal para IgG de camundongo conjugado a peroxidase; 1:3.000; *Signalway antibody*, TX, EUA). O slot foi revelado com o kit *SuperSignal West pico chemiluminescent substrate*[®] (Thermo Scientific, CA, EUA) e a quantificação de 3 nitrotirosina foi feita por densitometria no software ChemImager 5500 (Alpha Innotech Corporation, CA, EUA) e normalizadas pelo ponceau.

2.16 Avaliação de expressão protéica por Western Blot

A expressão de proteínas das enzimas CSE e CBS na membrana sinovial dos diferentes grupos foi avaliada via técnica de Western Blot. Para isto amostras foram homogeneizadas em tampão TRIS-HCl 50 mM (10 vol./mg; pH 7,4) contendo PMSF

(1 mM) e centrifugadas (10.000g, 5min). As amostras foram diluídas em tampão TRIS-HCl (50 mM, pH 7,4) a um volume q.s.p 130 µl e, em seguida, o volume de 30 µl de tampão laemmli (62,5 mM de Tris-HCL, pH 6,8 contendo 2% de SDS, 10% de glicerol, 0,001% de azul bromofenol e 5% de 2-mercaptoetanol) foi adicionado na amostra. Subsequentemente, de 30 µg das proteínas presente nas amostras foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida (7% contendo laurei sulfato de sódio; SDS-PAGE) usando um tampão específico (Tris 25 mM, 192 mM de glicina e 0,1% de SDS) em intensidade constante de corrente (35 mA; voltagem ≈ 100 – 180 V), conforme descrito (LAEMMLI, 1970).

As bandas proteicas foram transferidas eletroforeticamente via sistema submerso para membrana de nitrocelulose (150 mA, ~40 V; 2h), utilizando-se o tampão específico : 25 mM de Tris, 192 mM de glicina, 0,1% de SDS e 18% (V/V) de etanol absoluto. A eficiência da transferência foi verificada pela coloração das membranas por vermelho de ponceau (0,1% em ácido acético 5%). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados pela adição da solução caseína (0,2%) em TBS-t (20 mM de Tris-HCL, 137 mM de NaCl, pH 7,4 contendo 0,2% de Tween-20) durante 1h. A seguir, as membranas foram incubadas (12h, 18 °C) com anticorpos primários: anti CSE (monoclonal de camundongo; 1:1.000, *Abnova Novus Biologicals*, Taiwan) e anti CBS (monoclonal de camundongo; 1:1500, *Abnova Novus Biologicals*, Taiwan). Após lavagens apropriadas (6x 10 min com TBS-t), as membranas foram incubadas com anticorpo secundário (cabra policlonal para IgG de camundongo conjugado à peroxidase; 1:3.000 em TBS-t, 2 horas em temperatura ambiente). As membranas foram submetidas a uma nova série de lavagens (6x 10 min) e as bandas imunorreativas reveladas com o kit *SuperSignal West pico chemiluminescent substrat*[®] (Thermo Scientific, Rockford, EUA). As imagens foram captadas com o auxílio do sistema de imagens Chemilmager 5500 (Alpha Innotech Corporation, CA, Estados Unidos da América) e as intensidades das bandas foram analisadas por densitometria e normalizadas pelo controle interno (α-tubulina, monoclonal de camundongo, 1:2.000, Santa Cruz).

2.17 Ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética (Gel-shift) para os fatores de transcrição NF- κ B e AP-1 na membrana sinovial

Para a extração de proteínas nucleares, o método que utilizamos foi baseado no trabalho de Rong e Baudry (1996). As membranas sinoviais foram homogeneizadas em tampão de lise (10 mM HEPES; 1,5 mM MgCl₂; 10 mM KCl; 2 µg/mL leupeptina; 2 µg/mL antipaína; 0,5 mM PMSF; 0,1 mM EDTA; 30 mM NaF; 3 mM ortovonadato; 0,5 mM DTT; 2 mM pirofosfato) e incubado em gelo durante 15 minutos. Foi adicionado em seguida NP-40 0,5% com agitação vigorosa, centrifugando-se a 13.000g por 30 segundos a 4 °C. O *pellet* resultante foi ressuspenso em tampão de extração (20 mM HEPES; 1,5 mM MgCl₂; 300 mM NaCl; 0,25 mM EDTA; 2 µg/mL leupeptina; 2 µg/mL antipaína; 0,5 mM PMSF; 30 mM NaF; 3 mM ortovonadato; 0,5 mM DTT; 2 mM pirofosfato) e incubado 20 minutos em gelo, seguido de centrifugação a 13.000 g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido e a concentração de proteínas determinada de acordo com o método descrito por Bradford (1976).

O ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética para NF- κ B e AP-1 foi realizado de acordo com Munhoz et al. (2006). Brevemente, foi utilizado um kit de ensaio para *gel shift* (Promega®, Madison, Estados Unidos da América). A sonda um oligonucleotídeo consenso de dupla fita de NF- κ B ou AP-1 marcado com ³²P (30000 cpm) e o extrato nuclear (2,5 µg), o oligo frio em excesso ou o anticorpo específico para subunidades foram aplicados no gel de poliacrilamida 5,5% [acrilamida/bisacrilamida (37,5:1)]. Para a eletroforese foi usado o tampão TBE (45 mM Tris, 45 mM Ácido Bórico, 0,5 mM EDTA). O gel foi submetido à eletroforese por 2 horas a 150 V. Após a corrida o gel foi secado e analisado por autoradiografia.

2.18 Dosagem de sulfeto total no lavado articular e plasma

Volumes de 50 µl do lavado sinovial foram diluídos (1:5) em tampão NaOH (0,02 mM) e, paralelamente, as amostras de plasma obtidas por punção cardíaca foram diluídas no mesmo tampão (1:10). Em seguida, um volume de 100 µl de cada amostra foi disposto em tubo plástico (1,5 ml) juntamente com acetato de zinco 4% (50 µl), substância esta responsável pelo sequestro do H₂S, e também 100 µl da solução contendo: ácido tricloroacético (10%), cloridrato de N, N-dimetil-*p*-

fenilenodiamina (20 mM) em HCl (7,2M) e FeCl_3 (30 mM) em HCl (1,2M) na proporção de 2:1:1. Essa mistura foi submetida à incubação em banho Maria (37 °C, 2h) e depois, um volume de 500 µl de álcool butílico e 50 µl de solução de NaCl saturada foi adicionada à essa mistura, Após centrifugação dessa mistura (10.000 *g*, 3 min), amostras de 200 µl foram dispostas, em duplicatas, na placa de 96 poços e submetidas à leitura em leitor de microplaca (670 nm; Espectra Max plus 384, Sunnyvale, CA, EUA). A concentração de H_2S foi calculada em função da curva padrão de Na_2S (0,98 a 105 µM).

2.19 Cinética de liberação do sulfeto total pelo LR na articulação do joelho de ratos

Animais *naïve* foram anestesiados e preparados conforme descrito anteriormente. A seguir, foi feita a injeção i. art. do LR (3,6 µmol/cavidade) no joelho destes, que foram aleatoriamente sacrificados nos tempos crescentes de 10, 30 e 60min. O lavado articular (50 µl) obtido dos animais nos diferentes intervalos foi imediatamente coletado, conforme descrito anteriormente e submetido à determinação das concentrações de sulfeto total, com base na curva padrão de Na_2S (0,98 a 105 µM).

2.20 Determinação da atividade enzimática da CSE e CBS no joelho

Amostras da membrana sinovial de animais *naïve* foram pesadas e homogeneizadas em tampão fosfato (100 mM) contendo o inibidor de protease (PMSF 0,5M). Após centrifugação das amostras (10.000 *g*, 5min; 4 °C), os sobrenadantes foram coletados e as atividades das enzimas CSE e CBS foram determinadas com base na metodologia de formação do azul de metileno, descrita por Stipanuk e Beck (1982), e adaptada pelo nosso grupo para o tecido sinovial.

Homogenato do tecido sinovial (400 µl), foi adicionado à solução de L-cisteína (10 mM; 25 µl), o cofator 5'fosfato de piridoxal (2 mM; 25 µl) e o inibidor para CSE (D-L Propargilglicina 2mM; 50 µl) ou a solução contendo inibidor para CBS (carboximetil-hidroxilamina hemihidrocloreto 3mM [CHH]; 50 µl). As amostras com e sem inibidores (400 µl) foram dispostas em tubos de vidro (20 ml). As que continham os inibidores foram previamente incubadas (37 °C, 20min) e, em seguida, adicionou-

se a ambas o substrato e o cofator. A seguir, inseriu-se um tubo plástico de 2 ml contendo papel de filtro (1x 2 cm) embebido em 250 µl de acetato de zinco 4% dentro do frasco de vidro contendo as amostras. Os frascos de vidros contendo as amostras foram submetidos à descarga gasosa de nitrogênio (~20 segundos) e depois fechados hermeticamente.

A determinação da cinética de geração do H₂S na membrana sinovial foi realizada nos intervalos de 60, 90 e 120min. A reação foi interrompida pela adição de 500 µl de ácido clorídrico 37% aos frascos de vidro. Após uma hora, os tubos plásticos foram removidos e, então, foram adicionados 100 µl da solução contendo ácido tricloroacético (10%) e cloridrato de N, N-dimetil-*p*-fenilenodiamina (20 mM) em HCl (7,2 M) e FeCl₃ (30 mM) em HCl (1,2 M) na proporção de 2:1:1, respectivamente. Amostras de 200 µl dessa mistura (em duplicatas) foram dispostas em placa de 96 poços e submetidas à leitura no comprimento de onda 290 excitação e 695 de emissão. Os dados foram expressos em unidade arbitrária de fluorescência e em nmol/g/h de H₂S.

2.21 Análise estatística

Os resultados são apresentados como média ± E.P.M de valores absolutos, onde “n” denota o número de animais usados em cada experimento. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância de uma única via (ANOVA), seguida pelo teste modificado de Bonferroni. Quando apropriado foi feita análise não paramétrica Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para comparações múltiplas, ou t-Student. As diferenças entre as médias foram avaliadas como o auxílio do programa estatístico (GraphPad Prism 5.0; GraphPad Software Corporation, San Diego, CA, EUA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação dos parâmetros inflamatórios e nociceptivos

3.1.1 Avaliação temporal do edema articular e do efeito doloroso na sinovite induzida pela injeção i.art da CGN em joelho de ratos

O edema monoarticular no joelho de ratos injetado com a CGN ocorreu de forma tempo-dependente, sendo o mesmo estatisticamente diferente ($P < 0,01$) do diâmetro do joelho contralateral injetado com a salina logo a partir da 2ª h pós-injeção (Figura 3, painel A). Na vigência da 4ª hora, o edema articular foi estatisticamente significativo quando comparado ao joelho controle e, em torno da 32ª hora, atingiu seu pico de resposta, o qual foi mantido até a 72ª h, quando então o edema começou a regredir (Figura 3, painel A). O joelho injetado com a salina não exibiu variações significativas no diâmetro da articulação em todos os intervalos (Figura 3, painel A).

A curva temporal da dor, evidenciada pelo grau do escore de deambulação / mobilidade dos animais revelou um aumento gradual do escore após a indução da sinovite, cuja diferença estatística foi observada a partir da 4ª h, e se manteve até a 72ª h quando comparado ao grupo de animais injetados com a salina (Figura 3, painel B). À semelhança do edema articular, o pico da resposta nociceptiva foi observado entre a 30ª e 48ª h e, após esse intervalo, o início da redução da resposta nociceptiva foi notificado (Figura 3, painel B).

Figura 3. Curso temporal e da AUC do edema articular e resposta nociceptiva em ratos com sinovite induzida pela carragenina (CGN). Painel A mostra o diâmetro articular (edema em mm) e AUC após a injeção i. art. da CGN (50 μ l, 3%) no período de 72^a h. Os círculos preenchidos (●) mostram o edema observado no joelho injetado com a CGN, enquanto os círculos abertos (○) mostram o efeito evocado pela injeção i. art. de salina. O painel B ilustra o escore (efeito nociceptivo) e a respectiva AUC nesses mesmos animais ao longo de 72^a h. Os dados estão apresentados com média $\pm$ e.p.m para n=5 animais* ***P < 0,001 vs. salina. (Teste *t-Student*).

3.1.2 Avaliação clínica: dor e edema articular

Como ilustra a figura 4 (painéis A e B), no intervalo de 4h após administração da CGN, a avaliação do escore nociceptivo e da alodinia táctil secundária na pata IPSI nos animais com sinovite (n=7) mostrou aumento significativo no grau de deambulação e da alodinia destes, em relação ao grupo controle que recebeu a injeção i. art. de salina (Sham, n=4). O pré-tratamento dos animais com o LR (3,6 μ mol/art., n=8) ou indometacina (6 mg/kg i.p., n=6) resultou em melhora significativa do padrão de mobilidade dos animais ($54 \pm 9\%$ e $85 \pm 11\%$; respectivamente), assim como diminuição da alodinia táctil secundária. Por outro lado, o pré-tratamento dos animais com o inibidor da CSE, a PGly (53 μ mol/art., n=8) não diminuiu o escore de dor, e nem a alodinia táctil secundária na pata dos animais com sinovite quando comparado com o veículo (Figura 4A e B). Conforme demonstrado anteriormente (Figura 4, painel A), a injeção i. art. de salina no joelho de ratos (grupo Sham) não aumentou o diâmetro articular desses animais quando avaliado 4h depois da administração (Figura 4, painel C). Entretanto, a injeção i. art. de CGN (3%; 50 μ l) resultou em aumento significativo do diâmetro articular (em mm; $40 \pm 1\%$) do joelho dos animais em relação ao diâmetro do respectivo joelho antes da indução da sinovite (Figura 4, painel C). O edema induzido pela CGN no joelho dos animais foi significativamente reduzido pelo pré-tratamento com o LR ou indometacina (Figura 4, painel C), e o diâmetro articular dos animais tratados com PGly não foi diferente do grupo veículo (Figura 4, painel C).

Figura 4. Efeito do tratamento com o reagente de Lawesson, indometacina e DL-propargilglicina sobre o escore de dor, alodinia tátil secundária e edema articular induzida pela CGN. Os animais injetados com CGN foram pré-tratados com LR (3,6 μ mol/cavidade art., n=8), PGly (53 μ mol/cavidade art., n=8), indometacina (6 mg/kg i.p., n=6) ou veículo (n=7). Um grupo separado recebeu a injeção i.art de salina estéril (n=4). Paine A ilustra a mobilidade dos animais em escore de escala de 0 (normal) a 3 (imobilidade total da articulação). O paine B ilustra a alodinia secundária observada na pata ipsilateral dos diferentes grupos experimentais (n=5). O paine C ilustra a inflamação articular medida pela diferença do diâmetro articular (mm) após e antes da injeção i.art. da CGN. No paine A os dados estão expressos pela mediana, valor mínimo e máximo do escore de dor; os dados do paine B e C estão expressos como média $\pm$ e.p.m *P<0,05 - ***P<0,001 vs. animais tratados com o veículo. No paine A foi aplicado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis seguido do teste Dunn Múltipla comparações. Para os painéis B e C foi aplicado o teste ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

3.1.3 Efeito do doador e inibidor da produção de H_2S sobre o recrutamento de leucócitos (e atividade de MPO) na cavidade articular em ratos com sinovite

Conforme demonstra a figura 5, o lavado sinovial coletado dos ratos com sinovite exibiu um número significativo de leucócitos totais quando comparado ao lavado do grupo injetado com salina (Figura 5, painel A). Esse aumento foi caracterizado, principalmente, pela presença de neutrófilos (Figura 5, painel B) e linfócitos (Figura 5, painel C), mas não por monócitos / macrófagos (Figura 5, painel D). O pré-tratamento dos animais com o LR ou indometacina reduziu marcadamente o número de neutrófilos e linfócitos no lavado obtido da cavidade articular de animais com sinovite (Figura 5, painéis A-D). Contudo, o pré-tratamento dos animais com PGly não apenas falhou em reduzir as concentrações dessas células, mas também ocasionou um aumento significativo do número de macrófagos no lavado articular (Figura 5, painel D).

Do mesmo modo, o aumento da atividade de MPO foi constatado no lavado sinovial coletado do joelho dos animais com sinovite quando comparado com o fluido obtido dos animais cuja cavidade articular recebeu salina (Tabela 2, n=6/cada grupo). Tal aumento foi significativamente reduzido pelo pré-tratamento dos animais com LR (Tabela 2, n=6) ou indometacina (Tabela 2, n=4). Todavia, o pré-tratamento com a PGly não reduziu significativamente essa resposta (Tabela 2, n=4).

Figura 5. Efeito do tratamento com o LR e a PGly sobre o influxo de leucócitos na cavidade articular. Os animais foram pré-tratados com LR (3,6 $\mu\text{mol/cavidade}$, $n=5$), PGly (53 $\mu\text{mol/cavidade}$, $n=4$), indometacina (6 mg/kg i.p; $n=5$) ou veículo ($n=5$). Um grupo recebeu a injeção i. art. de salina estéril ($n=4$) e os demais a injeção i. art. de CGN (50 μl ; 3%). A contagem de leucócitos totais (painel A), neutrófilos (painel B), linfócitos (painel C) e macrófagos (painel D) foi expressa como média $\pm$ e.p.m (células $\times 10^5$ / cavidade). * $P<0,05$ - *** $P<0,001$ vs. ratos tratados com veículo. (ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

3.1.4 Análise histológica

A análise histológica da articulação de ratos saudáveis (Sham) revelou uma aparência morfológica normal, cuja sinóvia mostrou-se íntegra (Figura 6, painel A), e a graduação do escore histológico foi igual a 0 (Figura 7). No grupo sinovite injetado com a CGN via i. art., a análise histológica revelou um infiltrado celular intenso e difuso na membrana sinovial, com predomínio de neutrófilos e aparência atípica da sinóvia, que também exibiu focos de exsudato fibrinoso, caracterizado como edema (Figura 6, painel B). Tal aparência revelou um processo inflamatório intenso, cujo escore atribuído foi > 6 (Figura 7).

Nas articulações dos animais com sinovite e pré-tratados com o LR (Figura 6, painel C) ou indometacina (Figura 6, painel E), tanto o infiltrado de células inflamatórias quanto a área edematosa (exsudato fibrinoso) foi significativamente menor (escore < 3) que o grupo com sinovite pré-tratado com o veículo (Figura 7). Também não foi observada hiperplasia da sinóvia nesse grupo de animais. Nas articulações dos animais com sinovite pré-tratados com a PGly não foram observadas melhoras do quadro inflamatório (Figura 6, painel D) e, conseqüentemente, do escore histológico (Figura 7), o qual mostrou-se similar ao observado nos animais com sinovite e tratados com o veículo (Figura 6, painel B e Figura 8).

Figura 6. Microfotografias das articulações do joelho de ratos sham, controle e com sinovite na vigência e ausência dos tratamentos com o LR, indometacina e PGly. Os Painéis A (1, 2 e 3) mostram a articulação do rato Sham injetado com a salina, a qual exibe características histológicas normais com membrana sinovial intacta e sem sinais de inflamação (as setas pretas indicam células residentes). Os painéis B (1, 2 e 3) ilustram a articulação de rato com sinovite injetado com a CGN, revelando resposta inflamatória intensa. A área do quadrado no painel B2 (ampliada no painel 3) mostra a presença de células polimorfonucleares (setas pretas) e exsudato plasmático. Os painéis C (1, 2 e 3) mostram que a migração de polimorfonucleares nos animais tratados com LR antes da injeção da CGN foi reduzida e mais circunscrita, cuja sinóvia apresenta baixa celularidade e não existem sinais importantes de exsudato. Os painéis D (1, 2 e 3) ilustram alto grau de migração leucocitária na cavidade articular dos ratos com sinovite e pré-tratados com a PGly. A área do quadrado no painel D2 (ampliada no painel D3) mostra em detalhes a predominância das células polimorfonucleares (setas pretas) e exsudato plasmático. Nos painéis E (1, 2 e 3), o animal com sinovite pré-tratado com a indometacina exibiu sua sinóvia com sinais reduzidos de inflamação e as células polimorfonucleares estão restritas em pequenas áreas, como evidenciado no painel E3 (setas pretas). Em todas as amostras analisadas não foram observadas modificações morfológicas nas estruturas óssea e cartilaginosa. As lâminas foram coradas com H&E e as imagens foram capturadas sob microscopia de luz de baixa (50X, coluna 1), média (100X, coluna 2) e alta intensidade (640X, coluna 3). Palavras-chaves: AC:cartilagem articular; CJ: cavidade articular; M: menisco; SM: membrana sinovial; T: tibia.

Figura 7. Efeito do tratamento com o reagente de Lawesson e DL-Propargilglicina sobre o escore histológico. Os animais com sinovite injetados com a CGN foram pré-tratados com LR (3,6 $\mu\text{mol/}$ cavidade art., $n=5$), DL-propargilglicina (PGly; 53 $\mu\text{mol/}$ cavidade art., $n=5$), indometacina (6 mg/kg i.p, $n=4$) ou veículo ($n=5$). Um grupo isolado recebeu apenas a injeção i. art. de salina estéril ($n=4$). Os resultados foram expressos pela mediana, valor mínimo e máximo do escore histológico. * $P<0,05$ vs. animais tratados com veículo. (ANOVA não paramétrica, teste kruskal-wallis, seguido de teste de múltipla comparação Dunn).

