LÍVIA DE LUCCA CAMARGO

**CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DO PAPEL DA
HEMOPRESSINA E DAS FIBRAS C NO MODELO DE
ARTRITE INDUZIDA POR ANTÍGENO EM RATOS.**

LÍVIA DE LUCCA CAMARGO

**CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DO PAPEL DA
HEMOPRESSINA E DAS FIBRAS C NO MODELO DE
ARTRITE INDUZIDA POR ANTÍGENO EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia do Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas

São Paulo

2007

LÍVIA DE LUCCA CAMARGO

**CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DO PAPEL DA
HEMOPRESSINA E DAS FIBRAS C NO MODELO DE
ARTRITE INDUZIDA POR ANTÍGENO EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia do Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Profa.Dra. Soraia Kátia Pereira Costa

São Paulo

2007

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

© reprodução total

Camargo, Lívia de Lucca.

Caracterização farmacológica do papel da hemopressina e das fibras C no modelo de artrite induzida por antígeno em ratos / Lívia de Lucca Camargo. -- São Paulo, 2007.

Orientador: Soraia Katia Pereira Costa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Farmacorregulação da inflamação neurogênica e dor.

Versão do título para o inglês: Pharmacological characterization of hemopressin and C fibres in antigen-induced arthritits in rats.

Descritores: 1. Artrite reumatóide 2. Inflamação neurogênica 3. Artrite induzida por antígeno 4. Hemopressina I. Costa, Soraia Katia Pereira II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

ICB/SBIB189/2007

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 **127** nas fls. **21** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do(a) Prof.(a) Dr.(a) Soraia Kátia P. Costa, Coordenador(a) da Linha de Pesquisa "**Efeitos e consequências de toxinas animais e substâncias tóxicas ou irritantes sobre as respostas neurovasculares em roedores**" do qual participou(aram) o(s) aluno(s): **Aila Mirtes Teles, Juliano Fernandes de Oliveira, Lúdia Mitiko Yshii, Mônica Magalhães C. Dantas, Lívia de Lucca Camargo, Juliana Florenzano e o pesquisador Marcelo N. Muscará**, 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 **24.10.2005**.

São Paulo, 08 de novembro de 2005.

P/ Prof. Dra. Marília C. Leite Seelaender
Coordenadora da CEEA - ICB/USP

Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira
Secretário da CEEA

AGRADECIMENTO

Aos meus pais, Rosangela de Lucca Camargo e Humberto José Camargo, pela compreensão e apoio incondicionais. Aos meus irmãos e familiares pela confiança e pelo incentivo.

A Profa. Soraia Kátia Pereira Costa pela oportunidade e pela orientação neste trabalho.

Ao Prof. Marcelo Muscará por ceder gentilmente seu laboratório para a realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Farmacorregulação da Inflamação Neurogênica e Dor e do Laboratório de Bioquímica dos Radicais Livres pela ajuda na realização deste trabalho e pelo vínculo de amizade criado ao longo deste período.

A Maria Alice Barreto pela participação indispensável na realização deste trabalho e principalmente por fazer isso com muita dedicação, paciência e carinho. Muito obrigada!!!

Ao amigo-irmão Alexandre Denadai-Souza, pela colaboração intensiva, desde o início, e sem a qual a realização deste trabalho não seria possível. Muito obrigada pelo aprendizado, pela ajuda nos experimentos, pelas fotos maravilhosas deste trabalho, e acima de tudo muito obrigada pela amizade.

A Larissa e ao Prof Cristóforo Scavone pela colaboração na realização das imagens contidas neste trabalho.

Aos amigos Ana Alice dos Santos Dias e Paulo Henrique Braz da Silva pela amizade, compreensão e pelo apoio constante.

Às funcionárias da biblioteca do ICB, Dna. Maria José e Eva e a secretária do departamento de Farmacologia, Selma, pelo atendimento prestativo.

A todos que contribuíram de alguma forma para tornar este trabalho realidade...

Muito Obrigada!!!

“Longe do poder e de seus vícios
Na verdadeira riqueza das almas e dos corações
Não sejas outro
Se podes ser tu mesmo”

Paracelso

Resumo

Camargo LL. Caracterização Farmacológica do Papel da Hemopressina e das Fibras C no modelo de Artrite Induzida por Antígeno em Ratos. [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2006.

A artrite reumatóide (AR) representa uma doença inflamatória crônica de alta prevalência, para a qual ainda não existe cura e nem um tratamento satisfatório. Os objetivos deste estudo foram: 1) investigar o possível efeito antiinflamatório do peptídeo hemopressina e a correlação com neuropeptídeos no modelo de artrite induzida por antígeno (AIA); 2) padronizar este modelo em duas linhagens de ratos: Wistar e Sprague Dawley (SD). À semelhança dos sinais clínicos observados na AR em humanos, esse modelo resultou em potente edema, dor, perda de peso corpóreo, imunorreatividade aumentada à CGRP nas lâminas I e II, maior produção de IL1 β e IL-6 no fluido sinovial e IgG sérica e no fluido, influxo de leucócitos no fluido sinovial bem como alterações morfológicas, caracterizada por dano tecidual na membrana sinovial, denso infiltrado de neutrófilos, invasão do espaço articular por tecido hiperplasiado e desorganização de lâmina íntima. Ambas as linhagens exibiram sinais equipotentes de edema e dor; entretanto, a perda de peso bem como maior infiltrado celular e produção de citocinas foi superior no rato SD, sugerindo uma maior susceptibilidade dessa linhagem à AIA. O tratamento com hemopressina inibiu os sinais inflamatórios; exceto, não preveniu a perda de peso, imunorreatividade à CGRP e produção de citocinas e IgG. A depleção de neuropeptídeos pela capsaicina ou bloqueio pelo antagonista de SP (SR140333) não suprimir os sinais da AIA, excluindo a participação de mecanismos neurovasculares na ação da hemopressina. Em conclusão, o efeito antiinflamatório da hemopressina na AIA não depende de componentes neurogênicos e nem da geração de citocinas ou IgG, revelando aqui, pela primeira vez, o potencial desse peptídeo em tornar-se uma ferramenta farmacológica importante no tratamento de doenças reumáticas, como a AR.