3.1.5 Efeito do doador e inibidor da produção de H_2S sobre a celularidade na medula óssea de ratos com sinovite

A figura 8 mostra que a contagem de células totais na medula dos ratos Sham não foi diferente do número de células totais obtido nos animais com sinovite tratados com veículo (Figura 8, painel A). O pré-tratamento dos animais com indometacina (mas não com o LR e PLGly) diminuiu de forma significativa a contagem da celularidade total na medula (Figura 8, painel A).

Em relação à contagem diferencial, o número de mononucleares (Figura 8, painel B), neutrófilos imaturos (Figura 8, painel C), eosinófilos (maturados e imaturos; Figura 8, painéis E e F) na medula dos ratos Sham não foi diferente da obtida nos animais com sinovite tratados com veículo. O pré-tratamento com indometacina diminuiu significativamente o número de neutrófilos imaturos na medula ($P < 0,05$; mas não o número de mononucleares e eosinófilos) em relação ao grupo veículo. A contagem destas células na medula dos animais pré-tratados com LR ou PGly não foi diferente do veículo (Figura 8, painéis B, C, E e F).

Quanto à contagem de neutrófilos maturados, o número destas células no grupo de animais com sinovite aumentou significativamente ($P < 0,05$) em comparação ao grupo Sham (Figura 8, painel D). Os animais com sinovite pré-tratados com o LR ou indometacina reduziu significativamente o número de neutrófilos na medula óssea ($P < 0,05$). Nos animais pré-tratados com PGly, o número de neutrófilos não foi diferente em relação ao grupo veículo (Figura 8, painel D).

Figura 8. Efeito do tratamento com o reagente de Lawesson e DL-Propargilglicina sobre a celularidade na medula óssea. Os animais foram pré-tratados com LR (3,6 μ mol /art., n=5), PGly (53 μ mol/art., n=5), indometacina (6 mg/kg i.p; n=5) ou veículo (n=5). Um grupo separado de animais recebeu a injeção i.art. de salina (n=4). A contagem de leucócitos totais (painel A), monócitos (painel B), neutrófilos imaturos (painel C), neutrófilos maduros (painel D), eosinófilos imaturos (painel E) e maduros (painel F). Os resultados foram expressos como a média $\pm$ e.p.m de células (x10⁷/fêmur) #P<0,05 vs. Sham e *P<0,05 vs. veículo. (ANOVA de uma via seguido pelo *t*-teste de Bonferroni).

3.1.6 Avaliação da celularidade no sangue periférico de animais com sinovite na ausência e vigência do LR, indometacina e PLGly

A figura 9 mostra que a contagem de células totais no sangue periférico dos ratos Sham não foi diferente do número de células totais obtido nos animais com sinovite tratados com o veículo. O pré-tratamento dos animais com o LR, indometacina ou PLGly não modificou, de forma significativa, a contagem da celularidade total. No entanto, o número de células polimorfonucleares (neutrófilos), mas não as células mononucleares, no grupo de animais com sinovite aumentou significativamente ($P < 0,05$) em comparação ao grupo Sham.

O pré-tratamento dos animais com sinovite com o LR ou indometacina reduziu significativamente o número de células polimorfonucleares circulantes ($P < 0,05$), mas não modificou a contagem de células mononucleares (Figura 9). A contagem celular no sangue periférico dos animais pré-tratados com não foi diferente do grupo veículo (Figura 9).

Figura 9. Efeito do tratamento com o reagente de Lawesson e DL-Propargilglicina sobre a celularidade no sangue periférico de ratos com sinovite induzido pela carragenina. Os animais foram pré-tratados com o LR (3,6 μ mol/art., n=5), PGly (53 μ mol/art., n=5), indometacina (6 mg/kg i.p; n=5) ou veículo (n=5). Um grupo isolado de animais (Sham) recebeu a injeção i. art de salina (n=5), e os demais a injeção i. art. de CGN (50 μ l, 3%). Os resultados foram expressos como a média $\pm$ e.p.m de leucócitos ($\times 10^5$ /ml), [#]P<0,05 vs. Sham e ^{*}P<0,05 vs. veículo. (ANOVA de *uma via* seguido pelo *t*-teste de Bonferroni).

3.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos

3.2.1 Produção de citocinas no lavado articular de ratos com sinovite na ausência e presença de doador e inibidor de H_2S

No lavado sinovial de ratos com sinovite a concentração de IL-1 β foi significativamente aumentada quando comparado ao grupo Sham (Tabela 2). Ao contrário, baixa concentração de IL-10 foi observada nesses mesmos animais (Tabela 2, n=5).

O pré-tratamento dos animais com o LR (n=5) ou indometacina (n=5) reduziu significativamente os níveis de IL-1 β , mas aumentou a concentração de IL-10 (Tabela 2). Já o pré-tratamento dos animais com a PGly não afetou as concentrações dessas citocinas (Tabela 2; n=5). Sob as nossas condições experimentais, nem concentrações de TNF- α e nem de IL-6 foram mensuráveis no lavado sinovial de ratos com sinovite (o limite de detecção do kit foi 1,95 e 0,98 pg/ml, respectivamente).

Tabela 2 - Efeito dos tratamentos com o reagente de Lawesson e DL-Propargilglicina sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO), concentrações de citocinas e NO_x⁻ no lavado sinovial de ratos com sinovite evocada por injeção i. art. da CGN Os animais injetados com a CGN foram pré-tratados com LR (3,6 µmol/art.), PGly (53 µmol/art.), indometacina (6 mg/ kg i.p) ou veiculo. Quatro horas após, a atividade de MPO e concentrações das citocinas IL-1β e IL-10 e NO_x⁻ no lavado sinovial foram avaliadas. Os dados estão expressos como a média ± e.p.m para n animais. *P<0,05 - ***P<0,001 vs. Sham e #P<0,05 - ###P<0,001 vs. Veiculo . (ANOVA de uma via seguido pelo *t*-teste de Bonferroni)

Grupos experimentais	Atividade MPO (U/cavidade)	IL-1β (pg /ml)	IL-10 (pg/ml)	NO_x⁻ (µM)
Sham	5 ± 1	7 ± 1	ND	26 ± 1
CGN + Veic	281 ± 42***	1632 ± 385***	41 ± 6	57 ± 4***
CGN + LR	74 ± 10###	716 ± 131 [#]	86 ± 10 [#]	58 ± 2
CGN + PGly	257 ± 37	1605 ± 325	26 ± 7	82 ± 6 ^{##}
CGN + Indo	79 ± 13 ^{##}	721 ± 53 ^{##}	214 ± 20 ^{###}	46 ± 4

ND: não detectável

3.2.2 Avaliação da atividade da enzima conversora de IL-1 β (Caspase-1)

A figura 10 demonstra que na membrana sinovial de ratos com sinovite induzida pela CGN foi observado um aumento significativo da clivagem do peptídeo AFC em relação ao grupo de animais saudáveis cuja articulação recebeu salina.

O pré-tratamento com o LR, assim como com a indometacina, reduziu significativamente a clivagem desse peptídeo. Já o pré-tratamento com a PGly (n=5) não causou alteração na clivagem do peptídeo em relação ao grupo veiculo (Figura 10).

Figura 10. Efeito do tratamento com o reagente de Lawesson e DL-propargilglicina sobre a atividade da enzima conversora de IL-1 β na membrana sinovial de ratos com sinovite. Os animais injetados i. art. com a CGN foram pré-tratados com o LR (3,6 μ mol/cavidade art., n=5), a PGly (53 μ mol/ cavidade art., n=5), indometacina (6 mg/kg i.p., n=5) ou veículo (n=5). Um grupo controle recebeu somente a injeção i.art. de salina estéril (n=5). Os dados da atividade da caspase-1 foram expressos como média $\pm$ e.p.m. de unidade arbitrária de fluorescência / segundo. ***P<0,001 vs. salina e #P<0,05 vs. veículo. (ANOVA de uma via seguido do teste Bonferroni múltipla comparação).

3.2.3 Avaliação da atividade da enzima cNOS e iNOS no tecido sinovial de ratos com sinovite na ausência e presença do doador e inibidor do H₂S

A atividade da enzima NOS constitutiva (Ca²⁺-dependente) no homogenato da membrana sinovial de ratos com sinovite frente à CGN foi significativamente reduzida ($\cong$ 60%) em relação ao grupo Sham (Figura 11, painel A). O pré-tratamento dos animais com o LR, mas não com a PGly ou indometacina, reverteu de forma significativa a atividade da NOS constitutiva em relação ao grupo pré-tratado com o veículo (Figura 11, painel A).

A figura 11, painel B ilustra que o homogenato da membrana sinovial de ratos com sinovite pré-tratados com o veículo exibiu aumento da atividade da enzima iNOS (Ca²⁺-independente) quando comparado com o grupo Sham. O aumento dessa atividade não foi reduzido pelo pré-tratamento com LR ou indometacina, muito embora este foi potencializada pelo inibidor da CSE, a PGly, em relação ao grupo com sinovite tratado com o veículo (Figura 11, painel B).

Figura 11. Efeito do tratamento com o reagente de Lawesson e DL-propargilglicina sobre a atividade das enzimas NO sintase na membrana sinovial de ratos com sinovite induzida pela CGN. Os animais injetado com CGN foram pré-tratados com o LR (3,6 μmol / cavidade art, n=5), PGly (53 μmol /cavidade art, n=5), indometacina (6 mg/kg i.p., n=5) ou veículo (n=5). Um grupo isolado recebeu apenas a injeção i.art. de salina estéril (n=5). As atividades das NOS dependente (painel A) e independente de Ca^{2+} (painel B) foram expressas como média $\pm$ e.p.m. de atividade da enzima em pmol / min / mg de proteína. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs. Sham e ## $P < 0.01$ vs. veículo. (ANOVA de uma via seguido pelo *t*-teste de Bonferroni).

3.2.4 Efeitos do doador e inibidor do H₂S sobre a concentração de NO_x⁻ no lavado sinovial de ratos com sinovite

As concentrações de NO_x⁻ (nitrito + nitrato) no lavado sinovial dos animais com sinovite foram significativamente maiores (P<0,001) em relação às concentrações encontradas nos animais do grupo Sham (Tabela 2; n= 4).

O pré-tratamento dos animais com sinovite com o doador de H₂S não modificou de forma significativa a produção de NO_x⁻ no lavado desses animais quando comparado ao grupo com sinovite pré-tratado com o veículo (Tabela 2). Já o pré-tratamento dos animais com a PGly aumentou marcadamente a concentração de NO_x⁻ no lavado sinovial dos animais com sinovite em relação ao grupo sinovite tratado somente com o veículo (Tabela 2; n=4).

3.2.5 Efeitos do doador e inibidor do H₂S sobre a nitração de proteínas (3-NT) na membrana sinovial de ratos com sinovite

A análise do conteúdo de 3-NT na membrana sinovial de ratos com sinovite induzida pela CGN (Figura 12, painéis A e B), revelou um aumento da nitração de resíduos proteicos de 3-NT quando comparado ao grupo Sham.

O pré-tratamento dos animais com o LR ou indometacina não reduziu de forma significativa o conteúdo proteico de 3-NT no homogenato da membrana sinovial dos animais com sinovite (Figura 12, painéis A e B). Da mesma forma, o pré-tratamento dos animais com a PGly não modificou significativamente essa resposta (Figura 12, painéis A e B).

Figura 12. Efeito do tratamento com o reagente de Lawesson e DL-propargilglicina sobre o conteúdo de 3-NT no homogenato da membrana sinovial de ratos com sinovite induzida por carragenina. Os animais foram pré-tratados com o LR (3,6 μmol /art., n=5), PGly (53 μmol /art., n=5), indometacina (6 mg/kg i.p; n=5) ou veículo (n=5). Um grupo isolado de animais recebeu a injeção i. art de salina (n=4), enquanto os demais grupos receberam a injeção i. art. de CGN (50 μl , 30%). O painel A, demonstra a imagem representativa da membrana de nitrocelulose contendo as bandas positivas a 3 NT, enquanto o painel B ilustra a respectiva análise densitométrica. Os resultados foram expressos como a média $\pm$ e.p.m de unidade arbitrária de 3-NT. (ANOVA de uma via seguido pelo *t*-teste de Bonferroni).

3.2.6 Efeitos do doador e inibidor do H₂S sobre a ativação do NF-κB na membrana sinovial de ratos com sinovite

A análise densitométrica do ensaio de mobilidade eletroforética do NF-κB no homogenato de membrana sinovial de ratos com sinovite induzida pela CGN demonstrou aumento significativo dessa ativação quando comparada ao grupo Sham (Figura 13, painéis A e B).

O tratamento prévio dos animais com o LR, a PGly ou indometacina não modificou significativamente a atividade do NF-κB na membrana sinovial dos animais com sinovite em relação ao grupo que recebeu o veículo do tratamento (Figura 13, painéis A e B).

Figura 13. Efeito do tratamento com o reagente de Lawesson e DL-propargilglicina sobre a ativação do NF-κB no homogenato da membrana sinovial de ratos com sinovite induzida por carragenina. Os animais foram pré-tratados com o LR (3,6 μmol/art., n=4), PGly (53 μmol/art., n=4), indometacina (6 mg/kg i.p; n=4) ou veículo (n=4). Um grupo isolado de animais recebeu a injeção i. art. de salina (n=4), enquanto os demais grupos receberam a injeção i. art. de CGN (50 μl, 30%). O painel A demonstra a imagem representativa do ensaio *supershift* ilustrando as bandas positivas ao NF-κB, enquanto o painel B ilustra a respectiva análise densitométrica. Os resultados foram expressos como a média ± e.p.m de unidade arbitrária do NF-κB. **P<0,01 - ***P < 0,001 vs. Sham. (ANOVA de uma via seguido pelo t-teste de Bonferroni).

3.2.7 Efeitos do doador e inibidor de H₂S sobre a ativação da AP-1 na membrana sinovial de ratos com sinovite

A figura 14 (painel A e B) mostra a análise densitométrica do ensaio de mobilidade eletroforética da AP-1 no homogenato de membrana sinovial de ratos com sinovite induzida pela CGN, onde não se observa aumento significativo dessa ativação quando comparada ao grupo Sham (Figura 14, painéis A e B).

O tratamento prévio dos animais com a PGly (mas não com LR, ou indometacina) aumentou significativamente a atividade da AP-1 na membrana sinovial dos animais com sinovite em relação ao grupo que recebeu o veículo do tratamento (Figura 14, painéis A e B).

Figura 14. Efeito do tratamento com o reagente de Lawesson e DL-propargilglicina sobre a ativação da AP-1 no homogenato da membrana sinovial de ratos com sinovite induzida por carragenina. Os animais foram pré-tratados com o LR (3,6 μ mol/art., n=4), PGly (53 μ mol/art., n=4), indometacina (6 mg/kg i.p; n=4) ou veículo (n=4). Um grupo isolado de animais recebeu a injeção i. art de salina (n=3), enquanto os demais grupos receberam a injeção i. art. de CGN (50 μ l, 30%). O painel A demonstra a imagem representativa do ensaio *supershift* ilustrando as bandas positivas a AP-1, enquanto o painel B ilustra a respectiva análise densitométrica. Os resultados foram expressos como a média $\pm$ e.p.m de unidade arbitrária de AP-1. [#]P<0,05 vs. Sham e ^{*}P < 0,05 vs. veículo (ANOVA de uma via seguido pelo t-teste de Bonferroni).

3.2.8 Efeitos dos tratamentos com o doador e inibidor do H_2S sobre a concentração de sulfeto total no lavado articular e plasma de ratos com sinovite

As figuras 15, painéis A e B ilustram respectivamente que, 4 horas após a injeção i. art. de CGN, as concentrações de sulfeto total no lavado articular (n=5) e plasma (n= 4) dos animais com sinovite não diferiram significativamente dos valores obtidos no grupo controle, que recebeu a injeção i. art. de salina.

O tratamento prévio dos animais com LR ou indometacina não alterou a concentração de sulfeto total (i.e. $S^{2-} + HS^- + H_2S$) avaliada no lavado sinovial quando comparado ao grupo com sinovite, que recebeu o veículo (Figura 15 A). O pré-tratamento com a PGly reduziu significativamente ($P<0,05$) a concentração de sulfeto total (em torno de 75%) no tecido articular (Figura 15, painel A). Nenhum dos tratamentos afetou a concentração de sulfeto total circulante, em relação ao grupo sinovite sem tratamento (Figura 15 painéis A e B).

Figura 15. Efeitos do tratamento com o reagente de Lawesson e DL-propargilglicina sobre a concentração de sulfeto total no lavado sinovial e plasma de ratos com sinovite. Os animais injetados i. art. com a CGN foram pré-tratados com o LR (3,6 μmol / cavidade art., n=4-5), a PGLy (53 μmol /art., n=4), indometacina (6 mg/kg i.p, n=4-5) ou veículo (n=4-5). Um grupo controle recebeu apenas a injeção i.art. de salina estéril (n=4-5), enquanto os demais receberam CGN (50 μl , 3%). Os níveis de sulfeto total no lavado sinovial (painel A) e plasma (painel B) foram expressos (em μM) como média $\pm$ e.p.m. *P<0,05 vs. Sham e #P<0,05 vs. animais tratados com veículo. (ANOVA de uma via seguido pelo t-teste de Bonferroni).

3.2.9 Cinética de liberação de sulfeto total pelo LR no de joelho de ratos naive

A figura 16 demonstra que decorridos 60min. da injeção i. art. do LR no joelho de ratos naive, foram mensuradas concentrações elevadas de sulfeto total no lavado articular dos ratos em relação à concentração basal. Constatou-se que nos animais injetados com LR, o pico máximo de liberação do sulfeto total ($65 \pm 12 \mu\text{M}$) ocorreu logo após 10min. A partir desse intervalo, a concentração de sulfeto total decaiu de forma gradual. A análise do tempo de $T_{1/2}$ do LR foi $\sim 22\text{min}$.

Figura 16. Cinética de liberação de sulfeto total pelo reagente de Lawesson na cavidade articular de ratos saudáveis. Os dados foram expressos como média $\pm$ e.p.m. do logaritmo da concentração (μM) de sulfeto total para $n=3$ / cada intervalo.

3.2.10 Determinação da cinética de atividade das enzimas geradoras de sulfeto no tecido articular de ratos naïve

Conforme ilustra a figura 17 (painel A), a incubação da membrana sinovial (n=6) de ratos naïve com o inibidor da CSE (PGly, 2mM) ou da CBS carboximetil-hidroxilamina hemihidroclorido (CHH, 3mM) reduziu substancialmente e de forma linear, a fluorescência (UA) e, conseqüentemente, a geração de H₂S *in vitro* nas amostras da membrana desses animais quando comparado a resposta obtida nas amostras do grupo controle.

A quantidade de H₂S gerada nas amostras da membrana sinovial do grupo controle foi superior a 200 nmol/g/hora (Figura 17, painéis B, C e D). Na vigência do tratamento da membrana sinovial com o inibidor da CSE (PGly), a geração de H₂S em função do tempo (60, 90 e 120min) foi parcialmente inibida ($\cong$ 50%; P<0,05) em comparação ao grupo controle (Figura 17, painéis B, C e D). De forma mais potente, o inibidor da CBS (CHH) promoveu redução de, aproximadamente 70% (P<0,01), da geração de H₂S quando comparado ao produto formado nas amostras do grupo controle (Figura 17, painéis B, C e D).

Figura 17. Cinética das atividades enzimáticas da CSE e CBS na membrana sinovial de ratos saudáveis. As amostras foram pré-incubadas (-20 min) com a PGly (inibidor da CSE, 2 mM), CHH (inibidor da CBS, 3mM) e o respectivo controle. Os painéis A, B, C e D demonstram a biossíntese de H₂S em função do tempo da reação (60 90 e 120 minutos). Os dados do painel A foram plotados com base na equação $Y=B_{max} \cdot X / (K_d + X)$, e os resultados estão expressos como unidades arbitrárias de fluorescência (DO 290/695 nm) de excitação e emissão, respectivamente. Os dados dos painéis B, C e D representam a concentração de síntese de H₂S em função do tempo e estão expressos como média $\pm$ e.d.m. *P<0.05. **P<0.01 vs. controle (ANOVA de uma via seguido do teste Bonferroni).

3.2.11 Determinação da atividade das enzimas geradoras de sulfeto na membrana sinovial de ratos com sinovite

A figura 18 ilustra que a quantidade de H₂S gerada nas amostras da membrana sinovial de ratos Sham foi semelhante à geração desse gás na membrana sinovial de ratos com sinovite induzida pela CGN.

Na vigência do pré-tratamento i. art. com o LR ou PGly (ou indometacina, i.p.), a geração de H₂S nos animais com sinovite decorrente da injeção i. art. com a CGN não foi diferente do grupo controle ou Sham (Figura 18).

Figura 18. Efeitos dos tratamentos com o reagente de Lawesson e DL-propargilglicina sobre a geração de H₂S *in vitro* na membrana sinovial de ratos com sinovite. Os animais injetados i. art. com a CGN foram pré-tratados com o LR (3,6 µmol/cavidade art., n=6), PGly (53 µmol/art., n=6), indometacina (6 mg/kg i.p., n=6) ou veículo (n=6). Um grupo controle recebeu apenas injeção i.art. de salina estéril (n=6). A atividade foi expressa como média ± e.p.m. de nmol /g/h de H₂S (ANOVA de uma via seguido pelo *t*-teste de Bonferroni).

3.2.12 Avaliação da expressão proteica das enzimas geradoras de sulfeto no tecido articular

A figura 19 (painéis A e B) demonstra que a expressão protéica das enzimas CSE (~ 45 kDa; painel A) e CBS (~ 63 kDa; painel B) na membrana sinovial de ratos Sham, não foi diferente do resultado obtido nos animais com sinovite induzida por CGN.

De forma semelhante, o pré-tratamento dos animais com o LR, indometacina ou PGly não modificou a expressão destas proteínas quando comparado ao grupo com sinovite tratado com o veículo ou do grupo Sham (Figura 19, painéis A e B).

Figura 19. Efeitos dos tratamentos com o reagente de Lawesson e DL-propargilglicina sobre a expressão protéica das enzimas CSE e CBS na membrana sinovial de ratos com sinovite induzida pela carragenina. Os animais foram pré-tratados com o LR (3,6 μ mol /art., n=4), a PGly (53 μ mol/art., n=4), indometacina (6 mg/kg i.p.; n=3) ou veículo (n=4). Um grupo isolado de animais recebeu a injeção i. art. de salina (n=4). O painel A ilustra a análise densitométrica da expressão protéica da CSE na membrana sinovial dos grupos e a respectiva imagem do gel (Western blot) para CSE e o controle interno tubulina, enquanto que o painel (B) representa a expressão da CBS. Os resultados foram expressos como a média $\pm$ e.p.m de unidades arbitrárias de CSE ou CBS. (ANOVA de uma via seguido pelo *t*-teste de Bonferroni).

4 DISCUSSÃO

Apesar de controversos, estudos recentes *in vivo* e *in vitro* sugerem que o mediador gasoso H₂S está envolvido na modulação de processos inflamatórios. Nesse sentido, o presente trabalho demonstra que a administração i. art. do doador de H₂S, LR, reduziu, de maneira significativa, o processo inflamatório, a nocicepção e hipernocicepção observada na pata traseira de ratos com sinovite induzida pela injeção i. art. de CGN. As propriedades anti-nociceptiva e anti-hipernociceptiva do LR neste modelo experimental foi avaliada via dois testes comportamentais: grau de escore motor, avaliado pelo grau de mobilidade dos animais, e alodinia secundária mecânica na pata traseira ipsilateral, via aparato de von Frey eletrônico.

A inibição da CSE, uma das enzimas responsáveis pela produção endógena do H₂S, pelo PGly, reduziu a concentração de sulfeto total ($\cong$ 75%) no tecido articular dos animais com sinovite. Todavia, tal tratamento não afetou a progressão da doença em termos de edema, dor (alodinia secundária), migração leucocitária e produção de citocinas, muito embora aumentou, de forma significativa, o número de macrófagos e outros parâmetros bioquímicos na cavidade articular de ratos com sinovite, tais como a produção de NO_x- e ativação do fator de transcrição AP-1.

De acordo com a literatura, até o presente momento, não existem resultados anteriores que suportam o efeito anti-nociceptivo (e anti-alodinia secundária) do H₂S exógeno na sinovite e / ou artrite induzida pela CGN. Embora o efeito antiinflamatório de doadores de H₂S no modelo de artrite induzida por CGN e kaolin foi demonstrado em ratos, o grupo de Andruski et al. (2008) não observou nenhuma ação analgésica / anti-nociceptiva importante desse gás. As razões para tal divergência não estão claras, mas é importante ressaltar que o nosso modelo de inflamação articular foi desencadeado por uma única injeção i. art. de CGN e a nocicepção (e alodinia secundária) foi avaliada 4 horas depois, o outro grupo usou a mistura de CGN e kaolin, sendo que a análise nociceptiva foi realizada somente 24 horas após.

Por outro lado, divergências entre o efeito anti- e pró-nociceptivo do H₂S foram também observadas em outros modelos experimentais. Por exemplo, o H₂S inibiu a nocicepção colorretal em ratos saudáveis e pós-colite, via ativação de canais de K⁺

dependente de ATP, e também da produção de NO (DISTRUTTI et al., 2006). De acordo com Cunha et al. (2008), a administração sistêmica de NaHS reduziu a hipersensibilidade mecânica induzida por LPS e PGE₂ em pata de camundongos, mas não modificou a hipernocicepção térmica, indicando um possível efeito anti-nociceptivo periférico desse gás. Já Maeda et al. (2009) sugerem que o efeito pró-nociceptivo do H₂S deve ocorrer via sensibilização/ativação dos canais de Ca²⁺ do tipo T. No conjunto, este bloco de resultados mostram que o H₂S desempenha um papel dual na patogenia da dor inflamatória, na qual evidencia-se um balanço pró e anti-nociceptivo, que parece ser regulado pela quantidade de H₂S suplementado bem como pelo local de geração deste.

Por seu turno, a participação do H₂S na resposta inflamatória parece ser também influenciada pelo influxo de células inflamatórias, como os leucócitos. No que tange ao influxo de leucócitos (predominantemente neutrófilos) na cavidade articular, e o concomitante aumento dessas células na medula óssea e sangue periférico dos animais com sinovite, os dados deste estudo demonstraram que o pré-tratamento com LR ou indometacina reduziu substancialmente a contagem dessas células no local e, também, nos demais compartimentos, indicando que a suplementação exógena de H₂S no local da agressão (cavidade articular) dos animais com sinovite suprimiu o processo de mobilização leucocitária da medula óssea para a cavidade articular. Ademais, tanto o aumento da atividade de MPO no fluido sinovial quanto as alterações morfológicas (ex.: presença de exsudato inflamatório e acúmulo de neutrófilos na camada íntima e sub-íntima da sinóvia) do joelho dos animais com sinovite foram significativamente reduzidas pelo LR ou indometacina, mas não pela PGly.

Dados anteriores de Zanardo et al. (2006) no modelo de bolsa de ar cutânea em roedores corroboram, em parte, este achado, visto que tais autores observaram, que o influxo leucocitário induzido por CGN foi inibido pelo doador de H₂S; mas, ao contrário, foi exacerbado pela inibição da síntese de H₂S, via mecanismo dependente da ativação de canais de K⁺ dependentes de ATP. Outrossim, Andruski et al. (2008) revelaram que o doador de H₂S reduziu a adesão leucocitária e aumentou a velocidade de rolamento dessas células nos vasos da articulação de camundongos com artrite induzida por CGN

/ kaolin. O mecanismo de ação pelo qual o H₂S inibe o infiltrado leucocitário também depende da participação de moléculas de adesão intracelulares (ICAM)-1 bem como parece estar relacionado com a apoptose de neutrófilos (MARIGGIÒ et al., 1998). Já no modelo de gastropatia em ratos induzida por AINES, Fiorucci et al. (2005) mostraram que a lesão da mucosa gástrica foi significativamente reduzida pelo doador de H₂S (NaHS), uma vez que este reduziu a concentração de marcadores inflamatórios, incluindo o TNF- α e ICAM-1.

É sabido que a cinética de recrutamento de células inflamatórias da medula óssea para o foco inflamatório frente a um estímulo lesivo segue uma sequência de eventos, que depende da elaboração de mediadores endógenos, tais como quimiocinas e citocinas (IL-1 β e TNF α). Além disto, os leucócitos podem armazenar muitos grânulos protéicos secundários com capacidade de ativar a produção de fatores quimiotáticos (MEDZHITOF, 2008). É importante salientar que a IL-1 β é sintetizada como pró-molécula inativa por diversas células (i.e. monócitos, macrófago, neutrófilos e células dendríticas; Black et al., 1988) e, assim, para tornar-se ativa, essa pró-molécula precisa ser clivada, por um processo catalisado pela enzima caspase-1, também conhecida como enzima conversora de IL-1 β . Os principais papeis dessa citocina envolvem a resposta imune inata, defesa contra patógenos e inflamação (NEMUNAITIS et al., 1994).

A importância da IL-1 β na fisiopatologia da AR tem sido amplamente discutida devido a grande capacidade desta em estimular a produção de mediadores envolvidos na destruição da matriz extracelular, cartilagem e reabsorção óssea. De fato, o recente emprego da terapia biológica com anti-IL-1 β e antagonista de seu receptor confirma tais evidências. Da mesma forma, o envolvimento da IL-10 na AR tem sido sugerido, pois acredita-se que esta suprime a resposta imunológica, bem como neutraliza células inflamatórias (HOWARD e O'GARRA, 1992). Por exemplo, a injeção de IL-10 em animais com artrite reduziu alguns sinais inflamatórios (KATSIKIS et al., 1994; PRAKKEN et al., 2002) e preveniu a destruição da cartilagem articular destes (LUBBERTS et al., 1998). Por outro lado, a inibição da IL-10 aumentou a biossíntese de

IL-1 β e TNF- α na cavidade articular dos animais, confirmando essa citocina age como supressor da produção de citocinas pró-inflamatórias (KATSIKIS et al., 1994; PRAKKEN et al., 2002).

Neste estudo, a atividade da enzima conversora de IL-1 β está aumentada na membrana sinovial concomitantemente ao aumento da migração de neutrófilos e aumento das concentrações de IL-1 β (mas não de TNF- α ou IL-6) e IL-10 (discreta) no lavado sinovial dos animais com sinovite. Tanto o pré-tratamento com o LR quanto com indometacina (mas não PGly) reduziu, de forma significativa, a migração de neutrófilos da medula óssea para cavidade articular bem como inibiu parcialmente, mas de forma significativa, a atividade da enzima conversora de IL-1 β (caspase-1) concentração de IL-1 β . Ademais, esse tratamento aumentou a produção de IL-10 no lavado sinovial dos animais com sinovite, indicando que o H₂S possui um controle central importante na regulação simultânea da biossíntese de IL-10 e inibição da IL-1 β e, conseqüentemente, na resposta inflamatória (influxo e migração de neutrófilos) na articulação de ratos com sinovite induzida pela CGN. Corroborando este resultado, Asadullah et al. (2003) relatam que a IL-10 suprimiu moléculas de adesão, células inflamatórias (ex.: neutrófilos) e alguns mediadores pró-inflamatórios, incluindo a IL-1 β .

Todavia, a inibição da geração endógena de H₂S não modificou a população de leucócitos (em particular, de monócitos) na medula óssea (e sangue periférico) dos animais com sinovite, de forma a justificar o aumento da população de macrófagos na articulação dos animais com sinovite pré-tratados com a PGly. É possível que o aumento de macrófagos no fluido sinovial desses animais seja decorrente do tráfico local de células residentes, como os sinoviócitos do tipo A. Assim, é plausível sugerir que a produção fisiológica do H₂S, também, exerce controle na homeostase dos macrófagos residentes.

Nesse sentido, postula-se que algumas células da cavidade articular, como os sinoviócitos do tipo A e B, células musculares lisas vasculares, condrócitos articulares e osteoblastos, quando estimuladas por IL-1 β e TNF α , produzem NO e exibem aumento significativo do conteúdo de RNAm para iNOS (GRABOWSKI et al., 1996, 1997). Foi

interessante constatar que na cavidade articular dos animais com sinovite, concentrações elevadas de NO_x^- e aumento da atividade da iNOS (e redução da NOS) foram mensurados. Isto vai de encontro com dados clínicos, que relatam aumento das concentrações de NO_x^- no fluido sinovial e no plasma de pacientes com AR ou osteoartrite (FARRELL et al., 1992). O aumento da expressão da iNOS foi também detectado em sinoviócitos articulares, macrófagos e condrócitos de pacientes com AR (YONEKURA et al., 2003). Outros estudos mostram que inibidores da atividade da iNOS reduzem a gravidade da artrite em animais de experimentação (STEFANOVIC-RACIC et al., 1995; CONNOR et al., 1995; PELLETIER et al., 1998).

Contudo, nem o aumento da atividade da iNOS e nem as concentrações de NO_x^- nos animais com sinovite foram alteradas pelo pré-tratamento com o LR ou indometacina, muito embora o tratamento com a PGly aumentou significativamente estes parâmetros, indicando um papel para o H_2S endógeno na modulação do NO derivado da iNOS. Ademais, este estudo demonstrou que nenhum dos tratamentos (LR, indometacina ou PGly) afetou o aumento da nitração protéica de resíduos de 3-NT na membrana sinovial dos animais com sinovite. Curiosamente, outros autores observaram que doadores de H_2S reduzem a atividade recombinante da iNOS (KUBO et al., 2007) e a expressão protéica e produção de NO_x^- em linhagem de células RAW264.7 (macrófagos) (OH et al., 2006). No tocante a ausência de efeito da indometacina sobre a produção de NO (e atividade da iNOS), é provável que, assim como demonstraram outros autores, a aspirina, mas não a indometacina, possui a capacidade de bloquear o aumento da expressão da iNOS e a produção de NO em macrófagos frente ao LPS devido sua propriedade de acetilação irreversível sobre a COX-2 (AMIN et al., 1995).

Paralelamente, a mensuração da atividade da NOS dependente de Ca^{2+} na cavidade articular dos ratos com sinovite tratados com o veículo, indometacina ou a PGly mostrou redução marcante desta enzima (>80%). Já o tratamento com o LR reverteu parcialmente esse efeito. Cabe acrescentar que a preservação da atividade da NOS constitutiva controla a interação leucócito-endotélio (KUBES et al., 1991; WAHL et al., 2003). Desta feita, é possível que o aumento do suprimento de H_2S na articulação seja o principal responsável pelo menor influxo celular na articulação dos animais

tratados com o LR via preservação da atividade constitutiva da NOS. Ao refletir sobre os achados deste estudo com relação às atividades da iNOS, produção de NO e da nitração de proteínas, foi impossível não especular que, em parte, é provável que o aumento desses marcadores inflamatórios na cavidade articular dos animais com sinovite não provém dos leucócitos (em particular dos neutrófilos), visto que tais células foram reduzidas pelo tratamento com o LR e indometacina; contudo, estes marcadores não foram afetados pelo LR ou indometacina. Não se pode também excluir a participação das demais células da cavidade articular como fontes alternativas da geração de NO e da nitração protéica.

Por seu turno, é sabido que a IL-1 β estimula a indução da iNOS, a ativação do NF- κ B, metaloproteinases e a produção de eicosanóides em células sinoviais (DAYER et al., 2002). A transcrição dos genes da IL-1 β é regulada por vários mecanismos, entre os quais estão as vias de ativação do NF- κ B (KOENDERS et al., 2006), AP-1 (NAGANUMA et al., 2000; CHOI e LEE, 2010), da família de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKS), tais como a c-Jun N terminal quinase (JNK) e p38MPK (GENG et al., 1996; BALDASSARE et al., 1999). As proteínas componentes do NF- κ B e AP-1 são codificadas por um grupo de genes, denominado genes imediatos precoces, cujas transcrições ocorrem rapidamente e independentemente da síntese de novas proteínas. O fator de transcrição AP-1 regula a expressão de genes envolvidos na diferenciação celular, proliferação, apoptose, inflamação e resposta imunológica (AMEYAR et al., 2003; SHAULIAN et al., 2002), enquanto o NF- κ B regula a expressão de genes que controlam a morte celular programada, adesão celular, proliferação, inflamação e remodelamento tissular (GERONDAKIS et al., 1999; PAHL, 1999; HAYDEN e GHOSH, 2004; BONIZZI e KARIN, 2004; PASPARAKIS et al., 2006), induzindo ou reprimindo ainda a expressão gênica, via ligação a pequenas sequências de DNA, conhecidos como elementos κ B (para revisão: PERKINS, 2007).

No tocante ao efeito do H₂S sobre esses mecanismos intracelulares, recentes evidências *in vivo* e *in vitro* demonstram que, por exemplo, no modelo de isquemia / reperfusão miocárdica, os doadores de H₂S causam efeitos cardioprotetores via

mecanismo decorrente da inibição da fosforilação da MAPK p38 e da translocação do NF- κ B p65 do citosol para o núcleo (SILVARAJAH et al., 2009). Além disto, Whiteman et al. (2010) observaram que em linhagem de células macrofágicas (RAW264.7) estimulada com LPS, o doador de H₂S (GYY4137) inibiu a síntese de vários mediadores pró-inflamatórios (ex.: PGE₂, IL-1 β , IL-6, TNF- α) e estimulou a síntese de IL-10 via mecanismos dependentes da via de NF- κ B/ATF-2/HSP-27. Em culturas de sinoviócitos extraídas de pacientes com AR submetidos à cirurgia de substituição total de joelho, o NaHS reduziu os níveis de IL-6 e a ativação da MAPK (p42/44; KLOESCH et al., 2010). Adiante, o ensaio de *gel shift* revelou na membrana de ratos com sinovite induzida por CGN mostrou um aumento significativo na ativação da via do NF- κ B, mas não do fator AP-1, quando comparado ao grupo Sham. De antemão, pensar-se-ia simplesmente que a via AP-1 não é ativada neste modelo de inflamação. Todavia, considerando que a via AP-1 pertence ao grupo de genes imediatos precoces, era de se esperar que esta estivesse envolvida neste modelo de sinovite, visto tratar-se de um processo inflamatório agudo. Por outro lado, é também provável que o pulso de ativação desta via ocorreu nos momentos iniciais da sinovite e, se isto foi o caso, o registro de tal atividade fica impossível de ser mensurado no período avaliado.

Concomitantemente, este estudo revelou que nenhum dos tratamentos (LR, indometacina e PGly) interferiu com o aumento da ativação da via do NF- κ B, muito embora a PGly aumentou a ativação da via AP-1. Curiosamente, cabe ressaltar que o gene promotor da iNOS apresenta, pelo menos, dois elementos responsivos ao fator AP-1 (KEINANEN et al., 1999; EBERHARDT et al., 1996), cuja ativação desempenha papel crucial na expressão da iNOS. De fato, em células PC12 pré-tratadas com antisense AP-1, o aumento da expressão da iNOS induzida por β -amiloide foi abolida (JANG e SURH, 2005). Além do mais, a aplicação de IL-1 β , IFN- γ e TNF α levou ao aumento da expressão da iNOS em epitélio alveolar (tipo II) humano, via ativação da via AP-1. Tal efeito foi revertido pelo bloqueio do sítio da AP-1 na região promotora da iNOS (KRISTOF et al., 2001). Reforçando tais evidências, Marks-Konczalik et al. (1998) demonstram que o NF- κ B interage sinergicamente com a via AP-1 na ativação do gene promotor da iNOS. No conjunto, esses resultados contribuem para a sugestão de que,

no grupo sinovite pré-tratado com a PGly, as vias do NF- κ B e AP-1 estão envolvidas no aumento da atividade da iNOS.

Por outro lado, os resultados disponíveis ainda não permitem estabelecer uma conexão firme e direta entre citocinas (IL-1 β e IL-10), iNOS e os fatores NF- κ B e AP-1; pois, se por um lado, o pré-tratamento com o LR reduziu a atividade de caspase-1 (e das concentrações de IL-1 β) e aumentou a concentração da IL-10; por outro lado, não afetou a atividade da iNOS (ou concentração sinovial de NO $_x^-$) e dos fatores NF- κ B e AP-1. No entanto, os ratos com sinovite pré-tratados com o inibidor da CSE, PGly, exibiram aumento da atividade da iNOS, concentração de NO $_x^-$ e da ativação da AP-1 na cavidade articular, mas não apresentaram níveis alterados de IL-1 β e IL-10 quando comparado com o grupo sinovite não tratado.

Na vigência da biossíntese de IL-1 β são necessários dois eventos fundamentais: 1) transcrição e processamento da pro-IL-1 β , 2) clivagem e liberação desta. Neste estudo, por enquanto, temos convicção que o LR inibe a atividade proteolítica da enzima conversora de IL-1 β , mas não afeta as vias do NF- κ B e AP-1. Todavia o envolvimento das demais vias (ex: STAT, SOCS3) não foram totalmente exploradas. Apesar de controverso, postula-se que a via de ativação da caspase-1 envolve o efluxo celular de K $^+$ (SALEH e GREEN, 2007). Curiosamente, doadores de H $_2$ S são bem conhecidos pela capacidade de aumentar o influxo celular de K $^+$ via canais de K $^+$ dependentes de ATP. Desta feita, a possibilidade deste mecanismo estar envolvido na redução da atividade da caspase-1 é uma sugestão atraente e está sendo correntemente investigada pelo grupo. Contudo, os resultados preliminares do grupo (não demonstrados) indicam que o bloqueio dos canais de K $^+$ dependentes de ATP, pela glibenclamida, não reverteu, de forma significativa, o efeito protetor do LR sobre os parâmetros inflamatórios (edema e influxo celular) na cavidade articular dos animais com sinovite. A glibenclamida *per se* não afetou nem o edema e nem o influxo de neutrófilos na cavidade articular dos animais com a sinovite (dados em andamento). Apesar de ainda não conclusivos, os achados preliminares sugerem nem os íons K $^+$ e

tampouco os canais de K^+ dependentes de ATP exercem um papel importante na redução da atividade da caspase-1.