Palavras-chave: Artrite Reumatóide. Inflamação Neurogênica. Artrite induzida por antígeno. Hemopressina.

Abstract

Camargo LL. Pharmacological Characterization of Hemopressin and C Fibrin in Antigen-induced Arthritis in Rats. [Master thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2006.

Arthritis and other rheumatic conditions are among the most prevalent diseases worldwide and the most frequent cause of disability. There are many treatment options, but an effective treatment has not been established. Our aims were: 1) to investigate a possible anti-inflammatory effect of hemopressin and neuropeptide depletion on Met-BSA induced arthritis (AIA); 2) and to establish a suitable rat strain between Wistar and Sprague Dawley (SD) for the study. Similar to rheumatoid arthritis (RA) in human, the AIA model in rat resulted in potent oedema, pain, significant body weight loss, CGRP immunoreactivity in lamina I e II, increased cytokine and IgG production, leukocyte influx in the articular fluid and morphological changes, characterized by tissue degradation, dense neutrophil influx and hyperplasia. The classical signs of AIA such as oedema and pain were similar in both strains. But, the cell influx and cytokines production were higher in SD, thus suggesting a higher susceptibility for SD strain. The treatment of rats with hemopressin greatly reduced the oedema, pain and cell influx, but did not prevent the body weight loss, cytokines and IgG production in the articular fluid. Depletion of neuropeptides failed to reduce the AIA signs, thus excluding a neurogenic component on hemopressin-induced anti-inflammatory effect. In conclusion, neither neuropeptides release nor increased production of cytokines and IgG contributed to the anti-arthritic effect evoked by hemopressin. In conclusion, the present data revealed, for the first time, a potential alternative treatment for arthritis, although the mechanism of action for this peptide is yet to be investigated.

Key-words: Rheumatoid Arthritis. Neurogenic Inflammation. Antigen-induced arthritis. Hemopressin.

Lista de Abreviaturas, Siglas e Fórmulas

AA - ácido araquidônico

AIA – artrite induzida por antígeno

AIES - antiinflamatórios esteróides

AINES - antiinflamatórios não esteróides

AR – Artrite Reumatóide

AUC – área sob a curva

BK – Bradicinina

BSA – Albumina bovina

$C_6H_{12}O_6$ - Glicose

$C_6H_{12}O_6$ – Glucose

$C_6H_8O_7$ - Ácido cítrico

CFA – “Complete Freund’s Adjuvant” (Adjuvante Completo de Freund)

CGRP – “Calcitonin-gene related peptide” (Peptídeo vasodilatador relacionado ao gene da calcitonina)

CGRP-ir - Imunorreatividade ao CGRP

CH_3CH_2OH - Etanol

CH_3CH_2OH – Etanol

CH_3COOH - Ácido acético

CONTRA - contralateral

COX - ciclooxigenase

DMARDs - drogas anti-reumáticas modificadoras de doença

DO – Densidade óptica

EPM – Erro padrão da média

H&E - Hematoxilina e eosina

H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio

HTAB – Hexadeciltrimetilamônia

i.art. – Intra-articular

i.p. – Intraperitoneal

IFN- γ Interferon gama

IHC - Imunohistoquímica

IL Interleucina

IL-1Ra - antagonista do receptor para IL-1

IPSI - ipsilateral
KCl – Cloreto de potássio
 KH_2PO_4 - Fosfato de potássio monobásico
Met-BSA - albumina bovina metilada
MMP Metaloproteinase de matriz
MPO – Mieloperoxidase
 Na_2CO_3 - Carbonato de sódio
NaCl - Cloreto de sódio
NaCl – Cloreto de sódio
 NaH_2PO_4 – Fosfato monobásico
 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ - Fosfato de sódio monobásico
 NaHCO_3 - Bicarbonato de sódio
 NaHO_3 – Bicarbonato de sódio
NASC - neurônios aferentes sensíveis à capsaicina (
NKA – Neurocinina A
NKB – Neurocinina B
NO Óxido nítrico
OPD - ortofenildiaminobenzidina
PAF – Fator de agregação plaquetária
PBS - tampão fosfato salina,
PBST - PBS 0.05% Tween 20
PG – Prostaglandina
 PLA_2 - fosfolipase A_2
PMN – polimorfonucleares
s.c. – Subcutâneo
SD - Sprague Dawley
SP – Substância P
SP-ir - Imunoreatividade à SP
TMB - 3.3' 5.5' tetrametilbenzidina
 $\text{TNF-}\alpha$ Fator de necrose tumoral
TRPV1 – “Transient Receptor Potential Vanilloid 1”