Existem evidências segundo as quais o H_2S é removido rapidamente pela reação com diversas espécies reativas de oxigênio / nitrogênio, tais como o ânion superóxido (CHANG et al., 2008), peroxinitrito (WHITEMAN et al., 2004) ou hipoclorito (WHITEMAN et al., 2005). Considerando que estas espécies reativas estão presentes em altas concentrações durante o processo inflamatório. Ainda, devido às capacidades destas reagirem com proteínas, lipídios e nucleotídeos, é bem possível que o efeito benéfico do H_2S seja, em parte, decorrente da inibição desses radicais. De fato, o H_2S preveniu a formação do ânion peroxinitrito (e a resultante nitratação) via formação de um intermediário nitrosotiol (WHITMAN et al., 2006). Neste estudo, a inibição da produção endógena de H_2S , pela PGly, não alterou a concentração de sulfeto total no plasma de ratos com sinovite, mas reduziu significativamente a concentração do sulfeto total no lavado sinovial destes. Todavia, o tratamento com o LR não resultou em aumento correspondente de sulfeto total na articulação dos animais, apesar dos efeitos farmacológicos observados. A possível ocorrência de reações das espécies reativas ao oxigênio / nitrogênio que leva ao maior consumo de H_2S liberado pelo LR poderia também explicar a ausência do aumento de sulfeto total no lavado sinovial. Reforçando tal sugestão, a avaliação cinética da concentração de sulfeto total após a i. art. de LR na cavidade articular de ratos naive mostrou um rápido aumento da concentração de sulfeto total no lavado sinovial, seguido de uma queda, cujo tempo de $\frac{1}{2}$ vida calculado foi, aproximadamente, 22 minutos. Outrossim, vale lembrar que a análise das concentrações de sulfeto total na cavidade articular dos animais com sinovite foi realizada após 5 horas da administração local do LR, reforçando pois as evidências sobre o rápido metabolismo do H_2S .

Os resultados deste estudos assemelham-se aos observados por Dorman et al. (2002), os quais revelaram que a exposição aguda (3 horas) de ratos a altas concentrações de sulfeto, por via inalatória (400 ppm), elevou instantaneamente a concentração pulmonar de H_2S e, após 15 minutos do término da inalação, os níveis de sulfeto retornaram à linha de base. Ademais, Whitfield et al. (2008) verificaram que o

sulfeto exógeno é rapidamente removido do sangue e plasma (*in vitro* e *in vivo*) do peixe (truta). Baseando-se nessas evidências, é possível sugerir que as reações bioquímicas envolvidas no efeito protetor do LR na inflamação articular induzida pela CGN devem ocorrer nas primeiras duas horas pós injeção a i.art. do LR (~ 5 meias vidas até atingir a concentração basal de sulfeto). Tal argumento é reforçado pelo conhecimento prévio de que o efeito farmacológico do LR é similar aos demais doadores de sulfeto (i.e. NaSH, Na₂S) como moduladores importantes de eventos inflamatórios em outros tecidos e modelos experimentais (ZANARDO et al., 2006; WALLACE et al., 2007; MEDEIROS et al., 2009; SPILLER et al., 2010). Mais especificamente com relação à artrite, recente estudo clínico demonstrou que a articulação de pacientes com AR possui concentrações elevadas de H₂S quando comparado aos pacientes controles, que possuíam osteoartrite. Tais autores demonstraram ainda que as concentrações desse gás estão relacionadas aos graus de escore da doença, muito embora curiosamente não estão associados ao número de células inflamatórias na articulação desses pacientes (WHITEMAN et al., 2010).

Em continuidade ao estudo, a caracterização *in vitro* das enzimas CSE e CBS, responsáveis pela síntese de sulfeto no tecido articular, revelou que ambas isoformas estão expressas constitutivamente na membrana sinovial de ratos naive, assim como, de forma semelhante, na membrana sinovial de ratos com sinovite induzida por CGN. Estes achados mostram, pela primeira vez, que tanto a CSE quanto a CBS catalisa, na mesma proporção, a produção de sulfeto no tecido articular de ratos naive e com sinovite após 4 horas. Este é um dado original e bastante interessante, visto que a literatura preconizava até pouco tempo que regiões do SNC expressam a CBS, enquanto a periferia expressa, preferencialmente, a CSE (AWATA et al., 1995; STIPANUK e BECK, 1982; ZHAO et al., 2001). De fato, a co-expressão dessas isoformas foi também recentemente observada em outros tecidos periféricos, tais como o fígado, estômago, íleo e jejuno (MARTIN et al., 2009). Contudo, em tais estruturas acreditam que a expressão da CBS ocorre, principalmente, devido à inervação mioentérica. Já no corpo cavernoso de indivíduos que se submeteram a cirurgia de substituição de sexo, D'Emanuele et al. (2009) observaram que, tanto a atividade

quanto as expressões gênica e protéica de ambas as enzimas foram eqüipotentes. Esses mesmos autores observaram, via teste de imunolocalização, que a CSE encontra-se mais abundante na região do músculo trabecular e no leito vascular da artéria peniana, ao passo que a CBS apenas foi detectada no músculo trabecular. Recentemente, Bearden et al. (2010) demonstraram que a expressão protéica e atividade dessas enzimas (CSE e CBS) no sangue estão possivelmente envolvidas na síntese de H_2S via transsulfuração extracelular. Neste estudo, entretanto, é impossível precisar se tais enzimas estão co-localizadas ou estão distribuídas de forma uniforme nos diversos compartimentos celulares e nervos da cavidade articular. Para isto, estudos futuros de imunolocalização poderão esclarecer melhor tais especulações. Adiante, foi curioso observar que nenhum dos tratamentos (LR, indometaina e PGly) interferiu com a atividade e expressão protéica das enzimas CSE e CBS.

Ao estabelecer um paralelismo entre os achados da cinética deste estudo e os demais resultados funcionais e bioquímicos, cabe lembrar que a PGly reduziu a geração de sulfeto *in vivo*, mas não afetou a maior parte dos parâmetros inflamatórios e nociceptivos avaliados, exceto que, induziu maior atividade da iNOS e da via AP-1, bem como aumentou o número de macrófagos. Todavia, a inibição da síntese de sulfeto na articulação pela PGly não é surpreendente, visto que esse composto se liga, de forma covalente, ao substrato L-cistationina na porção γ -carbono do sítio de ligação da enzima CSE. Isto, conseqüentemente, inibe a atividade desta enzima devido ao bloqueio do acesso do referido substrato ao sítio catalítico (Lys-212); (JOHNSTON, 1979). Em termos comparativos, o efeito discreto da PGly em relação ao CHH sobre a inibição da atividade da CSE *in vitro* pode ser explicada pela diferença de substratos envolvidos nas duas reações em mamíferos. Ou seja, para a síntese de sulfeto, a reação *in vivo* tem como substrato a L-cistationina que, por ação da CSE, é convertida em L-cisteína. Já a reação *in vitro*, usa como substrato a L-cisteína que, por ação da CSE ou CBS, origina o sulfeto (STIPANUCK e BECK, 1982). Por seu turno, a CSE apresenta maior afinidade pela L-cistationina, lisando a ligação C- γ -S, enquanto em relação a L-cisteína, ocorre a quebra da ligação C- β -S (STEEGEBORN et al., 1999). A ação da CSE sobre a geração de sulfeto *in vivo*, usando como substrato a L-cisteína, é

ainda muito especulativa, visto que as concentrações deste substrato são baixas e, portanto, difícil de imaginar que isto ocorra (GRIFFITH, 1987; STEEGEBORN et al., 1988). Outros mostram que a clivagem da ligação C- β -S pela CSE é mais lenta (< 20 vezes) que a clivagem da ligação C- γ -S (SUN et al., 2009).

Por fim, sabendo da recente evidência que os AINES liberadores de H₂S apresentam baixa toxicidade gástrica e sem efeito notável sobre o sistema cardiovascular (WALLACE et al., 2007, 2010), quando comparados aos AINES convencionais, é plausível sugerir que a suplementação de H₂S juntamente (ou não) com os AINES nos estágios iniciais da AR (ex. sinovite) possa contribuir para a redução do processo inflamatório. Assim, doadores de H₂S constituir-se-iam em ferramentas farmacológicas complementares e / ou alternativas no tratamento da inflamação articular ou AR. No conjunto, os achados deste estudo reforçam a importância do H₂S como um mediador antiinflamatório, além de demonstrar, pela primeira vez, a expressão constitutiva das enzimas (CSE e CBS) conversoras desse gasotransmissor e, ainda, as diferenças entre o H₂S endógeno e suplementado (exógeno) em termos de efeitos sobre a sinovite induzida por CGN.

5 CONCLUSÕES

1. O doador de H_2S , reagente de Lawesson, reduziu a dor, influxo celular e as alterações bioquímicas (exceto iNOS e NO_x^-) na sinovite induzida por CGN em ratos Wistar, ao passo que o inibidor da síntese endógena do H_2S , PGly, não afetou a inflamação e nem a nocicepção;
2. O mecanismo de ação envolvido no efeito protetor do doador de H_2S , reagente de Lawesson, depende, em parte, da redução da atividade proteolítica da enzima conversora de $\text{IL-1}\beta$ (e consequentemente da $\text{IL-1}\beta$) e aumento da biossíntese de IL-10 , independente da ativação dos fatores de transcrição NF- κB e AP-1;
3. Tanto a CSE quanto a CBS, enzimas responsáveis pela síntese endógena de H_2S , estão constitutivamente expressas e ativas na membrana sinovial de ratos Wistar naive e, importante, a atividade e expressão protéica destas não foram alteradas pela sinovite induzida pela CGN em ratos.

REFERÊNCIAS

AMMANN, H. M. A new look at physiologic respiratory response to H₂S poisoning. **J. Hazard. Mater.**, v. 13, p. 369–374, 1986.

AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY. Subcommittee on Rheumatoid Arthritis. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis: 2002 Update. **Arthritis Rheum.**, v. 46, p. 328–346, 2002.

AMEYAR, M.; WISNIEWSKA, M.; WEITZMAN, J. B. A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against. **Biochimie.**, v. 85, n. 8, p. 747-752, 2003.

AMIN, A. R.; VYAS, P.; ATTUR, M.; LESZCZYNSKA-PIZIAK, J.; PATEL, I. R.; WEISSMANN, G et al. The mode of action of aspirin-like drugs: effect on inducible nitric oxide synthase. **Proc. Natl. Acad. Sci USA.**, v. 92, n. 17, p. 7926–7930, 1995.

ANDRUSKI, B.; MCCAFFERTY, D.M.; IGNACY, T.; MILLEN, B.; MCDUGALL, J. J.; Leukocyte trafficking and pain behavioral responses to a hydrogen sulfide donor in acute monoarthritis. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 295, n. 3, p. 814–820, 2008.

ARNOLD, I. M. F.; DUFRESNE, R. M.; ALLEYNE, B. C.; STUART, P. J. W. Health implication of occupational exposures to hydrogen sulfide. **J. Occup. Med.**, v. 27, n. 5, p. 373–376, 1985.

ASADULLAH, K.; STERRY, W.; VOLK, H. D. Interleukin-10 therapy--review of a new approach. **Pharmacol. Rev.**, v. 55, n. 2, p. 241-269, 2003.

AWATA, S.; NAKAYAMA, K.; SUZUKI, I.; SUGAHARA, K.; KODAMA, H. Changes in cystathionine gamma-lyase in various regions of rat brain during development. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v. 35, n. 6, p. 1331–1338, 1995.

BALDASSARE, J. J.; BI, Y.; BELLONE, C. J. The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-1 beta transcription. **J. Immunol.**, v. 162, n. 9, p. 5367-5373, 1999.

BATH, P. M.; WILLMOT, M.; LEONARDI-BEE, J.; BATH, F. J. Nitric oxide donors (nitrates), Larginine, or nitric oxide synthase inhibitors for acute stroke. **Cochrane Database Syst Rev.**, v. 4, n. CD000398, 2002.

BEARDEN, S. E.; BEARD, R. S.; PFAU, J. C. Extracellular Transsulfuration Generates Hydrogen Sulfide from Homocysteine and Protects Endothelium From Redox Stress. **Am. J. Physiol. Heart. Circ Physiol.**, v. 299, n. 5, p. 1568-1576, 2010.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referência: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BHATIA, M.; SIDHAPURIWALA, J.; MOOCHHALA, S. M.; MOORE, P. K. Hydrogen sulphide is a mediator of carrageenan-induced hindpaw oedema in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v. 145, n. 2, p. 141–144, 2005a.

BHATIA, M.; WONG, F. L.; FU, D.; LAU, H. Y.; MOOCHHALA, S. M.; MOORE, P. K. Role of hydrogen sulphide in acute pancreatitis and associated lung injury. **FASEB J.**, v. 19, n. 6, p. 623–625, 2005b.

BAUMGART, K.; SIMKOVA, V.; PERL, M.; SEITZ, D. H.; HUBER-LANG, M.; WEBER, S. et al. Inhaled H₂S and hypothermia comparably attenuate surgery-related inflammation [abstract]. **Shock**, v. 29, n. 1, p. 72, 2008.

BELARDINELLI, M. C.; CHABLI, A.; CHADEFAUX-VEKEMANS, B.; KAMOUN, P. Urinary sulfur compounds in Down syndrome. **Clin. Chem.**, v. 47, n. 8, p. 1500-1501, 2001.

BELIZÁRIO, J. E.; LORITE, M. J.; TISDALE, M. J. Cleavage of caspases-1, -3, -6, -8 and -9 substrates by proteases in skeletal muscles from mice undergoing cancer cachexia. **Br. J. Cancer.**, v. 84, n. 8, p.1135-1140, 2001.

BENDELE, A.; MCCOMB, J.; GOULD, T.; MCABEE, T.; SENNELLO, G.; CHLIPALA, E.; GUY, M. Animal models of arthritis: relevance to human disease. **Toxicol. Pathol.**, v. 27, n. 1, p. 13413-42, 1999.

BLACK, R. A.; KRONHEIM, S. R.; CANTRELL, M.; DEELEY, M. C.; MARCH, C. J.; PRICKETT, K. S. et al. Generation of biologically active interleukin-1 beta by proteolytic cleavage of the inactive precursor. **J. Biol. Chem.**, v. 263, n. 19, p. 9437-9442, 1988.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding" **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J. Invest. Dermatol.**, v. 78, n. 3, p. 206–209, 1982.

BRACKERTZ, D.; MITCHELL, G. F.; VADAS, M. A.; MACKAY IR. Studies on antigen-induced arthritis in mice. III. Cell and serum transfer experiments. **J. Immunol.**, v. 118, n. 5, p.1645-8, 1977.

BRADDOCK, M.; QUINN, A.; CANVIN, J. Therapeutic potential of targeting IL-1 and IL-18 in inflammation. **Expert. Opin. Biol. Ther.**, v. 4, n. 6, p. 847-860, 2004.

BRUGADA, R.; MARIAN, A. J. A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase gene is not a major risk of coronary artery disease or myocardial infarction. **Atherosclerosis**, v. 128, n. 1, p. 107-12, 1997.

CHANG, L.; GENG, B.; YU, F.; ZHAO J.; JIANG, H.; DU, J. et al. Hydrogen sulfide inhibits myocardial injury induced by homocysteine in rats. **Amino Acids**, v. 34, n. 4, p. 573-585, 2008.

CHOY, E. H.; PANAYI, G. S. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, n. 12, p. 907-916, 2001.

CONNELL, L.; MCINNES, I. B. New cytokine targets in inflammatory rheumatic diseases. **Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.**, v. 20, n. 5, p. 865–878, 2006.

CONNOR, JR.; MANNING, P. T; SETTLE, S. L.; MOORE, W. M.; JEROME, G. M.; WEBBER, R. K et al. Suppression of adjuvant-induced arthritis by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 273, n. 1–2, p.15–24, 1995.

COOPER, N. J. Economic burden of rheumatoid arthritis: a systematic review. **Rheumatology (Oxford)**, v. 39. n. 1, p. 28-33, 2000.

CUNHA, T, M.; DAL-SECCO, D.; VERRI J. R.; GUERRERO, A. T.; SOUZA, G.R.; VIEIRA, S, M et al. Dual role of hydrogen sulfide in mechanical inflammatory hypernociception. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 590, n. 1-3, p. 127-135, 2008.

DAHA, N. A.; KURREEMAN, F. A.; MARQUES, R. B. Confirmation of STAT4, IL2/IL21, and CTLA4 polymorphisms in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 60, n. 5, p. 1255–1260, 2009.

DAYER, J. M. Evidence for the biological modulation of IL-1 activity: the role of IL-1Ra. **Clin. Exp. Rheumatol.**, v. 20, n. 5, p. 14-20, 2002. Supplement 27.

DENADAI-SOUZA, A.; CAMARGO, L. D.; RIBELA, M. T.; KEEBLE, J. E.; COSTA SK.; MUSCARÁ, M. N. Participation of peripheral tachykinin NK(1) receptors in the carrageenan-induced inflammation of the rat temporomandibular joint. **Eur. J. Pain.**, v. 13, n. 8, p. 812–819, 2009.

D'EMMANUELE, D. R.; SORRENTINO, R.; MAFFIA, P.; MIRONE, V.; IMBIMBO, C.; FUSCO et al: Hydrogen sulfide as a mediator of human corpus cavernosum smooth-muscle relaxation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 106, n. 11, p. 4513-4518, 2009.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. **Chest**, v. 118, n. 2, p. 503-508, 2000.

DISTRUTTI, E.; SEDIARI, L.; MENCARELLI, A.; RENGÀ, B.; ORLANDI, S.; ANTONELLI, E. et al. Evidence that hydrogen sulphide exerts antinociceptive effects in the gastrointestinal tract by activating KATP channels. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 316, n. 1, p. 325–335, 2006.

DONNELLY, R. Evidence-based symptom relief of intermittent claudication: efficacy and safety of cilostazol. **Diabetes Obes. Metab.**, v. 4, n. 2, p. 20-25, 2002.

Dorman, D. C.; Moulin, F. J.; McManus, B. E.; Mahle, K. C.; James, R. A.; Struve, M. F.; Cytochrome oxidase inhibition induced by acute hydrogen sulfide inhalation: correlation with tissue sulfide concentrations in the rat brain, liver, lung, and nasal epithelium. **Toxicol. Sci.**, v. 65, n. 1, p. 18-25, 2002.

DONHAM, K. J.; KNAPP, L. W.; MONSON, R.; GUSTAFSON, K. Acute toxic exposure to gases from liquid manure. **J. Occup. Med.**, v. 24, n. 2, p. 142–145, 1982.

DURAND, M.; WEINSTEIN, P. Thiosulfate in human urine following minor exposure to hydrogen sulfide: implications for forensic analysis of poisoning. **Forensic Toxicol.**, v. 25, n. 2, p. 92–95, 2007.

EBERHARDT, W.; KUNZ, D.; HUMMEL, R.; PFEILSCHIFTER, J. Molecular cloning of the rat inducible nitric oxide synthase gene promoter. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 223, n. 3, p. 752-756, 1996.

ELLIS, H.; SUSAN, S. Gray, Henry David. **Gray's anatomy**: the anatomical basis of clinical practice. St. Louis, Mo: Elsevier Churchill Livingstone, 2005.

EMERY, P.; KEYSTONE, E.; TONY, H. P. IL-6 receptor inhibition with tocilizumab improves treatment outcomes in patients with rheumatoid arthritis refractory to anti-tumour necrosis factor biologicals: results from a 24-week multicentre randomised placebo-controlled trial. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 67, n. 11, p. 1516–1523, 2008.

ERICKSON, P. F.; MAXWELL, I. H.; SU, L. J.; BAUMANN, M.; GLODE, L. M. Sequence of cDNA for rat cystathionine gamma-lyase and comparison of deduced amino acid sequence with related Escherichia coli enzymes. **Biochem. J.**, v. 269, n. 2, p. 335–340, 1990.

ESTEVE, M.; SARO, C.; GONZALEZ-HUIX, F.; SUAREZ, F.; FORNE, M.; VIVER, J. M. Chronic hepatitis B reactivation following infliximab therapy in Crohn's disease patients: need for primary prophylaxis. **Gut**, v. 53, n. 9, p. 1363-1365, 2004.

ESECHIE, A. I.; MALOHI, K. L.; OLAH, G. Protective effect of hydrogen sulfide in a murine model of acute lung injury induced by combined burn and smoke inhalation. **Clinical Science**, v. 115, n. 3, p. 91–97, 2008.

FANG, L.; LI, H.; TANG, C.; GENG, B.; QI, Y.; LIU, X. Hydrogen sulfide attenuates the pathogenesis of pulmonary fibrosis induced by bleomycin in rats. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 87, n. 7, p. 531-538, 2009.

FARRELL, A. J.; BLAKE, D. R.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 51, n. 11, p. 1219–1222, 1992.

FIORUCCI, S.; ANTONELLI, E.; DISTRUTTI, E. Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by anti-inflammatory nonsteroidal drugs. **Gastroenterology**, v. 129, n. 4, p. 1210–1224, 2005.

FIRESTEIN, G. S. Immunologic mechanisms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **J. Clin. Rheumatol.**, v. 11, n. 3, p. 39-44, 2005.

FÖRSTERMANN, U.; GORSKY, L. D.; POLLOCK, J. S. Regional distribution of EDRF/NO-synthesizing enzyme(s) in rat brain. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 168, n. 2, p. 727-732, 1990.

FOLLIARD, F.; TERLAIN, B. A novel method for the sampling of synovial fluid in mice. Assay of a synovial lysosomal enzyme in zymosan-induced arthritis. **Agents Actions**, v. 25, n. 1-2, p. 139-45, 1988.

FOX, D. A. The role of T cells in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis: new perspectives. **Arthritis Rheum.**, v. 40, n. 4, p. 598-609, 1997.

FURNE, J.; SPRINGFIELD, J.; KOENIG, T.; DEMASTER, E.; LEVITT, M. D. Oxidation of hydrogen sulfide and methanethiol to thiosulfate by rat tissues: a specialized function of the colonic mucosa. **Biochem. Pharmacol.**, v. 62, n. 2, p. 255–259, 2001.

GARDNER, D L. The Experimental Production of Arthritis: A Review. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 19, n. 4, p. 297-317, 1960.

GARTLEHNER, G.; HANSEN, R. A.; JONAS, B. L. The comparative efficacy and safety of biologics for the treatment of rheumatoid arthritis: a systematic review and metaanalysis. **J. Rheumatol.**, v. 33, n. 12, p. 2398–2408, 2006.

GE, Y.; JENSEN, T.L.; MATHERLY, L.H.; TAUB, J.W. Transcriptional regulation of the human cystathionine beta-synthase-1b basal pro-moter: synergistic transactivation by transcription factors NF-Y and Sp1/Sp3. **Biochem. J.**; v. 357, p. 97–105, 2001.

GENG, Y.; VALBRACHT, J.; LOTZ, M. Selective activation of the mitogen-activated protein kinase subgroups c-Jun NH2 terminal kinase and p38 by IL-1 and TNF in human articular chondrocytes. **J. Clin. Invest.**, v. 98, n. 10, p. 2425-2430, 1996.

GENG, B.; CHANG, L.; PAN, C.; QI, Y.; ZHAO, J.; PANG, Y.; DU, J.; TANG, C. Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 318, n. 3, p. 756–763, 2004.

GERONDAKIS, S.; GROSSMANN, M.; NAKAMURA, Y.; POHL, T; GRUMONT, R. Genetic approaches in mice to understand Rel/NF-kappaB and IkappaB function: transgenics and knockouts. **Oncogene**, v. 18, n. 49, p. 6888-6895, 1999.

GOMEZ-REINO, J. J.; CARMONA, L. Switching TNF antagonists in patients with chronic arthritis: an observational study of 488 patients over a four-year period. **Arthritis. Res. Ther.**, v. 8, n. 1, p. 29, 2006.

GRABOWSKI, P. S.; MACPHERSON, H.; RALSTON SH. Nitric oxide production in cells derived from the human joint. **Br. J. Rheumatol.**, v. 35, n. 3, p. 207-212, 1996.

GRABOWSKI, P. S.; WRIGHT, P. K.; VAN, H. R. J. Immunolocalization of inducible nitric oxide synthase in synovium and cartilage in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Br. J. Rheumatol.**, v. 36, n. 6, p. 651-655, 1997.

GRIFFITH, O. W. Mammalian sulfur amino acid metabolism: an overview. **Methods Enzymol.**, v. 143, p. 366-376, 1987.

Guidotti, T L. Occupational exposure to hydrogen sulfide in the sour gas industry: Some unresolved issues. **Int. Arch. Occup. Environ. Health.**, v. 66, n. 3, p. 153–160, 1994.

HALL, A. H.; RUMACK, B. H. Hydrogen sulfide poisoning: An antidotal role for sodium nitrite? **Vet. Hum. Toxicol.**, v. 39, n. 3, p. 152–154, 1997.

HOIDAL, C. R.; HALL, A. H.; ROBINSON, M. D.; KULIG, K.; RUMACK, B. H. Hydrogen sulfide poisoning from toxic inhalations of roofing asphalt fumes. **Ann. Emerg. Med.**, v. 15, n. 7, p. 826–830, 1986.

HOWARD, M.; O'GARRA, A. Biological properties of interleukin 10. **Immunol. Today**, v. 13, n. 6, p. 198-200, 1992.

HUGHES, L. B.; MORRISON, D.; KELLEY, J. M. et al: The HLA-DRB1 shared epitope is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in African Americans through European genetic admixture. **Arthritis Rheum.**, v. 58, n. 2, p. 349–358, 2008.

Hughes, M. N.; Centelles, M. N.; Moore, K. P. Making and working with hydrogen sulfide The chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: a review. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, n. 10, p. 1346–1353, 2009.

IBADOVA, GD.; MAMISHEV, S. N.; ZAVORA, M. I.; SARIAN, L. A. Combined use of hydrogen sulphide baths and galvanopeloid therapy with magnetolaser radiation in osteoarthritis patients at a health resort. **Vopr. Kurortol. Fizioter. Lech. Fiz Kult.**, v. 4, p. 23–25, 2005.

IKUTA, S.; KIRBY, J. A.; SHENTON B K.; GIVAN, A. L.; LENNARD, T. W. Human endothelial cells: effect of TNF-alpha on peripheral blood mononuclear cell adhesion. **Immunology**, v. 73, n. 1, p. 71–76, 1991.

JAAKKOLA, J. J.; VILKKA, V.; MARTTILA, J. P.; HAAHTELA, T. The South Karelia Air Pollution Study. The effects of malodorous sulfur compounds from pulp mills on respiratory and other symptoms. **Am. Rev.Respir. Dis.**, v. 142, n. 6, p. 1344–1350, 1990.

JONATHAN, C. W.; EDWARDS, M.; LESZEK, S. Efficacy of B-Cell–Targeted Therapy with Rituximab in Patients with Rheumatoid Arthritis **N. Engl. J. Med.**, v. 350, p. 2572–2581, 2004.

JOHNSTON, M.; MARCOTTE, P.; DONOVAN, J.; WALSH, C. Mechanistic studies with vinylglycine and beta-haloaminobutyrate as substrates for cystathionine gamma-synthetase from *Salmonella typhimurium*. **Biochemistry**, v. 18, n. 9, p. 1729–1738, 1979.

JULIAN, D.; STATILEJ, L.; WOHLGEMUTH, S. E.; ARP, A. J. Enzymatic hydrogen sulfide production in marine invertebrate tissues. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.**, v. 133, n. 1, p. 105–115, 2002.

KAGE, S.; NAGATA, T.; TAKEKAWA, K.; KIMURA, K.; KUDO, K.; IMAMURA, T. The usefulness of thiosulfate as an indicator of hydrogen sulfide poisoning in forensic toxicological examination: A study with animal experiments. **Jpn. J. Forensic Toxicol.**, v. 110, n. 4, p. 223–227, 1997.

KARY, S.; BURMESTER, G. R. Anakinra: the first interleukin-1 inhibitor in the treatment of rheumatoid arthritis. **Int. J. Clin. Pract.**, v. 57, n. 3, p. 231–234, 2003.

KHAN, A. A.; SCHULER, M. M.; PRIOR, M. G. Effects of hydrogen sulfide exposure on lung mitochondrial respiratory chain enzymes in the rat. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 103, n. 482-490, 1990.

KATSIKIS, P. D.; CHU, C. Q.; BRENNAN, F. M.; MAINI, R. N.; FELDMANN, M. Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. **J. Exp. Med.**, v. 179, n. 5, p. 1517-1527, 1994.

KEINÄNEN, R.; VARTIAINEN, N.; KOISTINAHO, J. Molecular cloning and characterization of the rat inducible nitric oxide synthase (iNOS). **Gene**, v. 234, n. 2, p. 297-305, 1999.

KILBURN, K. H. Case Report: Profound neurobehavioral deficits in an oil field worker overcome by hydrogen sulfide. **Am. J. Med. Sci.**, v. 306, n. 5, p. 301–305, 1993.

KLOESCH, B.; LISZT, M.; BROELL, J. H₂S transiently blocks IL-6 expression in rheumatoid arthritic fibroblast-like synoviocytes and deactivates p44/42 mitogen-activated protein kinase. **Cell. Biol. Int.**, v. 34, n. 5, p. 477-484, 2010.

KLARESKOG, L.; CATRINA, A. I.; PAGET, S. Rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 373, n. 9664, p. 659-672, 2009.

KOENDERS, M.I.; JOOSTEN, L. A. B.; VANDENBERG, W. B. Potential new targets in arthritis therapy: interleukin (IL)-17 and its relation to tumour necrosis factor and IL-1 in experimental arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 65, n. 3, p. 29-33, 2006.

KOPF, M.; HEINZ, B.; GIULIA, F.; MARINA, F. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. **Nature**, v. 368, n. 6469, p. 339-342, 1994.

KROESEN, S.; WIDMER, A. F.; TYNDALL, A.; HASLER, P. Serious bacterial infections in patients with rheumatoid arthritis under anti-TNF-alpha therapy. **Rheumatology (Oxford)**, v. 42, n. 5, p. 617-621, 2003.

KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D. N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, n. 11, p. 4651–4655, 1991.

KUBO, S.; KUROKAWA, Y.; DOE, I.; MASUKO, T.; SEKIGUCHI, F.; KAWABATA, A. Hydrogen sulphide inhibits activity of three isoforms of recombinant nitric oxide synthase. **Toxicology**, v. 241, n. 1–2, p. 92–97, 2007.

KUMAR, V.; ABUL, K.; ABBAS, N. Ossos, articulações e tumores de tecidos moles In: _____. **Robbin e Cotran Bases patológicas da doença**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p. 1245-1250.

KVIEN, T. K.; UHLIG T. Quality of life in rheumatoid arthritis. **Scand. J. Rheumatol.**, v. 34, n. 5, p. 333-341, 2005.

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

LEE, H. S.; LEE, C. H.; TSAI, H. C.; SALTER, D. M. Inhibition of cyclooxygenase 2 expression by diallyl sulphide on joint inflammation induced by urate crystal and IL-1 β . **Osteoarthritis Cartilage**, v. 17, n. 1, p. 91–99, 2009.

LEVITT, M. D.; FURNE, J.; SPRINGFIELD, J.; SUAREZ, F.; DEMASTER, E. Detoxification of hydrogen sulfide and methanethiol in the cecal mucosa. **J. Clin. Invest.**, v. 104, n. 8, p. 1107–1114, 1999.

LI, L.; BHATIA, M.; ZHU, Y. Z.; ZHU, Y. C. et al: Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. **FASEB J.**, v. 19, n. 9, p. 1196-1198, 2005.

LI, L.; SALTO-TELLEZ, M.; TAN, C. H.; WHITEMAN, M.; MOORE, P. K. GYY4137, a novel hydrogen sulfide-releasing molecule, protects against endotoxic shock in the rat. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 47, n. 1, p. 103–113, 2009.

LI-FANG, H. U.; MING, L. U.; CHI, X. T.; GAVIN, S. D.; GANG, H. U.; JIN-SONG, B. Neuroprotective effects of hydrogen sulfide on Parkinson's disease rat models. **Aging Cell.**, v. 9, n. 2, p. 135-146, 2010.

ŁOWICKA, E.; BEŁTOWSKI, J.; WATANABE, H. et al. Hydrogen sulfide (H₂S) - the third gas of interest for pharmacologists. **Pharmacol. Rep.**, v. 59, n. 1, p. 4-24, 2007.

LUBBERTS, E.; JOOSTEN, L. A.; HELSEN, M. M.; VANDENBERG, W. B. Regulatory role of interleukin 10 in joint inflammation and cartilage destruction in murine streptococcal cell wall (SCW) arthritis. More therapeutic benefit with IL-4/IL-10 combination therapy than with IL-10 treatment alone. **Cytokine**, v. 10, n. 5, p. 361-369, 1998.

MAEDA, Y.; AOKI, Y.; SEKIGUCHI, F. et al: Hyperalgesia induced by spinal and peripheral hydrogen sulphide: evidence for involvement of Cav3.2 T-type calcium channels. **Pain**, v. 142, n. 1-2, p. 127–132, 2009.

MARK, C.; JEAN-CLAUDE, G. B.; MICHAEL, S. et al: Abatacept for Rheumatoid Arthritis Refractory to Tumor Necrosis Factor α Inhibition **N. Engl. J. Med.**, v. 353, p. 1111-1114, 2005.

MARKS-KONCZALIK, J.; CHU, S. C.; MOSS, J. Cytokine-mediated transcriptional induction of the human inducible nitric oxide synthase gene requires both activator protein 1 and nuclear factor kappaB-binding sites. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 35, p. 22201-22208, 1998.

MARIGGIÒ, M. A.; MINUNNO, V.; RICCARDI, S.; SANTACROCE, R.; DE RINALDIS, P.; FUMARULO, R. Sulphide enhancement of PMN apoptosis. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.**, v. 20, p. 399-408, 1998.

MARTIN, G. R.; MCKNIGHT, G. W.; DICAY, M. S.; COFFIN, C. S.; FERRAZ, J. G.; WALLACE, J. L. Hydrogen sulphide synthesis in the rat and mouse gastrointestinal tract. **Dig. Liver Dis.**, v. 42, n. 2, p. 103-109, 2010.

MEEKINS, J. W.; MCLAUGHLIN, P. J.; WEST, D. C.; MCFADYEN, I. R.; JOHNSON, P. M. Endothelial cell activation by tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and the development of pre-eclampsia. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 98, n. 1, p. 110-114, 1994.

MELLO, S. B.; GUZZO, M. L.; LISBOA, L. F.; FARSKY, S. H. Pharmacological characterisation of arthritis induced by Bothrops jararaca venom in rabbits: a positive cross talk between bradykinin, nitric oxide and prostaglandin E2. **Mediators Inflamm.**, v. 11, n. 1, p. 13-16, 2002.

MEDEIROS, J. V.; BEZERRA, V. H.; GOMES, A. S. Hydrogen sulfide prevents ethanol-induced gastric damage in mice: role of ATP-sensitive potassium channels and capsaicin-sensitive primary afferent neurons. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 330, n. 3, p. 764-770, 2009.

MEDZHITOF, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-435, 2008.

MILBY, T. H.; BASELT, R. C. Hydrogen sulfide poisoning: Clarification of some controversial issues. **Am. J. Ind. Med.**, v. 35, n. 2, p. 192-195, 1999.

MITSUHASHI, H.; YAMASHITA, S.; IKEUCHI, H. et al. Oxidative stress-dependent conversion of hydrogen sulfide to sulfite by activated neutrophils. **Shock**, v. 24, n. 6, p. 529-534, 2005.

MUNHOZ, C. D.; LEPSCH, L. B.; KAWAMOTO, E. M.; MALTA, M. B.; LIMA, LDE. S.; AVELLAR, M. C et al. Chronic unpredictable stress exacerbates lipopolysaccharide-induced activation of nuclear factor-kappaB in the frontal cortex and hippocampus via glucocorticoid secretion. **J. Neurosci.**, v. 26, n. 14, p. 3813, 2006.

MÜNKE, M.; KRAUS, J. P.; OHURA, T.; FRANKE, U. The gene for cystathionine beta-synthase (CBS) maps to the subtelomeric region on human chromosome 21q and to proximal mouse chromosome 17. **Am. J. Hum. Gene**, v. 42, n. 4, p. 550–559, 1988.

NAGANUMA, K.; AMANO, S.; TAKEDA, H.; KITANO, S.; HANAZAWA, S. Role of transcriptional factor activation protein-1 in endogenous expression of the interleukin-1 beta gene involved in Porphyromonas gingivalis fimbria-stimulated bone resorption in the mouse calvarial system. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 15, n. 1, p. 53-57, 2000.

NEMUNAITIS, J.; ROSS, M.; MEISENBERG, B. et al: Phase I study of recombinant human interleukin-1 beta (rhIL-1 beta) in patients with bone marrow failure. **Bone Marrow Transplant**, v. 14, n. 4, p. 583-588, 1994.

NICHOLLS P: The effect of sulfide on cytochrome-aa3 isosteric and allosteric shifts of the reduced a-peak. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 396, n. 1, p. 24–35, 1975.

NORIHIRO, N.; JUN, H.; NOBUYUKI, M. et al. Study of active controlled monotherapy used for rheumatoid arthritis, an IL-6 inhibitor (SAMURAI): evidence of clinical and radiographic benefit from an x ray reader-blinded randomised controlled trial of tocilizumab. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 66, n. 9, p. 1162-1167, 2007.

OH, G. S.; PAE, H. O.; LEE, B. S. et al. Hydrogen sulphide inhibits nitric oxide production and nuclear factor-kappaB via heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 41, n. 1, p. 106–119, 2006.

OTSUKI, T.; NAKAHAMA, H.; NIIZUMA, H.; SUZUKI J. Evaluation of the analgesic effects of capsaicin using a new rat model for tonic pain. **Brain Res.**, v. 365, n. 2, p. 235-240, 1986.

Pahl, H. L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. **Oncogene**, v. 18, n. 49, p. 6853-6866, 1999.

PEARSON, C. M. Experimental joint disease observation on adjuvant induced arthritis. **J. Chronic. Dis.**, v. 16, p. 863-874, 1963.

PELLETIER, J. P.; MINEAU, F.; FERNANDES, J. C.; DUVAL, N.; MARTEL-PELLETIER, J. Diacerhein and rhein reduce the interleukin 1beta stimulated inducible nitric oxide synthesis level and activity while stimulating cyclooxygenase-2 synthesis in human osteoarthritic chondrocytes. **J. Rheumatol.**, v. 25, n. 12, p. 2417–2424, 1998.

PENG-THIM, F.; KENG-HONG, L. The Use of Biological Agents in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. **Ann. Acad. Med. Singapore.**, v. 36, p.128-134, 2007.

PERKINS, N. D. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 8, n. 1, p. 49-62, 2007.

PETTIPHER, E. R.; HIGGS, G. A.; HENDERSON, B. Interleukin 1 induces leukocyte infiltration and cartilage proteoglycan degradation in the synovial joint. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, n. 22, p. 8749–8753, 1986.

PICTON, R.; EGGO, M. C.; MERRILL, G. A.; LANGMAN, M. J.; SINGH, S. Mucosal protection against sulphide: importance of the enzyme rhodanese. **Gut**, v. 50, n. 2, p. 201-205, 2002.

REIFFENSTEIN, R. J.; HULBERT, W. C.; ROTH, H. H. Toxicology Of Hydrogen Sulfide. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 32, p. 109-134, 1992.

PRAKKEN, B. J.; ROORD, S.; VANKOOTEN, P. J. Inhibition of adjuvant-induced arthritis by interleukin-10-driven regulatory cells induced via nasal administration of a peptide analog of an arthritis-related heat-shock protein 60 T cell epitope. **Arthritis Rheum.**, v. 46, n. 7, p. 1937-1946, 2002.

RONG, Y.; BAUDRY, M. Seizure activity results in a rapid induction of nuclear factor-kappa B in adult but not juvenile rat limbic structures. **J. Neurochem.**, v. 67, n. 2, p. 662-668, 1996.

ROTH, A.; MOLLENHAUER, J.; WAGNER, A. Intra-articular injections of high-molecular-weight hyaluronic acid have biphasic effects on joint inflammation and destruction in rat antigen-induced arthritis. **Arthritis Res. Ther.**, v. 7, n. 3, p. 677–686, 2005.

ROUX – LOMBARD, P.; MODOUX, C.; VISCHER, T.; GRASSI, J.; DAYER, J.M. Inhibitors of interleukin 1 activity in synovial fluids and in cultured synovial fluid mononuclear cells. **J. Rheumatol.**, v. 19, n. 4, p. 517–523, 1992.

SALEH, M.; GREEN, D. R. Caspase-1 inflammasomes: choosing between death and taxis. **Cell. Death Differ.**, v. 14, n. 9, p. 1559-1560, 2007.

SEARCY, D. G. HS-:O₂ oxidoreductase activity of Cu, Zn superoxide dismutase. **Arch Biochem. Biophys.**, v. 334, n. 1, p. 50-58, 1996.

SIDHAPURIWALA, J.; LI, L.; SPARATORE, A.; BHATIA, M.; MOORE, P. K. Effect of S-diclofenac, a novel hydrogen sulfide releasing derivative, on carrageenan-induced hindpaw oedema formation in the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 13, n. 1-2, p. 149-154, 2007.

SHIBUYA, N.; TANAKA, M.; YOSHIDA, N. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 11, n. 4, p. 703–714, 2009.

SIVARAJAH, A.; COLLINO, M.; YASIN, M. et al. Antiapoptotic and anti-inflammatory effects of hydrogen sulphide in a rat model of regional myocardial I/R **Shock.**, , v. 31, n. 3, p. 267-274, 2009.

SILVERMAN, G. J.; CARSON, D. A Roles of B cells in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res. Ther.**, v. 5, n. 4, p. 1-6, 2003.

SHAULIAN, E.; KARIN, M. AP-1 as a regulator of cell life and death, **Nat. Cell. Biol.**, v. 4, n. 5, p. 131–136, 2002.

SKARE, TL. Noções básicas de anatomia e fisiologia articular. In:_____. **Reumatologia princípios e prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. p. 24-27

SNICK, V. Interleukin-6: An Overview. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 8, p. 253-78, 1990.