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Artrite reumatóide (AR)	16
1.2 Tratamentos farmacológicos na AR	19
1.3 Modelos Experimentais de AR	20
1.4 Envolvimento de componentes neurogênicos na AR	22
1.5 Papel da hemopressina na inflamação	24
2 OBJETIVOS	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Animais e anestesia	27
3.2 Artrite Induzida por Antígeno (AIA)	27
3.3 Avaliação do peso corporal e edema articular	28
3.4 Avaliação de Dor	28
3.4.1 Análise de locomoção (Escore)	29
3.4.2 Análise de Registro das pegadas das patas ("footprint")	29
3.5 Lavagem da articulação e coleta do fluido sinovial	30
3.6 Análise do número de células (leucócitos)	30
3.7 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)	31
3.8 Avaliação dos níveis de citocinas no fluido sinovial	31
3.9 Determinação dos níveis de IgG no plasma e no fluido sinovial	32
3.10 Imunohistoquímica	33
3.11 Análise histopatológica	34
3.12 Tratamentos Farmacológicos	35
3.12.1 Hemopressina	35
3.12.2 Degeneração das fibras sensoriais	35
3.12.3 Bloqueio farmacológico do receptor NK ₁	36
3.12.4 Inibição farmacológica da enzima ciclooxigenase (COX)	36
3.13 Análise estatística	36
3.14 Procedência das drogas e reagentes utilizados	37
4 RESULTADOS	38
4.1 Estudo comparativo do edema articular no modelo de AIA entre as linhagens Wistar e SD	38
4.2 Análise comparativa da dor em ratos Wistar e SD com AIA	40
4.2.1 Avaliação do escore	40
4.2.2 Avaliação das pegadas das patas traseiras (footprint)	42
4.3 Avaliação da perda de peso corpóreo durante a AIA em ratos Wistar e SD	46
4.4 Análise do influxo de células na cavidade articular de ratos com da AIA	48
4.5 Análise da presença de citocinas no fluido sinovial após indução da AIA	51
4.6 Concentração de IgG no plasma e no fluido sinovial após indução da AIA	53
4.6 Concentração de IgG no plasma e no fluido sinovial após indução da AIA	53
4.7 Efeito da hemopressina sobre a AIA	56

4.7.1 Efeitos dos tratamentos oral e local da hemopressina sobre o edema articular de joelho em ratos SD	56
4.7.2 Avaliação do efeito do tratamentos oral e local da hemopressina sobre a resposta dolorosa em ratos SD com AIA	58
4.7.4 Avaliação do efeito do tratamentos oral e local da hemopressina sobre a perda de peso corpóreo em ratos SD com AIA	61
4.7.5 Efeito da hemopressina sobre o aumento do número de leucócitos totais e da atividade da MPO no fluido sinovial de ratos SD com AIA.	63
4.7.6 Efeito da Hemopressina sobre os níveis de citocinas no fluido sinovial	64
4.7.8 Efeito da hemopressina sobre a produção de IgG anti-Met-BSA no plasma e no fluido sinovial de ratos com AIA	65
4.7.9 Análise do efeito da hemopressina sobre as alterações morfológicas da AIA	67
4.7.9 Avaliação imunohistoquímica do papel da SP e CGRP na AIA em ratos SD submetidos ao tratamento com hemopressina	70
4.8 Investigação do papel das fibras C sobre o modelo de AIA	72
4.8.1 Efeito da depleção de neuropeptídeos no modelo de AIA	72
4.8.2 Efeito do bloqueio farmacológico do receptor NK ₁ sobre os parâmetros inflamatórios na AIA	77
4.9 Efeito da inibição da enzima COX sobre a AIA em ratos SD	79
4.9.1 Efeito da indometacina sobre o edema e a dor durante a AIA	79
4.9.2 Efeito da Indometacina sobre a perda de peso corpóreo de ratos SD com AIA	83
4.9.3 Efeito da Indometacina sobre o influxo de células	84
4.9.4 Efeito da Indometacina sobre o aumento da concentração de citocinas no fluido sinovial de ratos SD com AIA	85
4.9.5 Efeito do tratamento com indometacina sobre os níveis de IgG no plasma e no fluido sinovial de ratos com AIA	86
5 DISCUSSÃO	88
6 CONCLUSÕES	102
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

1 INTRODUÇÃO

1.1 Artrite reumatóide (AR)

A artrite reumatóide (AR) é uma doença sistêmica crônica de origem imunológica, e para qual ainda não existe cura. É considerada uma das doenças autoimune mais comuns, que afeta uma grande parcela da população mundial (Kvien, *et al.*, 2006). A incidência da artrite reumatóide é de, aproximadamente, 1% da população mundial (Wiles, *et al.*, 1999; Kvien, *et al.*, 2006). No Brasil, dados epidemiológicos semelhantes foram encontrados (Senna, *et al.*, 2004).

Nessa condição inflamatória, os indivíduos entre 30 e 60 anos são os mais afetados (Sweeney, *et al.*, 2004). Dentre esses indivíduos, postula-se que as mulheres possuem susceptibilidade até três vezes maior do que os homens em desenvolver essa doença (Buckwalter, *et al.*, 2000; Alamanos, *et al.*, 2006). Por outro lado, em recente estudo, Ito e Sato (2006) observaram que fêmeas de camundongos exibiram menor susceptibilidade em desenvolver artrite experimental induzida por colágeno do que os camundongos machos. Porém, esses mesmos autores demonstraram que uma vez instalada a AR, não existe diferença na gravidade da doença entre machos e fêmeas.

Em geral, a AR apresenta-se clinicamente de uma forma simétrica, tendo como alvo as articulações, tipicamente das mãos e pés, bem como punhos, ombros, cotovelos e tornozelos (Walsh, *et al.*, 2005). Embora as articulações constituam o alvo principal dessa doença, outras estruturas extra-articulares são também afetadas. Manifestações sistêmicas da AR incluem, por exemplo, o aparecimento de nódulos subcutâneos, pleurite e vasculite que, a longo prazo, contribuem para a morbidade e mortalidade dessa doença (Sweeney, *et al.*, 2004).

A gravidade da artrite varia desde quadros limitados até quadros crônicos progressivos e irreversíveis, principalmente para os pacientes não tratados (Zeidler *et al.*, 1998). Os índices de morbidade e mortalidade desses pacientes se assemelham aos de pacientes portadores de doenças coronarianas ou com diabetes (Vandenbroucke, *et al.*, 1984; Seymour, *et al.*, 2001). Além de causar desconforto e prejuízos para o indivíduo, em termos econômicos a artrite reumatóide prejudica o sistema de saúde, pois esses indivíduos, no decorrer de dez anos da doença, tornam-se inaptos para o trabalho (Felts e Yelin, 1989).