SPILLER, F.; ORRICO, M. I.; NASCIMENTO, D. C.; CZAİKOSKI, P. G.; SOUTO, F. O.; ALVES-FILHO, J. C. et al. Hydrogen Sulfide Improves Neutrophil Migration and Survival in Sepsis via K⁺ATP Channel Activation. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 182, n. 3, p. 360-368, 2010.

STEFANOVIC-RACIC, M.; STADLER, J.; EVANS, C. H. Nitric oxide and arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 38, n. 10, p. 1529–1531, 1995.

STEEGBORN, C.; CLAUSEN, T.; SONDERMANN, P. et al: Kinetics and inhibition of recombinant human cystathionine gamma-lyase. Toward the rational control of transsulfuration. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 18, p. 12675-1284, 1999.

STIPANUK, M. H.; BECK, P. W. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphydration in liver and kidney of the rat. **Biochem. J.**, v. 206, n. 2, p. 267–277, 1982.

SUN, Q.; COLLINS, R.; HUANG, S. et al: Structural Basis for the Inhibition Mechanism of Human Cystathionine γ-Lyase, an Enzyme Responsible for the Production of H₂S. **The journal of biological Chemistry**, v. 284, n. 5, p. 3076–3085, 2009.

SZABÓ, C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 6, n. 11, p. 917-935, 2007.

TAYAR, J. H.; SUAREZ-ALMAZOR, M. E. New understanding and approaches to treatment in rheumatoid arthritis. **British Medical Bulletin**, p. 201–214, 2010.

TRENTHAM, D. E.; DYNESIUS, R. A.; ROCKLIN, R. E.; DAVID, J. R. Cellular sensitivity to collagen in rheumatoid arthritis. **Trans. Assoc. Am. Physicians.**, v. 91, p. 118-128, 1978.

THORNBERRY, N. A.; RANO, T. A.; PETERSON, E. P. et al. Combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 29, p. 1707-1711, 1997.

YANG, L. C.; MARSALA, M.; YAKSH TL. Characterization of time course of spinal amino acids, citrulline and PGE2 release after carrageenan/kaolin-induced knee joint inflammation: a chronic microdialysis study. **Pain**, v. 67, n. 2-3, p. 345-354, 1996.

YELIN, E. The costs of rheumatoid arthritis: absolute, incremental, and marginal estimates. **J. Rheumatol. Suppl.**, v. 44, p. 47-51, 1996.

YONEKURA, Y.; KOSHIISHI, I.; YAMADA, K. Association between the expression of inducible nitric oxide synthase by chondrocytes and its nitric oxide-generating activity in adjuvant arthritis in rats. **Nitric Oxide**, v. 8, n. 3, p. 164–169, 2003.

WAHL, S. M.; MCCARTNEY-FRANCIS, N.; CHAN, J.; DIONNE, R. Nitric oxide in experimental joint inflammation. Benefit or detriment? **Cells Tissues Organs**, v. 174, n. 1–2, p. 26–33, 2003.

WALSH, N. C.; CROTTI, T. N.; GOLDRING, S. R.; GRAVALLESE, E. M. Rheumatic diseases: the effects of inflammation on bone. **Immunol. Rev.**, v. 208, p. 228-251, 2005.

WALLACE, J. L. Hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drugs. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 28, n. 10, p. 501–505, 2007.

WALLACE, J. L.; GIUSEPPE, C.; VINCENZO, S.; GIUSEPPE, C. Markedly reduced toxicity of a hydrogen sulphide-releasing derivative of naproxen (ATB-346) **British Journal of Pharmacology**, v. 159, n. 6, p. 1236–1246, 2010.

WATANABE, H.; GAIDE, O.; PÉTRILLI, V. et al. Activation of the IL-1 β -processing inflammasome is involved in contact hypersensitivity. **J. Invest. Dermatol.**, v. 127, n. 8, p. 1956-1963, 2007.

WATT, M. M.; WATT, S. J.; SEATON, A. Episode of toxic gas exposure in sewer workers. **Occup. Environ. Med.**, v. 54, n. 4, p. 277–280, 1997.

WEINBLATT, M.; COMBE, B.; COVUCCI, A.; ARANDA, R.; BECKER, J. C.; KEYSTONE, E. Safety of the selective costimulationmodulator abatacept in rheumatoid arthritis patients receiving background biologic and nonbiologic diseasemodifying antirheumatic drugs: a one-year randomized, placebo-controlled study. **Arthritis Rheum.**, v. 54, n. 9, p. 2807-2816, 2006.

WENDLING, D.; AUGÉ, B.; BETTINGER, D. Reactivation of a latent precore mutant hepatitis B virus related chronic hepatitis during infliximab treatment for severe spondylo- arthropathy. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 64, n. 5, p. 788-789, 2005.

WHITEMAN, M.; ARMSTRONG, J. S.; CHU, S. H. The novel neuromodulator hydrogen sulphide:an endogenous peroxynitrite 'scavenger'? **J. Neurochem.**, v. 90, n. 3, p. 765–768, 2004.

WHITEMAN, M.; CHEUNG, N. S.; ZHU, Y. Z. Hydrogen sulphide: a novel inhibitor of hypochlorous acidmediated oxidative damage in the brain? **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 326, n. 4, p. 794–798, 2005.

WHITEMAN, M.; LI, L.; KOSTETSKI, I. et al. Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 343, n. 1, p. 303–310, 2006.

WHITEMAN, M.; MOORE, P. K. Hydrogen sulfide and the vasculature: a novel vasculoprotective entity and regulator of nitric oxide bioavailability? **J. Cell. Mol. Med.**, v. 13, n. 3, p. 488-507, 2009.

WHITEMAN, M.; LI, L.; ROSE, P.; TAN, C. H.; PARKINSON, D.; MOORE, P. The effect of hydrogen sulfide donors on lipopolysaccharide-induced formation of inflammatory mediators in macrophages. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 12, n. 10, p. 1147-54, 2010.

WHITFIELD, N. L.; KREIMIER, E. L.; VERDIAL, F. C.; SKOVGAARD, N.; OLSON, K. R. Reappraisal of H₂S/sulfide concentration in vertebrate blood and its potential significance in ischemic preconditioning and vascular signaling. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 294, n. 6, p.1930-1937, 2008.

WOZAKOWSKA-KAPLON, B.; GRABSKI, M.; KEDZIORA, J. Hydrogen sulphide water balneum effect on erythrocyte catalase activity in patients with rheumatoid arthritis – in vitro study. **Wiad. Lek.**, v. 59, n. 1–2, p. 72–77, 2006.

VINEGAR, R.; SCHREIBER, H. G. R. Biphasic development of carrageenan edema in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 166, p. 96-103, 1969.

VONFREY, M. Untersuchung über die Sinnesfunctionen der menschlichen Haut. Abhandlungen der mathematisch-physischen Klasse der Königlichen Sächsischen **Gesellschaft. der Wissenschaften**, v. 49, p. 169–266, 1896.

VIVANCOS, G. G.; VERRI, W. A. JR.; CUNHA, T. M. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, n. 3, p. 391-399, 2004.

ZANARDO, R. C.; BRANCALEONE, V.; DISTRUTTI, E.; FIORUCCI, S.; CIRINO, G.; WALLACE, J. L. Hydrogen sulphide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. **FASEB J.**, v. 20, n.12, p. 2118–2120, 2006.

ZHAO, W.; ZHANG, J.; LU, Y.; WANG R The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. **EMBO J.**, v. 20, n. 21, p. 6008–6016, 2001.

ARXO

Differing effects of exogenous and endogenous hydrogen sulfide in carrageenan-induced Knee joint synovitis in the rat

RESEARCH PAPER

Differing effects of exogenous and endogenous hydrogen sulphide in carrageenan-induced knee joint synovitis in the rat

E Ekundi-Valentim¹, KT Santos¹, EA Camargo^{1,2}, A Denadai-Souza¹, SA Teixeira¹, CI Zanoni¹, AD Grant³, JL Wallace⁴, MN Muscará¹ and SK Costa¹

¹Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil, ²Department of Physiology, Federal University of Sergipe, Aracaju-SE, Brazil, ³Wolfson Centre for Age-related Diseases, King's College, London, UK and ⁴Farncombe Institute, Department of Medicine, McMaster University, Hamilton, ON, Canada

Background and purpose: Recent findings suggest that the noxious gas H₂S is produced endogenously, and that physiological concentrations of H₂S are able to modulate pain and inflammation in rodents. This study was undertaken to evaluate the ability of endogenous and exogenous H₂S to modulate carrageenan-induced synovitis in the rat knee.

Experimental approach: Synovitis was induced in Wistar rats by intra-articular injection of carrageenan into the knee joint. Sixty minutes prior to carrageenan injection, the rats were pretreated with indomethacin, an inhibitor of H₂S formation (DL-propargylglycine) or an H₂S donor [Lawesson's reagent (LR)].

Key results: Injection of carrageenan evoked knee inflammation, pain as characterized by impaired gait, secondary tactile allodynia of the ipsilateral hindpaw, joint swelling, histological changes, inflammatory cell infiltration, increased synovial myeloperoxidase, protein nitrotyrosine residues, inducible NOS (iNOS) activity and NO production. Pretreatment with LR or indomethacin significantly attenuated the pain responses, and all the inflammatory and biochemical changes, except for the increased iNOS activity, NO production and 3-NT. Propargylglycine pretreatment potentiated synovial iNOS activity (and NO production), and enhanced macrophage infiltration, but had no effect on other inflammatory parameters.

Conclusions and implications: Whereas exogenous H₂S delivered to the knee joint can produce a significant anti-inflammatory and anti-nociceptive effect, locally produced H₂S exerts little immunomodulatory effect. These data further support the development and use of H₂S donors as potential alternatives (or complementary therapies) to the available anti-inflammatory compounds used for treatment of joint inflammation or relief of its symptoms.

British Journal of Pharmacology (2010) doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00640.x

Keywords: hydrogen sulphide; synovitis; carrageenan; rat; secondary tactile allodynia; nitric oxide; Lawesson's reagent; neutrophils; IL-1 β

Abbreviations: CBS, cystathionine- β -synthase; CMC, carboxymethylcellulose; CSE, cystathionine- γ -lyase; i.art., intra-articular; ICAM-1, intercellular adhesion molecule 1; IL-1, interleukin-1; IL-6, interleukin-6; iNOS, inducible NOS; K_{ATP} channels, ATP-sensitive K⁺ channels; LPS, lipopolysaccharide; LR, Lawesson's reagent; MPO, myeloperoxidase; NO_x⁻, nitrite + nitrate; PBS, phosphate-buffered saline solution; PGly, DL-propargylglycine; RA, rheumatoid arthritis; TNF- α , tumour necrosis factor- α

Introduction

The toxic effects of gaseous hydrogen sulphide (H₂S) are well known and have been studied for more than a century. However, over the past three decades, evidence has emerged that H₂S is produced physiologically during cystathionine

metabolism (Stipanuk and Beck, 1982), by the action of the pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes cystathionine- γ -lyase (CSE) and cystathionine- β -synthase (CBS). CSE and CBS have different tissue distributions; for example, CBS is approximately 30 times more abundantly expressed in the brain than CSE (Awata *et al.*, 1995), while CSE shows higher expression in liver and kidney (Stipanuk and Beck, 1982; Zhao *et al.*, 2001). H₂S is not simply a metabolic by-product, but actively participates in signalling pathways (Kimura, 2002; Kimura *et al.*, 2005; Szabó, 2007) and, along with nitric oxide (NO) and carbon monoxide (CO), H₂S is now recognized as a

Correspondence: SK Costa, Av Prof Lineu Prestes, 1524, São Paulo, 05508-900, SP, Brazil. E-mail:scosta@icb.usp.br

Received 24 July 2009; revised 5 November 2009; accepted 13 November 2009

member of the growing family of the endogenous gaseous mediators, involved in important physiological effects (Wang, 2002). Interestingly, and similarly to NO, H₂S has been implicated in the modulation of both pro- and anti-inflammatory events. Studies with inhibitors of H₂S biosynthesis, such as DL-propargylglycine (PGly) and H₂S donors, such as Na₂S or NaHS at acid pH, show that physiological H₂S concentrations (30–100 µM) produce anti-inflammatory, anti-apoptotic and anti-nociceptive effects (Zanardo *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007; Cunha *et al.*, 2008; Sivarajah *et al.*, 2009). Other groups reported that elevated H₂S levels are detrimental, exerting pro-inflammatory (Bhatia *et al.*, 2005a,b; Collin *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007) and pro-nociceptive effects (Cunha *et al.*, 2008).

The precise sites and mechanisms of action of H₂S as an inflammatory mediator are not well established, although the existing data indicate diverse targets. It directly stimulates capsaicin-sensitive primary afferent neurons in the rat urinary bladder via an unknown molecular interaction (Patacchini *et al.*, 2004). Some anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of H₂S seem to be mediated via activation of ATP-sensitive K⁺ channels (K_{ATP}), as these effects were effectively prevented by glibenclamide, a K_{ATP} channel blocker (Zanardo *et al.*, 2006; Cunha *et al.*, 2008). Other anti-inflammatory effects of H₂S occur via up-regulation of haem oxygenase-1 and CO production, leading to inhibition of the nuclear factor-κB (NFκB) pathway and down-regulation of inducible NO synthase (iNOS) expression and NO production by inflammatory stimuli (Oh *et al.*, 2006).

Rheumatoid arthritis (RA) is a leading cause of disability worldwide and is characterized by severe pain, oedema and destruction of the cartilage and bone (see Yelin, 2007). The great economic and social burden of this disease has stimulated many investigations of the pathological mechanisms involved in the aetiology of RA, and adequate treatment remains the main goal of arthritis research. Recently, sulphide compounds have been suggested to reduce leucocyte infiltration (Andruski *et al.*, 2008) and cyclooxygenase-2 expression (Lee *et al.*, 2009) in animal models of joint inflammation, but no effects on joint pain were reported (Andruski *et al.*, 2008).

In addition to the experimental evidence, clinical findings show that the therapeutic use of thermal baths with H₂S water has anti-oxidant *in vitro* effects on erythrocytes obtained from patients with RA (Grabski *et al.*, 2004; Wozakowska-Kaplon *et al.*, 2006). It also produces anti-inflammatory effects, as well as stimulating general and immune reactivity, in patients with osteoarthritis (Ibadova *et al.*, 2005).

Our present data demonstrated that whereas exogenous H₂S delivered to the knee joint can produce powerful anti-inflammatory and anti-nociceptive effects, locally produced endogenous H₂S seemed to exert little immunomodulatory effect, mainly regulating macrophage migration and NO production in the articular cavity.

Methods

Animals

All animal care and experimental procedures are in accordance with the ethical principles for animal research set down in the Animals (Scientific Procedures) Act, UK, 1986, and were

approved by the local ethics committee at the University of São Paulo (protocol no. 64, book no. 2/2007). A total of 189 adult male Wistar rats (180–200 g) from the local animal care facilities were used in this study. Rats were kept in polypropylene cages (five per cage) under standard controlled conditions (22°C; 12 h light/dark cycle) with free access to commercial rodent chow and tap water. The British Journal of Pharmacology guide to receptor/channels was used (Alexander *et al.*, 2009).

Carrageenan-induced acute knee joint inflammatory response (synovitis)

The rats were transiently anaesthetized with halothane (1.5% v/v in O₂; Takaoka, Mod KT-20, São Paulo, Brazil), and the skin around the knee joints was shaved. Using a 0.1 mL hypodermic syringe with a 30 G needle (BD, Franklin Lakes, NJ, USA), the left knee received an intra-articular (i.art.) injection of carrageenan (50 µL of a 3% solution in a sterile 0.9% saline solution) or the same volume of sterile saline, which constituted a separate control group.

Experimental design

One hour prior to i.art. injection of carrageenan, anaesthetized animals received the i.art. injection of a 50 µL volume containing either the CSE inhibitor, PGly; (53 µmol per knee joint), H₂S donor, Lawesson's reagent (LR; 3.6 µmol per joint) or the vehicle carboxymethylcellulose (CMC 0.2%). Another group of animals were pretreated with the non-selective cyclooxygenase inhibitor indomethacin (6 mg·kg⁻¹, i.p.) 60 min before carrageenan (positive treatment control).

Measurement of knee swelling

Measurements of the mediolateral diameter (at the level of the patellar ligament) of each rat knee joint were performed immediately in conscious animals before anaesthesia for carrageenan injection using a digital calliper (Starret, São Paulo, Brazil). A further reading was performed 4 h after carrageenan injection. Knee swelling was expressed as the change in knee diameter (in mm) before and following the induction of inflammation.

Assessment of pain behaviour and secondary tactile allodynia

Knee joint pain and ipsilateral secondary tactile allodynia were evaluated by the functional measurement of animal behaviour using a modified gait score based on walking pattern and by using a modified von Frey digital device comprised of a hand-held force transducer fitted with a 0.7 mm² polypropylene tip, respectively (Insight, Ribeirão Preto, SP, Brazil), before and 4 h after, the i.art. injection of carrageenan (Otsuki *et al.*, 1986; see Neugebauer *et al.*, 2007; Denadai-Souza *et al.*, 2009). In a quiet, dimmed room, each rat was placed on an open bench that enabled the animal to walk freely, before and after the carrageenan injection. The severity of disturbances of walking was graded as score 0 (normal; rat runs and walks normally), score 1 (mild disability; rat runs and walks with difficulty), score 2 (rat walks with difficulty due to intermittent loading of inflamed paw) or score 3 (rat

stands on only three paws). In a separate set of experiments, rats were conditioned to a perspex box (12 × 20 × 17 cm) with a wire grid base. The secondary tactile allodynia in the hindpaw of the injected knee (ipsilateral) was evaluated by recording the threshold of force intensity (g) that evoked hindpaw withdrawal with a hand-held force transducer. A tilted mirror below the grid provided a clear view of the rat hindpaw. The force threshold (in g) value was recorded before the i.art. injection of either carrageenan or vehicle (basal value), and 4 h later. Measurements of force thresholds were performed by averaging three measurements, and the values before and after carrageenan injection were averaged. Secondary tactile allodynia in the ipsilateral hindpaw was expressed by delta (Δ) withdrawal threshold (in g) by subtracting the basal measurement from measurements obtained after carrageenan. All experimental measurements were made by investigators unaware of the treatments.

Synovial lavage fluid and membrane collection

Under deep anaesthesia (induced by the intraperitoneal injection of 80 mg·kg⁻¹ ketamine and 20 mg·kg⁻¹ xylazine), a blood sample was obtained by cardiac puncture using a heparinized syringe. The rats were then killed by cervical dislocation, the skin overlying the knee was excised, the patellar ligament was dissected and a 30 G needle connected to a 0.3 mL syringe was inserted through the joint capsule. The knee joint cavity was washed twice by injecting and immediately aspirating 100 μ L of phosphate-buffered saline solution (PBS) containing 4 mM EDTA. The resulting synovial lavages were combined and immediately used for cell counting, or centrifuged (at 1500 × g, 10 min) and stored at -20°C for further analysis (see below). The knee joints or synovial membranes were surgically removed. The former were paraffin embedded and routinely processed for histological analysis, whereas the latter were reserved for biochemical assays as required.

Leucocyte quantification in synovial lavage fluid

Aliquots of 50 μ L of synovial lavage fluid were diluted with 150 μ L of PBS. The number of total white cells was determined using a haemocytometer (Neubauer chamber); differential cell counting was performed after cytocentrifugation of the suspension (Citospin, Fanem, Sao Paulo, Brazil), staining with May-Grünwald-Giemsa and examination of the slides under a light microscope for identification of the cells (as neutrophils, lymphocytes or macrophages/monocytes) based on their characteristic nuclear morphology. The results were expressed as number of cells (×10⁵) per cavity.

Biochemical analysis

Myeloperoxidase (MPO) activity, a marker of neutrophil accumulation, was measured in the synovial lavage samples as previously described (Denadai-Souza *et al.*, 2009), based on the method originally described by Bradley *et al.* (1982). The concentrations of tumour necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin 6 (IL-6) in lavage fluid were measured by ELISA, using commercially available kits and according to instructions supplied by the manufacturer (R&D

Systems, Minneapolis, MN, USA). After deproteinization of the synovial lavages by ultrafiltration (10 kDa; Microcon centrifugal filter units), total nitrite/nitrate (NO_x⁻) concentrations were determined by the Griess reaction for nitrite, after the nitrate reductase-catalysed reduction of nitrate to nitrite, according to Grisham *et al.* (1996).

For measurement of total sulphide concentration, plasma and synovial lavages were diluted with 0.02 mM NaOH (1:10 and 1:5, respectively) and further analysed based on the formation of methylene blue, as described by Bian *et al.* (2006). The absorbance of the resulting chromophore was read at 670 nm (Spectra Max Plus, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), and sulphide concentrations were extrapolated from a calibration curve (prepared with aqueous Na₂S standard solutions within the concentration range 0.78–100 μ M).