Em 90% dos pacientes que apresentam AR crônica, a articulação do joelho desses indivíduos encontra-se comprometida. A doença tende a envolver ambos os joelhos simetricamente e, em sua forma progressiva, pode produzir dor intensa, capaz de causar deficiência na capacidade de deambulação como consequência da rigidez articular e deformidades. Nos casos mais avançados, pode ocorrer não apenas destruição da cartilagem, mas também destruição dos tecidos moles (Sculco, 1998; Khurana e Berney, 2005).

Dentre as alterações e sinais clínicos dessa patologia (Doan e Massarotti, 2005), observam-se: *i)* sinovite ou inflamação do tecido sinovial, *ii)* edema da articulação (resultante do extravasamento plasmático e influxo de leucócitos) e aumento da membrana sinovial, *iii)* dificuldade de locomoção decorrente da dor e enrijecimento da articulação (perda da função) decorrente da destruição progressiva das matrizes extracelulares dos tecidos ósseo e cartilaginoso e, por fim, *iv)* alterações e deformação das articulações (Figura 1).

Figura 1. Ilustração e radiografia da articulação do joelho humano normal e com artrite. A) Ilustração da anatomia (vista lateral) do joelho normal com suas principais divisões. A radiografia mostra o joelho em vista frontal. B) Ilustração e radiografia da articulação do joelho humano com artrite. Note a destruição da membrana sinovial na ilustração e a redução do espaço articular na radiografia do joelho doente. Adaptado: “Arthritis of the Knee Joint”. The Hip and Knee Institute, 2005. Herbert D. Huddleston.

A membrana sinovial, que normalmente secreta o fluido articular para lubrificação e nutrição da cartilagem, consiste em uma ou duas camadas de células formadas pelos sinoviócitos tipo A (semelhante ao macrófago) e tipo B (semelhante

ao fibroblasto) e tecido conjuntivo frouxo adjacente. Os sinoviócitos do tipo A normalmente fagocitam os restos celulares e outros materiais (*debris*) presentes no fluido sinovial. Algumas citocinas pró-inflamatórias, tais como as interleucinas 1 (IL-1) e 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF- α) são também liberadas por essas células. Já os sinoviócitos tipo B, mediante um processo inflamatório articular, são capazes de produzir prostaglandinas (PGs) e enzimas proteolíticas como as metaloproteinases de matriz (MMP) na articulação (Sakaguchi e Sakaguchi, 2005).

Até o presente momento, acredita-se que a fisiopatologia da artrite tem início na exposição do indivíduo ao antígeno e que inicialmente não promove sinais ou sintomas. Contudo, uma vez instalada a resposta imune inata local, as células da membrana sinovial preparam-se para promover a resposta imune adaptativa em indivíduos mais susceptíveis (Firestein e Zvaifler, 1990). O desencadeamento da AR está associada ao reconhecimento de antígenos por linfócitos T CD4+ no tecido sinovial ou contato com agentes infecciosos, bem como exposição a outros agentes externos (Doan e Massarotti, 2005).

Deflagrado o processo inflamatório, inicia-se a resposta nociceptiva (dor) e edematogênica na articulação. A ativação das células T e B levam à estimulação de monócitos, macrófagos e fibroblastos sinoviais. Conseqüentemente, observa-se o aumento na produção de moléculas pró-inflamatórias como as citocinas e quimiocinas (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-2, INF- γ , IL-10 e IL-12), auto-anticorpos, imunocomplexos e mediadores endógenos. Estes, por sua vez, são capazes de estimular a produção de MMPs pelos fibroblastos, osteoclastos e condrócitos. Além disso, os auto-anticorpos reconhecem moléculas articulares como o colágeno tipo II e os proteoglicanos, bem como se ligam ao fator reumatóide (Sweeney, *et al.*, 2004). No conjunto, esses eventos promovem a inflamação sinovial (Choy e Panayi, 2001; Müller-Ladner, *et al.*, 2004; Doan e Massarotti, 2005).

A progressão do quadro patológico leva à proliferação das células sinoviais, causa o edema e osteopenia periarticular e favorece o influxo de leucócitos polimorfonucleares (PMN) para o fluido sinovial. Uma característica marcante dessa etapa é a formação do *pannus* invasivo (tecido de granulação constituído principalmente de macrófagos e fibroblastos) associado ao quadro de erosão do tecido ósseo, degradação da cartilagem e neovascularização da cavidade sinovial (Szekanecz e Koch, 2001). Durante esse estágio, é comum o infiltrado de células T,

B, *natural killer*, plasmócitos, células dendríticas e mastócitos na membrana sinovial (Müller-Ladner, *et al.*, 2004).

Histologicamente, é possível observar hiperplasia da camada íntima da membrana sinovial e presença de infiltrado inflamatório na camada subíntima, resultando em expansão de vilosidades sinoviais, as quais se projetam para dentro do espaço articular. Os mediadores inflamatórios liberados pelas células dos tecidos sinoviais contribuem para a destruição do tecido ósseo e cartilaginoso (Walsh, *et al.*, 2005).

Finalmente, a AR pode evoluir com progressão da erosão do tecido ósseo, invasão da cartilagem pelo *pannus* e preenchimento do espaço articular. A dor e o edema tornam-se mais intensos e a perda da função e deformidade das articulações são visíveis, o que é revelado pelo exame radiográfico como diminuição do espaço articular e erosões em vários locais dos ossos (Harris, *et al.*, 1990).

1.2 Tratamentos farmacológicos na AR

Embora ainda não se tenha estabelecido uma terapia efetiva para a cura da AR, o tratamento farmacológico consiste, principalmente, em aliviar a dor, controlar a inflamação, preservar a função e prevenir as deformidades com o uso de agentes disponíveis na clínica, incluindo os agentes antiinflamatórios esteróides (AIES) e não esteróides (AINES), drogas anti-reumáticas modificadoras de doença (metotrexato, sulfasalazina e cloroquinas; Doan e Massarotti, 2005) e, mais recentemente, a terapia biológica com os agentes anti-TNF e fatores recombinantes da IL-1, por exemplo (Gaffo, *et al.*, 2006; Fan e Leong, 2007).

Os AINES (ex. aspirina, indometacina, diclofenaco, ibuprofeno e piroxicam), cujos mecanismos consistem na inibição da enzima ciclooxygenase (COX), e os AIES (glicocorticóides), que estimulam a produção de lipocortinas (anexinas) que suprimem a fosfolipase A₂ (PLA₂; Morand, 2007), estão entre os fármacos mais utilizados para o alívio da dor e inflamação e da rigidez das articulações na AR (Scott, *et al.*, 1998; Gaffo, *et al.*, 2006). Devido aos efeitos adversos associados aos AINES e AIES, o uso desses fármacos é restrito a períodos curtos, em associação com drogas anti-reumáticas modificadoras da doença (Bensen, *et al.*, 1999).

As drogas anti-reumáticas modificadoras de doença (DMARDs) são comumente empregadas como terapia de primeira linha na AR e em casos de pacientes refratários a outros tipos de tratamento. Apesar dos benefícios com essa

classe terapêutica, ainda existem vários casos onde a terapia não funciona ou os sinais da artrite são exacerbados durante o tratamento (O'Dell, 1997; Kremer, 1998; Swierkot e Szechinsk, 2006).

Recentemente, o emprego da terapia com os compostos biológicos ou modificadores de respostas biológicas tem como alvo os pacientes que não respondem ao tratamento convencional (Gaffo, *et al.*, 2006). Dentre esses compostos que inibem seletivamente moléculas do sistema imune destacam-se os inibidores de TNF- α (ex.: etanercepte, infliximabe, adalimumabe) e IL-1 (ex.: anakinra) no tratamento da AR. Entretanto, efeitos colaterais sérios na terapia com estes fármacos, incluindo o aumento do risco de infecções oportunistas, constituem uma das limitações dessa classe de fármacos já reportada em pacientes que receberam tais tratamentos (Kroesen, *et al.*, 2003; Keane, *et al.*, 2001; Fleischmann, *et al.*, 2003).

1.3 Modelos Experimentais de AR

O tratamento adequado para a AR depende da compreensão desta doença multifatorial. De fato, grande parte do conhecimento sobre a fisiopatologia da AR provém de estudos em modelos experimentais, os quais permitem investigar, *in vivo*, possíveis mecanismos e novas terapias.

Visando um melhor entendimento da imunologia em geral e, em particular, da AR, sabe-se que diversos modelos experimentais, principalmente em roedores, vêm sendo empregados nas últimas décadas. Assim, o estudo da AR tem sido facilitado, pois alguns modelos animais se assemelham, em vários parâmetros, à doença em humanos (Buchner, *et al.*, 1995; Radhakrishnan, *et al.*, 2003). Dentre os modelos, o de artrite induzida por antígeno (AIA) compartilha características importantes da AR em humanos, tais como hiperplasia da membrana sinovial, infiltrado inflamatório na articulação e destruição da cartilagem articular (Bräuer, *et al.*, 1994).

Originalmente desenvolvido em coelhos por Dumonde e Glynn, em 1962, o modelo de AIA foi subsequenteiramente extrapolado, com o auxílio de uma variedade de antígenos como a fibrina (Dumond e Glynn, 1962), ovalbumina (Bräuer, *et al.*, 1988) e Met-BSA (Brackertz, *et al.*, 1972) para outras espécies, incluindo o rato e camundongo.

A AIA constitui um modelo de artrite monoarticular severa induzida pela injeção intra-articular do antígeno após imunização sistêmica. O curso clínico da AIA pode ser dividido em duas fases: aguda e crônica. A fase aguda é caracterizada por edema e rubor no joelho injetado, bem como infiltrado predominante de células PMN na sinóvia. Postula-se que tal reação é consequência da produção *in situ* de imunocomplexos e ativação do complemento na superfície articular (Bräuer, *et al.*, 1988; Inata, *et al.*, 1997), conforme observada na reação de *Arthus* (reação de hipersensibilidade tipo III). Após uma semana, a fase aguda progride para a fase crônica, a qual é mediada por células T e possui as seguintes características: hiperplasia da camada íntima sinovial, formação do *pannus* e destruição da cartilagem e tecido ósseo (Griffiths, 1992; Banchet, *et al.*, 2000).

Outro aspecto importante no qual o modelo experimental de AIA se assemelha à doença AR em humanos, inclui a sintomatologia dolorosa persistente e durante a locomoção (Schaible, *et al.*, 2002). Em ratos submetidos ao modelo de AIA, a resposta nociceptiva ocorre de forma mais acentuada durante a fase aguda da doença, quando os animais apresentam alterações de comportamento na deambulação como, por exemplo, guarda da perna inflamada e hiperalgesia frente ao estímulo mecânico (von Banchet, *et al.*, 2000).

Paralelamente, evidências mostram que além da diversidade de modelos experimentais para artrite, a espécie animal bem como as diferentes linhagens podem resultar em sinais e sintomas clínicos distintos ou menos severos. Segundo Rosenthale e colaboradores (1970), a artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund (complete Freund's adjuvant, CFA) é mais severa e menos variável na linhagem de rato Lewis em relação ao rato da linhagem Sprague Dawley (SD).

Corroborando esse achado, mais recentemente, Banik e colaboradores (2002) demonstraram que a linhagem de rato Wistar exibe maior resistência ao desenvolvimento da artrite induzida por CFA do que a linhagem Lewis. É possível que a resistência relativa ao desenvolvimento da artrite ou inflamação, em geral, esteja relacionada à diferença na síntese e distribuição de mediadores inflamatórios (Rosenthale, *et al.*, 1970; Zhu, *et al.*, 1998; Banik, *et al.*, 2002).