Furthermore, synovial membranes were weighed and homogenized with cold Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.4) containing 1 mM phenylmethanesulphonylfluoride (PMSF) and 1 mM L-citrulline. The homogenates were centrifuged (at 1500 × g, 10 min), and both Ca²⁺-dependent and -independent NOS activity present were determined in the supernatant samples based on the [³H]-L-arginine to [³H]-L-citrulline conversion (Teixeira *et al.*, 2002).

The synovial membrane contents of proteins with 3-nitrotyrosine (NT) residues were determined, via Western blot analysis, in order to estimate the occurrence of this oxidative modification, as previously described (Teixeira *et al.*, 2002). Immunoreactive bands on synovial membrane NT formation were detected by chemiluminescence (Immun-Star, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), and their intensities were estimated by summation of band intensities of proteins within the 27–197 kDa MW range.

Collection of knee samples and histopathological analysis

The knee joints were removed from four to five animals per group, fixed in 4% formaldehyde buffered in PBS (pH 7.4), decalcified in 10% EDTA for 20 days, dehydrated and paraffin embedded. Two paraffin sagittal medial 5–6 μ m thick slices per joint were stained with haematoxylin and eosin. The assessment of the histological acute joint inflammatory scores was performed by an investigator unaware of the details of the study using semiquantitative grading scales of 0–3 (Roth *et al.*, 2005). The degree of infiltration of the synovial membrane by leucocytes and exudation of granulocytes in the joint space was evaluated in each case, as follows: 0 = no changes, 1 = mild changes, 2 = moderate changes and 3 = severe changes. Either the presence (score 1) or absence (score 0) of fibrin exudation in the joint space and periarticular inflammation was assessed, resulting in a maximum total score of 8 for acute inflammation.

Data analysis and statistical procedures

All results were expressed as mean $\pm$ SEM, for *n* animals. Differences among the groups were analysed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test. Medians obtained from the gait score test or histopathological grading score were analysed by non-parametric statistics applying the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test for

multiple comparisons (using the software GraphPad Prism Co., version 4.0, San Diego, CA, USA). Values of *P* lower than 0.05 were considered as significant.

Materials

CMC was obtained from Cromoline Química Fina Ltda (Diadema, São Paulo, Brazil). Carrageenan, DL-propargylglycine (2-amino-4-pentynoic acid), indomethacin (1-[4-chlorobenzoyl]-5-methoxy-2-methyl-3-indoleacetic acid), LR (2,4-bis[4-methoxyphenyl]-1,3,2,4-dithiadiphosphatane 2,4-disulphide), L-citrulline and PMSF were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). EDTA was purchased from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA). ELISA kits for TNF- α , IL-1 β and IL-6 determination were obtained from R&D Systems. Halothane was obtained from Cristália (Itapira, São Paulo, Brazil), and both ketamine and xylazine were purchased from König (Avellaneda, Argentina). L-[2,3,4,5-³H]-Arginine monohydrochloride and Na₂S·9H₂O were obtained from Amersham Biosciences do Brazil Ltda (São Paulo, Brazil) and Reagentes Químicos Dinâmica (São Paulo, Brazil) respectively. Microcon centrifugal filter units (kDa) and Immobilon Western Chemiluminescent AP substrate were obtained from Millipore Corporation (Bedford or Billerica, MA, USA). Anti-NT mouse monoclonal antibody 1A6 was obtained from Upstate (Lake Placid, NY, USA), and goat anti-mouse IgG (H + L) AP conjugated was purchased from Bio-Rad.

Results

Clinical evaluation

The i.art. injection of carrageenan resulted in significant secondary tactile allodynia in the ipsilateral hindpaw (*n* = 5) and impairment of the normal walking pattern as shown by the increased gait score obtained from the animals 4 h after the carrageenan injection (*n* = 7) in comparison to the saline solution injection (Figure 1A and B). Pretreatment of the animals with either the H₂S donor LR (3.6 μ mol per knee i.art., *n* = 8) or indomethacin (6 mg·kg⁻¹ i.p., *n* = 6) 1 h before carrageenan, ameliorated both the impaired mobility (decreased gait score by $54 \pm 9\%$ and $85 \pm 11\%$, respectively)

and secondary tactile allodynia in the ipsilateral hindpaw (Figure 1A and B). On the other hand, pretreatment of the carrageenan-injected animals with the CSE inhibitor PGly (53 μ mol per knee i.art.) did not affect the gait score significantly (Figure 1A, *n* = 8) and failed to significantly affect carrageenan-induced secondary tactile allodynia in the ipsilateral hindpaw, compared with vehicle-treated rats (Figure 1B, *n* = 5).

The i.art. injection of saline solution into the rat joint did not alter the knee diameter, when measured after 4 h (Figure 1C). In contrast, the i.art. injection of carrageenan resulted in a significant increase of the knee joint diameter

Figure 1 Effect of treatment with LR and DL-propargylglycine (PGly) on carrageenan-induced knee joint pain, secondary tactile allodynia in the ipsilateral hindpaw and knee swelling. Carrageenan-injected animals were pretreated with LR (3.6 μ mol per knee i.art., *n* = 8), PGly (53 μ mol i.art., *n* = 8), indomethacin (6 mg·kg⁻¹ i.p., *n* = 6) or vehicle (*n* = 7). A separate control group received only i.art. injection of saline injection (*n* = 4). (A) The walking behaviours scored on a scale from 0 (normal) to 3 (total joint immobility). In a separate set of animals, the secondary tactile allodynia in the ipsilateral hindpaw of vehicle- and pretreated groups was evaluated (B; *n* = 5 for all groups). (C) The joint swelling of the change in articular diameter in mm following carrageenan. Data from (B) and (C) are expressed as mean $\pm$ SEM. In (A), data are presented as a scatter plot with the median values for each experimental group. In (A), differences among groups were analysed by the non-parametric Kruskal–Wallis statistic test followed by Dunn's test for multiple comparisons. Data shown in (B) and (C) were analysed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's test for multiple comparisons. **P* < 0.05–****P* < 0.001 versus vehicle-treated animals.

Figure 2 Effect of treatment with LR and DL-propargylglycine on carrageenan-induced leucocyte influx in the knee joint. Carrageenan-injected animals were pretreated with LR (3.6 $\mu\text{mol i.art.}$, $n = 5$), PGly (53 $\mu\text{mol i.art.}$, $n = 4$), indomethacin (6 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ i.p.; $n = 5$) or vehicle ($n = 5$). A separate control group received only i.art. injection of saline ($n = 4$). Total leucocyte (A), neutrophil (B), lymphocyte (C) and macrophage (D) counts are expressed as mean $\pm$ SEM of cells ($\times 10^5$ per cavity). * $P < 0.05$ —*** $P < 0.001$ versus vehicle-treated animals. (One-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test).

($40 \pm 1\%$ relative to the value before carrageenan), which, similarly to the nociceptive assays, was significantly reduced by pretreating the animals with either LR or indomethacin, but not affected by PGly (Figure 1C).

Leucocyte recruitment into the articular cavity and MPO activity

As shown in Figure 2, synovial lavage fluid collected from rats with carrageenan-induced synovitis showed a significantly higher number of total leucocytes when compared with those obtained from the saline solution-injected group (Figure 2A), and this increase was due to neutrophils (Figure 2B) and lymphocytes mainly (Figure 2C), but not monocytes/macrophages (Figure 2D). Pretreatment of the animals with LR or indomethacin resulted in a significant reduction in both neutrophils and lymphocytes in the articular cavity, whereas pretreatment with PGly not only failed to affect these numbers but also caused a significant increase in the number of macrophages (Figure 2D).

Likewise, increased MPO activity was found in the synovial lavage fluid collected from rats with carrageenan-induced synovitis, compared with that obtained from the saline solution-injected group (Table 1, $n = 6$ each group), and this increase was significantly reduced by pretreatment of the animals with LR (Table 1, $n = 6$) or indomethacin (Table 1,

Table 1 Effect of treatment with LR and DL-propargylglycine (PGly) on MPO activity, IL-1 β and NO $_x^-$ concentrations in synovial lavage fluid after the i.art. injection of carrageenan

Group	MPO activity (U·mL ⁻¹)	IL-1 β (pg·mL ⁻¹)	NO $_x^-$ (μM)
Saline	5 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1	26.2 $\pm$ 0.8
Vehicle + carrageenan	281 $\pm$ 42***	1632 $\pm$ 385***	55.5 $\pm$ 4.0***
LR + carrageenan	74 $\pm$ 10***	716 $\pm$ 131#	58.0 $\pm$ 2.0
PGly + carrageenan	257 $\pm$ 37	1605 $\pm$ 325	81.5 $\pm$ 6.4##
Indomethacin + carrageenan	79 $\pm$ 13##	721 $\pm$ 53##	45.5 $\pm$ 4.0

* $P < 0.05$ —*** $P < 0.001$ versus saline, and # $P < 0.05$ —## $P < 0.001$ versus carrageenan. (One-way anova followed by Bonferroni's multiple comparison t -test).

Carrageenan-injected animals were pretreated with LR (3.6 $\mu\text{mol i.art.}$), PGly (53 $\mu\text{mol i.art.}$), indomethacin (6 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ i.p.) or vehicle. After 4 h, MPO activity, IL-1 β and NO $_x^-$ concentrations present in the synovial lavage fluids were measured. Data are expressed as mean $\pm$ SEM for n animals.

$n = 4$), whereas pretreatment with PGly had no effect (Table 1, $n = 4$).

Histological scores

Knee specimens from control rats had a normal histological appearance with scattered cell infiltration in the synovium and typical preserved lining layer (Figure 3A), resulting in a

Figure 3 Photomicrographs from rat knee joints stained with haematoxylin and eosin; light microscopy with low (50×, column 1); medium (100×, column 2) and high magnification (640×, column 3). (A) 1, 2 and 3 show the articular joints of rats injected with saline, which exhibit normal histological features, with intact synovial membranes and no evidence of inflammation; note the black arrows indicate resident cells. (B) 1, 2 and 3 illustrate the articular joints of carrageenan-injected rat, and reveal a pronounced inflammatory response. The square area in (B) 2 reveals [at high magnification in (B) 3] several polymorphonuclear cells (black arrows) and plasma exudates. (C) 1, 2 and 3 show that polymorphonuclear cell migration was decreased and more localized in animals pretreated with LR before carrageenan injection. Both the lining and sublining layers of synovium present low cellularity, and there are no signs of extensive exudates [see (C) 2 and 3]. (D) 1, 2 and 3 reveal high degree of leucocyte migration to the joint cavity of synovitic rats pretreated with PGly. The square area in (D) 2 is shown at high magnification in (D) 3, illustrating in detail polymorphonuclear cells (black arrows) along with a significant plasma exudate. (E) 1, 2 and 3 show the articular joints of rats pretreated with indomethacin prior i.art. injection with carrageenan. In (E) 2, it can be seen that the synovium presents a low inflammatory level, and leucocytes are restricted to small focal areas, as shown in (E) 3 (black arrows). Cartilage and bone were in normal condition in all samples analysed. Abbreviations: AC, articular cartilage; JC, joint cavity; M, meniscus; SM, synovial membrane; T, tibia.

Figure 4 Histopathological scores. Carrageenan-injected animals were pretreated with LR (3.6 μ mol i.art., $n = 5$), DL-propargylglycine (PGly; 53 μ mol i.art., $n = 5$), indomethacin (6 mg·kg⁻¹ i.p., $n = 4$) or vehicle ($n = 5$). A separate set of animals received only i.art. injection of saline ($n = 4$). In the specimens from rats pretreated with LR or indomethacin, a significant reduction of the acute inflammation score was observed as compared to the control group. No significant differences were observed between PGly-treated group and control rats. Results are expressed as box and whisker plots (median, IQR, minimum and maximum values of histopathological score). Differences among the experimental groups were assessed using Kruskal–Wallis non-parametric analysis followed by Dunn's test for multiple comparisons. * $P < 0.05$ versus vehicle-treated animals.

score of 0 (Figure 4). At 4 h after i.art. injection of carrageenan, the synovial membranes in the rat knee cavity displayed an intense and widespread cell infiltration, mostly due to neutrophils and occasional macrophages. The lining layers were atypical due to the presence of a leucocyte infiltration, in addition to a marked presence of fibrin-containing exudate (oedema) in the synovium and joint cavity (Figure 3B), resulting in a significant acute inflammatory score (>6 ; Figure 4). In synovitic rats treated with LR (Figure 3C) or indomethacin (Figure 3E), both neutrophil infiltration and oedematous areas (fibrinous exudate) were reduced, producing a significantly lower histological score (<3) compared to vehicle-treated group (Figure 4), and no hyperplasia of the lining layer was detected. Specimens from rats pretreated with PGly showed morphological changes, including leucocyte infiltra-

tion, oedema and atypical lining layer (Figure 3D), with a histological score similar to that seen in vehicle-treated rats (Figure 4).

Total sulphide concentrations

Neither carrageenan alone nor following pretreatment with LR or indomethacin altered the concentrations of total sulphide (i.e. $S^{2-} + HS^- + H_2S$) measured in synovial lavage fluid samples. However, PGly pretreatment resulted in significant reduction of total sulphide concentration (approximately 75%) in comparison with the control group ($P < 0.05$; Figure 5A). None of the treatments had any effect on the circulating concentrations of total sulphide species ($n = 5$ –6 animals; Figure 5B).

Synovial NO_x^- concentration

The concentrations of NO_x^- (nitrite + nitrate) in the synovial lavage fluid samples obtained from carrageenan-injected rats were significantly higher ($P < 0.001$) than those found in the control animals (Table 1; $n = 4$). Pretreatment with either the H₂S donor or indomethacin did not affect the NO_x^- production in response to carrageenan, but PGly pretreatment increased the NO_x^- concentration measured in the synovial lavage fluid from synovitic rats (Table 1; $n = 4$ each group).

Synovial NOS activity

Ca^{2+} -dependent NOS activity was significantly reduced by approximately 80% in the synovial membrane homogenates obtained from the carrageenan-injected rats, either untreated or pretreated with PGly or indomethacin (Figure 6A). However, this response was partially, although significantly, reversed by pretreatment with LR (Figure 6A).

In terms of synovial Ca^{2+} -independent NOS activity, the i.art. injection of carrageenan led to a significant augmentation of this activity (approximately five times higher than in the control animals; $P < 0.05$; Figure 6B), which was unaffected by pretreatment of the animals with either the LR reagent or indomethacin. On the other hand, pretreatment with the CSE inhibitor PGly resulted in a twofold increase of this Ca^{2+} -independent NOS activity when compared with the untreated carrageenan group ($P < 0.01$; Figure 6B).

Protein NT levels

The i.art. injection of carrageenan markedly increased the content of NT in synovial membranes, compared to that in

Figure 5 Effect of treatment with LR and DL-propargylglycine on total sulphide concentration in synovial lavage fluid and plasma. Carrageenan-injected animals were pretreated with LR (3.6 μmol i.art., $n = 4-5$), DL-propargylglycine (PGly; 53 μmol i.art., $n = 4$), indomethacin (6 mg·kg⁻¹ i.p., $n = 4-5$) or vehicle ($n = 4-5$). A separate control group received only i.art. injection of saline ($n = 4-5$). The total sulphide concentrations in articular lavage fluid (A; $n = 4$) or plasma (B; $n = 5$) were expressed as mean ± SEM of concentrations in μM. * $P < 0.05$ versus saline and # $P < 0.05$ versus vehicle-treated animals. (One-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test).

samples from the saline-injected group (198 ± 23 vs. $100 \pm 7.13\%$, respectively; $P < 0.01$, $n = 5$ for each group). None of the pretreatments (e.g. LR, PGly or indomethacin) significantly affected this response (LR: 166 ± 17 , PGly: 173 ± 16 and indomethacin: 123 ± 45 , as % of saline group; $n = 5$ for each group).

Cytokine production in the rat knee joint

The i.art. injection of carrageenan into the rat knee cavity resulted in significant increase of IL-1β (Table 1; $n = 5$), in the synovial lavage fluid, which was significantly reduced by pretreatment of the animals with LR (Table 1; $n = 5$) or indomethacin (Table 1; $n = 9$), but remained unchanged in those animals treated with the CSE inhibitor, PGly (Table 1; $n = 9$). Under our experimental conditions, neither TNF-α nor IL-6 concentrations were detectable (the detection limits were 1.95 and 0.98 pg·mL⁻¹ respectively).

Figure 6 Effect of treatment with LR and DL-propargylglycine (PGly) on NO synthase activity in synovial membranes. Carrageenan-injected animals were pretreated with LR (3.6 μmol i.art., $n = 5$), PGly (53 μmol i.art., $n = 5$), indomethacin (6 mg·kg⁻¹ i.p., $n = 5$) or vehicle ($n = 5$). A separate control group received only i.art. injection of saline ($n = 5$). The calcium-dependent NOS (A) or calcium-independent NOS (B) activities were expressed as mean ± SEM of enzyme activity in pmol·min⁻¹·mg⁻¹ of protein. * $P < 0.05$ —*** $P < 0.001$ versus saline, and ^{##} $P < 0.01$ versus vehicle-treated animals. (One-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test).

Discussion and conclusions

A number of both *in vivo* and *in vitro* studies provide evidence that the gaseous transmitter H₂S plays an important role as a modulator of inflammatory processes in various tissues, by acting on multiple targets. In this work, we show that the i.art. administration of H₂S donor LR results in significant amelioration of the inflammatory, pain process and secondary tactile allodynia evoked by carrageenan injected into the rat knee joint. The anti-nociceptive properties of LR in our model of synovitis joint pain were functionally assessed by both the gait score and electronic von Frey tests. We also show that the inhibition of CSE, one of the enzymes responsible for the production of endogenous H₂S by PGly, does not affect the progression of the disease in terms of joint swelling, pain or leucocyte migration, except for the higher number of

macrophages and increased iNOS-derived NO production that this treatment causes.

To the best of our knowledge, there are no previous reports on the protective effects of H₂S on nociception or tactile allodynia secondary to acute joint inflammation in the rat. Our identification of a protective effect of H₂S against behavioural joint pain, secondary tactile allodynia in the ipsilateral hindpaw and knee inflammation are in contrast with those from Andruski *et al.* (2008) who, despite detecting an anti-inflammatory effect of H₂S, failed to show significant alterations in the mouse pain behaviour secondary to carrageenan/kaolin-induced arthritis. The reason for this discrepancy is unknown, but as they have used mice and we have used rats, this may indicate a species difference in the modulatory roles of H₂S during joint inflammation. In addition, while our knee joint inflammation model was evoked by a single i.art. injection of carrageenan, and both the pain behaviour and secondary allodynia were measured 4 h later, these authors produced experimental arthritis in mice by i.art. injection of a carrageenan and kaolin mixture, and pain was assessed 24 h later.

A similar divergence among anti-nociceptive and pro-nociceptive effects of H₂S donors has emerged from other experimental models. Using the colorectal distension model (CRD) that mimics some features of irritable bowel syndrome, Distrutti *et al.* (2006) showed that H₂S inhibits CRD-induced nociception in both healthy and post-colitic rats. This inhibition was suggested to occur via activation of K_{ATP} channels and NO production. According to Cunha *et al.* (2008), the systemic administration of NaHS reduced both the LPS- and PGE₂-induced mechanical hypersensitivity in mice, without affecting the thermal nociceptive threshold in the hot plate test, thus indicating a peripheral anti-nociceptive mechanism for H₂S. Pro-nociceptive effects of H₂S have been proposed to occur through sensitization/activation of T-type Ca²⁺ channels (Maeda *et al.*, 2009). Collectively, these studies indicate that H₂S plays a dual role in the pathogenesis of inflammatory pain, with the balance between pro- and anti-nociceptive effects determined by the amount and site of release, and influenced by leucocyte migration and species difference.

The carrageenan-induced recruitment of neutrophils and lymphocytes into the knee joint was also markedly reduced in animals pretreated with either LR or indomethacin. In addition to the cell counting and MPO activity measurements, the histological analysis shows the presence of exudate and leucocyte (mainly neutrophils) accumulation within the lining and the sublining layers of the inflamed knee synovium. These effects were significantly attenuated in rats pretreated with LR or indomethacin, but not with PGly, thus suggesting that H₂S modulates the process of leucocyte recruitment. Supporting this finding, Zanardo *et al.* (2006) demonstrated that leucocyte infiltration in the rodent air pouch model was inhibited by H₂S donors (via activation of K_{ATP} channels) and exacerbated by the inhibition of endogenous H₂S synthesis. Likewise, Andruski *et al.* (2008) showed that H₂S donors reduced leucocyte infiltration in the mouse knee possibly via local vasoconstriction caused by H₂S. This was a surprising result, as the vasodilatory effects of H₂S are well known and systemic H₂S can cause hypotension in anaesthetized rats (Zhao *et al.*, 2001). An alternative mechanism by which H₂S

could inhibit leucocyte infiltration seems to be through inhibition of the intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and/or promotion of neutrophil apoptosis (Mariggiò *et al.*, 1998). In a rodent model of non-steroidal anti-inflammatory drug gastropathy, NaHS attenuated the gastric mucosal lesions, as well as decreasing the inflammatory markers of this condition, such as TNF- α and ICAM-1 (Fiorucci *et al.*, 2005).

Furthermore, elevated NO_x⁻ concentrations were found in the synovial cavity of rats with synovitis, as well as increased Ca²⁺-independent iNOS and decreased Ca²⁺-dependent NOS activity in the synovial homogenates. These results are in agreement with previous reports that show increased nitrite concentrations in synovial fluid and serum samples from patients with RA or osteoarthritis (Farrell *et al.*, 1992). Increased iNOS expression was also detected in joint synoviocytes, macrophages and chondrocytes from patients with RA (Yonekura *et al.*, 2003), and that treatment with iNOS inhibitors results in an effective reduction of arthritis severity (Connor *et al.*, 1995; Stefanovic-Racic *et al.*, 1995; Pelletier *et al.*, 1998). Interestingly, carrageenan-induced increased iNOS activity and NO_x⁻ concentration in the knee cavity were potentiated by PGly, whereas neither LR nor indomethacin had a significant effect on these parameters. This indicates the importance of negative inhibition of iNOS-derived NO production by endogenous H₂S on the prevention of macromolecular damage caused by prolonged exposure to high concentrations of NO or its reaction products. Our *in vivo* results are supported by studies showing that H₂S donors decrease recombinant iNOS activity (Kubo *et al.*, 2007), in addition to reducing iNOS protein expression and NO_x⁻ production by RAW264.7 macrophages *in vitro* (Oh *et al.*, 2006). The lack of effects of indomethacin on NO production (and iNOS activity) is in agreement with a previous study, in which the authors suggested that aspirin (but not indomethacin) inhibited increased iNOS expression and NO production in response to LPS-stimulated macrophages, and that was exclusively due to irreversible COX-2 acetylation (Amin *et al.*, 1995).

Subsequently, we found that i.art. administration of carrageenan results in increased nitration of protein tyrosine residues (3-NT) in the synovial membrane, and none of the treatments (e.g. LR, indomethacin or PGly) were capable of affecting this response, thus confirming that the observed beneficial effects of either LR or indomethacin occur independently, and in spite of the augmented iNOS activity, NO production and tyrosine nitration (probably via NO-derived peroxynitrous acid).

We showed that Ca²⁺-dependent NOS activity was significantly reduced (>80%) in the carrageenan-treated animals, either untreated or pretreated with PGly or indomethacin, and pretreatment with LR partially prevented this reduction. Interestingly, the preservation of constitutive endothelial NOS activity can control leucocyte-endothelium interactions (Kubes *et al.*, 1991; Wahl *et al.*, 2003), and thus account for the reduced number of infiltrating cells in the knee cavity of LR-treated rats. In line with these observations, the higher number of macrophages found in the joint cavity of PGly-treated rats may indicate increased macrophage-endothelium interaction secondary to the removal of endogenous H₂S, and as a consequence, augmented synovial iNOS due to the higher

number of activated macrophages. It is thus evident that the interplay between H₂S and NOS isoforms is extremely complex, considering that in addition to H₂S and NOS isoforms and activity discussed above, the cross-talk between iNOS and the other NOS isoforms must also be taken into account (Persichini *et al.*, 2006).

A number of studies show the relative importance of IL-1 β in the pathophysiology of RA, because of its greater capacity (compared to TNF- α) to increase matrix degradation by inducing the production of iNOS, receptor activator of NF- κ B ligand, matrix metalloproteinases and eicosanoids in synovial cells (Dayer, 2002). IL-1 β also stimulates production of mediators involved in the destruction of the extracellular matrix, the cartilage and bone resorption. Over the time period studied following carrageenan-induced synovitis, concentrations of IL-1 β , but not TNF- α or IL-6, were significantly raised in the synovial lavage, and pretreatment with indomethacin or LR (but not with PGly) partially prevented this increase. However, we cannot establish a direct relationship between IL-1 β and iNOS activity as, on one hand, pretreatment with LR resulted in lower IL-1 β levels and unaltered iNOS activity (or synovial NO_x⁻ concentrations), and on the other hand, carrageenan-injected rats showed higher synovial iNOS activity (and increased synovial NO_x⁻ concentrations) with unaltered IL-1 β serum levels after PGly treatment. IL-1 β gene transcription is regulated by several pathways, including the activation of NF- κ B (Koenders *et al.*, 2006) and mitogen-activated protein kinase p38 (MAPK; Baldassare *et al.*, 1999). In a rat model of myocardial ischaemia/reperfusion, Sivarajah *et al.* (2009) reported that the cardioprotective effects of H₂S donors are mediated, at least in part, by inhibition of both p38 MAPK phosphorylation and translocation from the cytosol to the nucleus of the p65 subunit of NF- κ B. This mechanism may also directly reduce carrageenan-induced IL-1 β production in the rat knee joint, in addition to the diminished IL-1 β production due to decreased leucocyte migration to the knee joint.

Following carrageenan-induced synovitis, pretreatment with PGly did not result in systemic effects, but effectively inhibited local H₂S production, as shown by the reduced concentrations of total sulphide measured in the knee cavity. Treatment with LR did not result in a corresponding increase of articular sulphide, despite its pharmacological effects. There is evidence that H₂S is rapidly cleared by rapid reaction with oxygen- and nitrogen-derived anions, such as superoxide (Chang *et al.*, 2008), peroxynitrite (Whiteman *et al.*, 2004) or hypochlorite (Whiteman *et al.*, 2005). Considering that these species are usually present in high amounts during inflammatory processes, in addition to their high reactivity towards proteins, lipids and nucleotides, it is possible that the beneficial effects of the H₂S donor were partly due to chemical scavenging of deleterious reactive species. In fact, H₂S prevents peroxynitrite anion production (and the resulting tyrosine nitration) via the formation of an intermediate nitrosothiol (Whiteman *et al.*, 2006). Thus, the occurrence of these reactions explains the consumption of LR-derived H₂S, and then the lack of increase of total sulphide concentrations in the synovial lavages. Acute measurement of sulphide species in the rat knee following the i.art. injection of LR identified a rapid increase followed by an exponential decay with a half-

life of approximately 22 min (data not shown). This seems to be also the case after the administration of pure H₂S (Dorman *et al.*, 2002). Indeed, Whitfield *et al.* (2008) show that exogenous sulphide was rapidly removed from blood and plasma *in vitro* and from intact trout *in vivo*. We measured total sulphide concentrations in the knee cavity 5 h following LR pretreatment, and found that the concentration of sulphide in the knee cavity was at the basal level, reinforcing the finding of rapid H₂S metabolism. Taken together, we can speculate that the biochemical reactions underlying the protective effect of LR on carrageenan-induced synovitis must occur during the first 2 h following injection of this compound (~5 half-lives to achieve the basal sulphide concentrations), of which the last 60 min was after carrageenan injection. This argument is strengthened by the notion that LR is similar to other H₂S donors (e.g. NaSH or Na₂S), which are important modulators of inflammatory events in other tissues (Zanardo *et al.*, 2006; Wallace, 2007; Medeiros *et al.*, 2009).

Overall, even though the effects of the H₂S donor, LR, are very short lived, we showed a long-lasting effect on carrageenan-induced pain behavioural responses, secondary allodynia and knee inflammation, thus reinforcing the importance of H₂S as an anti-inflammatory and analgesic mediator. This result also shows the differences between endogenously produced and exogenously administered H₂S in terms of their actions on the various components of the knee joint inflammatory pathophysiology. While exogenous H₂S supply in the rat knee can inhibit pain, swelling, IL-1 β synthesis and neutrophil/lymphocyte influx in response to i.art. injection of carrageenan, endogenous H₂S seems to regulate macrophage migration and NO production.

Furthermore, it is possible that the early supply of H₂S in conditions such as RA might reduce the severity and speed of progression of the disease, and can be an attractive possible mechanism to explain the benefit of LR treatment on carrageenan-induced synovitis. Interestingly, the novel hydrogen sulphide donors slow-releasing molecules (Li *et al.*, 2009; Whiteman *et al.*, 2009) in addition to the anti-inflammatory drugs that are modified to release H₂S (Wallace, 2007) have important implications for anti-inflammatory drug development, and might be a useful insight to the therapy of acute and chronic joint inflammation. However, their effects in different arthritis models must be studied further before any firm conclusions can be drawn.

It is clear that H₂S can interact with inflammatory cells and mediators, and the study of these interactions is further complicated by their reciprocal cross-talk. Nevertheless, we conclude that our results support the development and use of H₂S donors as potential alternatives (or complementary) to the available anti-inflammatory compounds used for treatment of arthritis or relief of its symptoms.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Ekundi-Valentim is a recipient of scholarship from University

Agostinho Neto (Angola). The authors thank Mrs MAA Barreto and IM Gouveia for their valuable technical assistance.

Conflicts of interest

None.

References

- Alexander SPH, Mathie A, Peters JA (2009). Guide to Receptors and Channels (GRAC), 4th edn. *Br J Pharmacol* **158** (Suppl. 1): S1–S254.
- Amin AR, Vyas P, Attur M, Leszczynska-Piziak J, Patel IR, Weissmann G *et al.* (1995). The mode of action of aspirin-like drugs: effect on inducible nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 7926–7930.
- Andruski B, McCafferty DM, Ignacy T, Millen B, McDougall JJ (2008). Leukocyte trafficking and pain behavioral responses to a hydrogen sulfide donor in acute monoarthritis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **295** (3): R814–R820.
- Awata S, Nakayama K, Suzuki I, Sugahara K, Kodama H (1995). Changes in cystathionine gamma-lyase in various regions of rat brain during development. *Biochem Mol Biol Int* **35**: 1331–1338.
- Baldassare JJ, Bi Y, Bellone CJ (1999). The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-1 beta transcription. *J Immunol* **162** (9): 5367–5373.
- Bhatia M, Sidhapuriwala J, Moolchhala SM, Moore PK (2005a). Hydrogen sulphide is a mediator of carrageenan-induced hindpaw oedema in the rat. *Br J Pharmacol* **145** (2): 141–144.
- Bhatia M, Wong FL, Fu D, Lau HY, Moolchhala SM, Moore PK (2005b). Role of hydrogen sulphide in acute pancreatitis and associated lung injury. *FASEB J* **19** (6): 623–625.
- Bian JS, Yong QC, Pan TT, Feng ZN, Ali MY, Zhou S *et al.* (2006). Role of hydrogen sulphide in the cardioprotection caused by ischemic preconditioning in the rat heart and cardiac myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* **316** (2): 670–678.
- Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G (1982). Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* **78** (3): 206–209.
- Chang L, Geng B, Yu F, Zhao J, Jiang H, Du J *et al.* (2008). Hydrogen sulfide inhibits myocardial injury induced by homocysteine in rats. *Amino Acids* **34** (4): 573–585.
- Collin M, Anuar FB, Murch O, Bhatia M, Moore PK, Thiemermann C (2005). Inhibition of endogenous hydrogen sulfide formation reduces the organ injury caused by endotoxemia. *Br J Pharmacol* **146** (4): 498–505.
- Connor JR, Manning PT, Settle SL, Moore WM, Jerome GM, Webber RK *et al.* (1995). Suppression of adjuvant-induced arthritis by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* **273** (1–2): 15–24.
- Cunha TM, Dal-Secco D, Verri WA Jr, Guerrero AT, Souza GR, Vieira SM *et al.* (2008). Dual role of hydrogen sulfide in mechanical inflammatory hypernociception. *Eur J Pharmacol* **590** (1–3): 127–135.
- Dayer JM (2002). Evidence for the biological modulation of IL-1 activity: the role of IL-1Ra. *Clin Exp Rheumatol* **20** (5 Suppl. 27): S14–S20.
- Denadai-Souza A, Camargo LD, Ribela MT, Keeble JE, Costa SK, Muscará MN (2009). Participation of peripheral tachykinin NK(1) receptors in the carrageenan-induced inflammation of the rat temporomandibular joint. *Eur J Pain* **13** (8): 812–819.
- Distrutti E, Sediari L, Mencarelli A, Renga B, Orlandi S, Antonelli E *et al.* (2006). Evidence that hydrogen sulphide exerts antinociceptive effects in the gastrointestinal tract by activating KATP channels. *J Pharmacol Exp Ther* **316** (1): 325–335.
- Dorman DC, Moulin FJ, McManus BE, Mahle KC, James RA, Struve MF (2002). Cytochrome oxidase inhibition induced by acute hydrogen sulfide inhalation: correlation with tissue sulfide concentrations in the rat brain, liver, lung, and nasal epithelium. *Toxicol Sci* **65**: 18–25.
- Farrell AJ, Blake DR, Palmer RM, Moncada S (1992). Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* **51** (11): 1219–1222.
- Fiorucci S, Antonelli E, Distrutti E, Rizzo G, Mencarelli A, Orlandi S *et al.* (2005). Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by anti-inflammatory nonsteroidal drugs. *Gastroenterology* **129** (4): 1210–1224.
- Grabski M, Wozakowska-Kaplon B, Kedziora J (2004). Hydrogen sulphide water balneum effect on erythrocyte superoxide dismutase activity in patients with rheumatoid arthritis – *in vitro* study. *Przegl Lek* **61** (12): 1405–1409.
- Grisham MB, Johnson GG, Lancaster JR Jr (1996). Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Methods Enzymol* **268**: 237–246.
- Ibadova GD, Mamishev SN, Zavora MI, Sarian LA (2005). Combined use of hydrogen sulphide baths and galvanopeloid therapy with magnetolaser radiation in osteoarthritis patients at a health resort. *Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult* **4**: 23–25.
- Kimura H (2002). Hydrogen sulphide as a neuromodulator. *Mol Neurobiol* **26** (1): 13–19.
- Kimura H, Nagai Y, Umemura K, Kimura Y (2005). Physiological roles of hydrogen sulphide: synaptic modulation, neuroprotection, and smooth muscle relaxation. *Antioxid Redox Signal* **7** (5–6): 795–803.
- Koenders MI, Joosten LAB, Van den Berg WB (2006). Potential new targets in arthritis therapy: interleukin (IL)-17 and its relation to tumour necrosis factor and IL-1 in experimental arthritis. *Ann Rheum Dis* **65** (Suppl. 3): 29–33.
- Kubes P, Suzuki M, Granger DN (1991). Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* **88** (11): 4651–4655.
- Kubo S, Kurokawa Y, Doe I, Masuko T, Sekiguchi F, Kawabata A (2007). Hydrogen sulphide inhibits activity of three isoforms of recombinant nitric oxide synthase. *Toxicology* **241** (1–2): 92–97.
- Lee HS, Lee CH, Tsai HC, Salter DM (2009). Inhibition of cyclooxygenase 2 expression by diallyl sulphide on joint inflammation induced by urate crystal and IL-1β. *Osteoarthritis Cartilage* **17** (1): 91–99.
- Li L, Rossoni G, Sparatore A, Lee LC, Del Soldato P, Moore PK (2007). Anti-inflammatory and gastrointestinal effects of a novel diclofenac derivative. *Free Radic Biol Med* **42** (5): 706–719.
- Li L, Salto-Tellez M, Tan CH, Whiteman M, Moore PK (2009). GYY4137, a novel hydrogen sulfide-releasing molecule, protects against endotoxic shock in the rat. *Free Radic Biol Med* **47** (1): 103–113.
- Maeda Y, Aoki Y, Sekiguchi F, Matsunami M, Takahashi T, Nishikawa H *et al.* (2009). Hyperalgesia induced by spinal and peripheral hydrogen sulphide: evidence for involvement of Cav3.2 T-type calcium channels. *Pain* **142**: 127–132.
- Mariggiò MA, Minunno V, Riccardi S, Santacroce R, De Rinaldis P, Fumarulo R (1998). Sulphide enhancement of PMN apoptosis. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **20**: 399–408.
- Medeiros JV, Bezerra VH, Gomes AS, Barbosa AL, Lima-Júnior RC, Soares PM *et al.* (2009). Hydrogen sulfide prevents ethanol-induced gastric damage in mice: role of ATP-sensitive potassium channels and capsaicin-sensitive primary afferent neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **330**: 764–770.
- Neugebauer V, Han JS, Adwanikar H, Fu Y, Ji G (2007). Techniques for assessing knee joint pain in arthritis. *Mol Pain* **28**: 3–8.
- Oh GS, Pae HO, Lee BS, Kim BN, Kim JM, Kim HR *et al.* (2006). Hydrogen sulphide inhibits nitric oxide production and nuclear factor-kappaB via heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Free Radic Biol Med* **41**: 106–119.

- Otsuki T, Nakahama H, Niizuma H, Suzuki J (1986). Evaluation of the analgesic effects of capsaicin using a new rat model for tonic pain. *Brain Res* **365** (2): 235–240.
- Patacchini R, Santicoli P, Giuliani S, Maggi CA (2004). Hydrogen sulfide (H₂S) stimulates capsaicin-sensitive primary afferent neurons in the rat urinary bladder. *Br J Pharmacol* **142** (1): 31–34.
- Pelletier JP, Mineau F, Fernandes JC, Duval N, Martel-Pelletier J (1998). Diacerhein and rhein reduce the interleukin 1beta stimulated inducible nitric oxide synthesis level and activity while stimulating cyclooxygenase-2 synthesis in human osteoarthritic chondrocytes. *J Rheumatol* **25** (12): 2417–2424.
- Persichini T, Cantoni O, Suzuki H, Colasanti M (2006). Cross-talk between constitutive and inducible NO synthase: an update. *Antioxid Redox Signal* **8** (5–6): 949–954.
- Roth A, Mollenhauer J, Wagner A, Fuhrmann R, Straub A, Venbrocks RA *et al.* (2005). Intra-articular injections of high-molecular-weight hyaluronic acid have biphasic effects on joint inflammation and destruction in rat antigen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* **7**: R677–R686.
- Sivarajah A, Collino M, Yasin M, Benetti E, Gallicchio M, Mazzon E *et al.* (2009). Antiapoptotic and anti-inflammatory effects of hydrogen sulphide in a rat model of regional myocardial I/R. *Shock* **31** (3): 267–274.
- Stefanovic-Racic M, Stadler J, Evans CH (1995). Nitric oxide and arthritis. *Arthritis Rheum* **38** (10): 1529–1531.
- Stipanuk MH, Beck PW (1982). Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphydration in liver and kidney of the rat. *Biochem J* **206** (2): 267–277.
- Szabó C (2007). Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* **6** (11): 917–935.
- Teixeira SA, Castro GM, Papes F, Martins ML, Rogério F, Langone F *et al.* (2002). Expression and activity of nitric oxide synthase isoforms in rat brain during the development of experimental allergic encephalomyelitis. *Brain Res Mol Brain Res* **99** (1): 17–25.
- Wahl SM, McCartney-Francis N, Chan J, Dionne R, Ta L, Orenstein JM (2003). Nitric oxide in experimental joint inflammation. Benefit or detriment? *Cells Tissues Organs* **174** (1–2): 26–33.
- Wallace JL (2007). Hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drugs. *Trends Pharmacol Sci* **28** (10): 501–505.
- Wang R (2002). Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J* **16** (13): 1792–1798.
- Whiteman M, Armstrong JS, Chu SH, Jia-Ling S, Wong BS, Cheung NS *et al.* (2004). The novel neuromodulator hydrogen sulphide: an endogenous peroxynitrite 'scavenger'? *J Neurochem* **90** (3): 765–768.
- Whiteman M, Cheung NS, Zhu YZ, Chu SH, Siau JL, Wong BS *et al.* (2005). Hydrogen sulphide: a novel inhibitor of hypochlorous acid-mediated oxidative damage in the brain? *Biochem Biophys Res Commun* **326** (4): 794–798.
- Whiteman M, Li L, Kostetski I, Chu SH, Siau JL, Bhatia M *et al.* (2006). Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide. *Biochem Biophys Res Commun* **343** (1): 303–310.
- Whiteman M, Li L, Rose P, Tan CH, Parkinson D, Moore P (2009). The effect of hydrogen sulfide donors on lipopolysaccharide-induced formation of inflammatory mediators in macrophages. *Antioxid Redox Signal* [Epub ahead of print] PMID: 19769459.
- Whitfield NL, Kreimier EL, Verdial FC, Skovgaard N, Olson KR (2008). Reappraisal of H₂S/sulfide concentration in vertebrate blood and its potential significance in ischemic preconditioning and vascular signaling. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **294**: R1930–R1937.
- Wozakowska-Kaplon B, Grabski M, Kedziora J (2006). Hydrogen sulphide water balneum effect on erythrocyte catalase activity in patients with rheumatoid arthritis – *in vitro* study. *Wiad Lek* **59** (1–2): 72–77.
- Yelin E (2007). Work disability in rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol* **19** (2): 91–96.
- Yonekura Y, Koshiishi I, Yamada K, Mori A, Uchida S, Nakamura T *et al.* (2003). Association between the expression of inducible nitric oxide synthase by chondrocytes and its nitric oxide-generating activity in adjuvant arthritis in rats. *Nitric Oxide* **8** (3): 164–169.
- Zanardo RC, Brancalone V, Distrutti E, Fiorucci S, Cirino G, Wallace JL (2006). Hydrogen sulphide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. *FASEB J* **20** (12): 2118–2120.
- Zhang H, Zhi L, Mochhala S, Moore PK, Bhatia M (2007). Hydrogen sulfide acts as an inflammatory mediator in cecal ligation and puncture-induced sepsis in mice by upregulating the production of cytokines and chemokines via NF-kappaB. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **292** (4): L960–L971.
- Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R (2001). The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J* **20** (21): 6008–6016.