Curiosamente, recente estudo revelou que embora a linhagem de ratos Lewis exibiu mais precocemente os sinais clínicos da artrite induzida por CFA, quando comparado à linhagem SD, verificou-se que, ao final do estudo, a resposta característica da artrite foi idêntica em ambas as linhagens (Cai, *et al.*, 2006).

Entretanto, não foram encontradas evidências comparativas com relação à susceptibilidade de diferentes linhagens no modelo de AIA em ratos, muito embora o emprego de várias linhagens de ratos e camundongos sejam comumente observadas em vários estudos.

1.4 Envolvimento de componentes neurogênicos na AR

A Inflamação articular pode causar sensibilização periférica (aumento da sensibilidade de neurônios aferentes primários nociceptores) e sensibilização central (aumento da excitabilidade de neurônios nociceptores no sistema nervoso central), que contribuem para a sintomatologia dolorosa na artrite. Esta pode aparecer como dor espontânea (dor em repouso) ou hiperalgésica, avaliada pelo aumento da resposta dolorosa à estímulos normalmente não dolorosos (Schaible, *et al.*, 2002). Ainda, essa sensibilização facilita alguns processos eferentes, influenciando assim o processo inflamatório (Tracy, 2002).

De fato, substâncias inflamatórias endógenas como as citocinas e PGs, liberadas na lesão tecidual ou inflamação, mostraram-se capazes de estimular e/ou sensibilizar fibras aferentes sensitivas, levando à liberação de neuropeptídeos como a substância P (SP; Niisalo *et al.*, 2002; Sawynok, 2003; Costa, *et al.*, 2006). Tal liberação representa o fenômeno conhecido como inflamação neurogênica, caracterizada por sinais clássicos da inflamação, incluindo o edema (extravasamento de proteínas plasmáticas), vasodilatação (aumento do fluxo sanguíneo) e recrutamento de células inflamatórias (Levine, *et al.*, 2006). Mais recentemente, alguns estudos sugerem que as fibras sensoriais (e seus neuropeptídeos) podem modificar a atividade do sistema imunológico, além de exercerem efeitos tróficos, incluindo a proliferação de células vasculares, fibroblastos e linfócitos (Schaible, *et al.*, 2005).

As fibras sensoriais que contém e liberam neuropeptídeos são principalmente as do tipo C, não mielinizadas, e as fibras A δ , mielinizadas. Essas fibras inervam densamente vários órgãos, articulações e tecidos e, em particular, vasos sanguíneos, onde as terminações dos nervos perivasculares estão intimamente relacionadas com as células endoteliais (Brain e Cox, 2006; Kontinen, *et al.*, 2006).

A SP constitui um dos principais ou mais estudado neuropeptídeo pró-inflamatório liberado durante a inflamação neurogênica. Pertence à família das taquicininas, e sua síntese se dá, principalmente, no corpo de neurônios aferentes

no gânglio da raiz dorsal, muito embora evidências atuais mostram a presença da SP em células não-neuronais, como os neutrófilos, macrófagos, eosinófilos e células dendríticas (Schratzberger, *et al.*, 1997; Cão, *et al.*, 2000; Azzolina, *et al.*, 2003, Grahan, *et al.*, 2004).

Os efeitos da SP são mediados via estimulação de receptores de taquicinina do tipo NK₁, NK₂ e NK₃ (O'Connor, *et al.*, 2004). O aumento da permeabilidade microvascular evocado pela SP é regulado via receptores NK₁, presente em células endoteliais de vênulas pós-capilares (Maggi, *et al.*, 1994). Contudo, a SP, pela ação em seu receptor NK₁ possui efeito modulador sobre as células inflamatórias, levando ao acúmulo de neutrófilos, ativação de macrófagos, monócitos, mastócitos, linfócitos e plaquetas (Schratzberger, *et al.*, 1997; Azzolina, *et al.*, 2003, Grahan, *et al.*, 2004; Costa, *et al.*, 2006).

Adicionalmente, evidências mostram que a SP induz aumento na expressão de moléculas de adesão leucocitária em células endoteliais da microvasculatura (Matis, *et al.*, 1990). Desta forma, acredita-se que a SP exerça ações importantes em condições inflamatórias, visto que concentrações elevadas desse neuropeptídeo foram encontradas em tecidos com inflamação crônica (Todorovic, *et al.*, 1996; Watanabe, *et al.*, 1997 O'Connor, *et al.*, 2004).

A estimulação de fibras nervosas sensoriais ocorre frente aos diversos estímulos, sejam eles químico, mecânico ou físico (Watanabe, 2006). A ativação mediada por substâncias químicas, ocorre via estimulação de receptores ou canais iônicos presentes no corpo e axônio dessas fibras. Além dos receptores para alguns mediadores inflamatórios conhecidos como a bradicinina, PGs e outros, os receptores vanilóides (também conhecidos como receptor de potencial transitório - TRPV1; Caterina, *et al.*, 1997; Caterina, *et al.*, 2000) vem sendo bastante investigados, pois sua ativação por substâncias químicas com estrutura vanilóide (ex.: capsaicina), toxinas ou estímulos térmicos está relacionada à inúmeros processos inflamatórios e nociceptivos (Tominaga, *et al.*, 1998; Costa, *et al.*, 2000; Davis, *et al.*, 2000; McVey e Vigna, 2002; Watanabe, 2006; Nakagawa e Hiura, 2006).

Há mais de 20 anos, Levine e colaboradores (1986) mostraram que a transecção de fibras nervosas sensoriais em modelo experimental de artrite, reduziu a hiperalgesia, o edema e a destruição da articulação. Desde então, é possível inferir que durante a artrite, os mecanismos neurogênicos constituem ferramentas

importantes. De fato, sinais da resposta inflamatória induzida por carragenina na articulação de camundongos nocautes de receptores TRPV1 foi menor do que aqueles observados em camundongos selvagens (Keeble, *et al.*, 2005).

Evidências clínicas também revelam que a inflamação simétrica das articulações em pacientes com AR é influenciada, em grande parte, por componentes neurais durante a evolução da doença (Cruwys, *et al.*, 1995; Geenen, *et al.*, 1996; Decarris, *et al.*, 1999; Hood, *et al.*, 2001; Nissalo, *et al.*, 2002). O fato de que o desenvolvimento da AR ocorre predominantemente nas articulações mais inervadas, como nas das mãos e dos pés, vem ao encontro dos achados clínicos e experimentais (Nissalo, *et al.*, 2002). Neste sentido, concentrações aumentadas de SP foram detectadas no fluido sinovial e soro de pacientes com AR (O'Connor, *et al.*, 2004). Ainda, segundo Sakai e colaboradores (1998), a gravidade da inflamação articular está relacionada ao aumento na população (RNAm) do receptor NK₁ na membrana sinovial de humanos.

1.5 Papel da hemopressina na inflamação

Apesar dos grandes avanços na compreensão da patogênese e terapia da AR, muitos dos mecanismos precisam ser esclarecidos e ainda não foi estabelecido um tratamento satisfatório. Desta forma, esforços para a elucidação de prováveis mecanismos e a busca por terapias alternativas continuam ainda objetos de pesquisa de inúmeros pesquisadores. Sabe-se que as substâncias peptídicas (endógenas ou extraídas de peçonhas) apresentam uma variedade de funções fisiológicas e, dependendo da situação, podem desempenhar ações terapêuticas.

A análise de componentes, de baixo peso molecular, obtidas de diferentes extratos teciduais revelou inúmeros peptídeos derivados de proteínas funcionais (Slemmon, *et al.*, 1997; Karenin, *et al.*, 1998). A maioria destes peptídeos é originada de fragmentos da hemoglobina (Ivanov, *et al.*, 1997; Karenin, *et al.*, 1999).

O fragmento α da hemoglobina serve como precursor endógeno para uma série de peptídeos com atividade opióide, conhecidos como hemorfinas (Ivanov, *et al.*, 1997; Lantz, *et al.*, 1999). A atividade opióide das hemorfinas foi demonstrada pela capacidade de inibir a contração induzida por estimulação elétrica em íleo de cobaias (Brantl, *et al.*, 1986; Moisan, *et al.*, 1998). Além da ação opióide, as hemorfinas foram capazes de inibir a atividade da enzima conversora de

angiotensina (ECA), sugerindo um possível papel destes peptídeos na regulação da pressão sanguínea (Lantz, *et al.*, 1991; Zhao, *et al.*, 1994).

Em 2003, Rioli e colaboradores demonstraram a presença um novo peptídeo derivado da cadeia α da hemoglobina em homogenatos de cérebro de ratos, denominado hemopressina. Assim como as hemorfinas, esse peptídeo apresentou efeito hipotensor na pressão arterial de ratos (Rioli, *et al.*, 2003), coelhos e camundongos (Blais, *et al.*, 2005). Posteriormente, Lipton e colaboradores (2006) observaram que a ação hipotensora da hemopressina é dependente da biossíntese do óxido nítrico (NO), visto que o inibidor da síntese de NO (L-Name) reverteu esse efeito.

Além da ação vasodilatadora, Dale e colaboradores (2005) revelaram que a hemopressina possui ação analgésica, pois foi capaz de inibir a hiperalgesia induzida por carragenina ou bradicinina em ratos. Segundo esses autores, o mecanismo de ação analgésica da hemopressina difere das hemorfinas, visto que o antagonista de receptores opióides naxolone foi capaz de reverter a ação das hemorfinas (Yukhananov, *et al.*, 1994), mas não interferiu com a resposta analgésica da hemopressina (Dale, *et al.*, 2005). Portanto, apesar do precursor comum, hemopressina e hemorfinas aparentemente agem via mecanismos distintos. Por outro lado, a hemopressina não exerceu nenhum efeito antiinflamatório no edema de pata induzido por carragenina (Dale, *et al.*, 2005).

2 OBJETIVOS

Apesar dos grandes avanços alcançados na terapia da AR, ainda não foi possível estabelecer um tratamento satisfatório para todos os pacientes ou que promovesse a cura. Sendo esta uma doença grave, de alta prevalência e morbidade, os esforços para esclarecer sua patogênese, tentando assim melhorar o tratamento constituem fatores importantes na pesquisa experimental básica e clínica. Para isso são utilizados modelos experimentais, mas apesar de estabelecido o modelo de AIA em diferentes espécies, não está claro na literatura a susceptibilidade das diferentes linhagens de ratos ao modelo de AIA. Diante disto, os objetivos deste estudo foram:

- 1) Padronizar e avaliar comparativamente os sinais/sintomas clínicos do modelo experimental de AIA nas linhagens de ratos Wistar e SD;
- 2) Avaliar o efeito terapêutico do peptídeo hemopressina e da depleção das fibras C pela capsaicina (ou bloqueio do receptor NK₁) sobre os sinais e sintomas inflamatórios do modelo experimental de AIA.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e anestesia

Os experimentos foram realizados sob aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEEA-ICB/USP; protocolo número 127, folha 21 do livro 2), cujas normas estão de acordo com o Código de Experimentação Animal Canadense (“Canadian Council on Animal Care”).

Os experimentos foram realizados em ratos machos, das linhagens Wistar e Sprague Dawley (SD), entre 5 e 8 semanas (160 a 300 g), obtidos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) e do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade de Campinas (CEMIB – Unicamp), respectivamente. Estes foram mantidos em grupos de, no máximo, cinco animais por caixa no Biotério do Departamento de Farmacologia, com temperatura e ciclo de iluminação controlada (22 °C; claro/escuro, 12/12h). Os ratos tiveram acesso à água e ração *ad libitum*.

Para a indução da artrite, os animais foram submetidos à anestesia transitória pela via inalatória, com a mistura de halotano e O₂ (1:3). Ao término dos experimentos, os animais foram anestesiados, pela via intraperitoneal (i.p.), com a mistura de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg) e mortos por deslocamento cervical.

3.2 Artrite Induzida por Antígeno (AIA)

Os animais, sob anestesia com halotano, foram imunizados pela injeção subcutânea (s.c.) na base da calda com o volume de 50µl de albumina bovina metilada (Met-BSA, 40 mg/ml) diluída em 1ml de glicose (5%) emulsificada com 1m de CFA . Após 7 dias, o mesmo procedimento foi repetido (Bär, *et al*, 2004). No 14º dia, a indução da artrite foi realizada pela injeção intra-articular (i.art.) da solução de Met-BSA (25 µl; 40 mg/ml em tampão fosfato salina, PBS) no joelho esquerdo (ipsilateral, IPSI). Um grupo correspondente de animais imunizados, denominado

sham, recebeu a injeção i.art. de 25 µl do veículo (PBS) no joelho esquerdo. O joelho direito (contralateral, CONTRA) dos animais serviu como controle.

Os parâmetros funcionais tais como edema do joelho e resposta dolorosa (avaliada por testes comportamentais) foram analisados diariamente, durante quatro dias. As alterações histopatológicas e as análises do influxo de células, dosagem de citocinas e outros marcadores inflamatórios no fluido sinovial dos animais foram realizadas sempre no último dia (quarto dia), após a morte dos animais.

3.3 Avaliação do peso corporal e edema articular

O peso corporal dos ratos foi avaliado antes da indução (no dia 0) e em intervalos regulares (24h) nos dias subsequentes da indução da artrite.

Os diâmetros (em mm) dos joelhos IPSI e CONTRA dos animais foram medidos antes da indução da artrite e, diariamente no mesmo horário, após a injeção i.art., de Met-BSA ou PBS. Para essa medida, o animal foi cuidadosamente imobilizado por um investigador, e a medida do diâmetro lateral dos joelhos foi realizada por outro investigador com o auxílio de um paquímetro digital (Série 727, Starrett, Brasil).

As medidas foram realizadas sempre em triplicata e a média das três anotações foi utilizada como medida final do diâmetro do joelho (edema).

3.4 Avaliação de Dor

Por tratar-se de medidas subjetivas, a avaliação da dor nos diferentes grupos experimentais foi realizada baseando-se no padrão de mudança no comportamento de locomoção dos animais, antes e no decorrer da artrite, via dois testes: escores de locomoção (Kisin, *et al.*, 2005) e registro das pegadas (*footprint*; De Medinacelli, *et al.*, 1982). As medidas foram sempre realizadas por investigadores alheios à natureza do tratamento em um ambiente reservado e isento de ruídos.

3.4.1 Análise de locomoção (Escore)

Subsequentemente à indução da artrite, o animal foi deixado livremente, durante 5 minutos, sob uma superfície lisa (120 x 60 cm), nas condições descritas no item 3.4.

Durante esse período, os observadores atribuíram os escores de 0 a 3 que corresponderam às alterações no comportamento de deambulação/locomoção de cada animal (ver abaixo Tabela 1; Kisin, *et al.*, 2005). Ao final das observações, os resultados de escores foram expressos, por dia, como média e EPM para cada grupo experimental.

Escore	Comportamento de Locomoção
Escore 0	Locomoção normal
Escore 1	Distúrbio leve na locomoção (andar mais lento, manco)
Escore 2	Recolhe intermitentemente a pata injetada
Escore 3	Pata injetada recolhida (andar em três patas)

Tabela 1: Escores de Locomoção (Kisin, *et al.*, 2005)

3.4.2 Análise de Registro das pegadas das patas (“footprint”)

O teste de registro de pegadas das patas (*footprint*), avalia indiretamente o comportamento de locomoção motora do animal (De Medinacelli *et al.*, 1982). Para isto, as patas posteriores (direita e esquerda) de cada animal foram imersas em tinta aquosa (tempera guache, Acrilex, Brasil). Imediatamente a seguir, o animal foi colocado individualmente na entrada de um túnel de plástico (50 cm x 7 cm), disposto sobre folhas de papel sulfite branco em um ambiente tranquilo, nas condições descritas no item 3.4, mediante o olhar de dois observadores.

Ao final do percurso, o registro das pegadas das patas traseiras de cada animal ficou impresso na folha de papel, que foi reservada para análise. Esta foi avaliada de duas maneiras: a média da distância (em cm) entre as pegadas consecutivas da pata (esquerda ou direita) e a média da distância (em cm) entre as pegadas das patas esquerda e direita (Metz, *et al.*, 2000). Em casos onde não foi possível avaliar a distância, pois não havia registro da pata que estava suspensa, atribuiu-se o valor zero.

A fim de proporcionar maior encorajamento e rapidez aos animais no trajeto do túnel, uma caixa escura foi colocada ao final do mesmo e os animais foram submetidos a um período de adaptação ao túnel, de cinco dias antes da indução da AIA. O diâmetro do túnel foi determinado de forma a assegurar que cada animal se movimentasse em linha reta até o final do mesmo.

As medidas foram feitas em duplicatas e, em casos onde o animal não percorreu o trajeto requisitado, o mesmo foi excluído do estudo.

3.5 Lavagem da articulação e coleta do fluido sinovial

Ao final do experimento, os animais foram mortos e ambos os joelhos foram cuidadosamente dissecados. Os espaços i.art. dos joelhos IPSI e CONTRA foram lavados com 0,1ml de PBS. Subseqüentemente, com o auxílio de uma seringa de 0,3 ml (BD Micro-Fine insulin syringe, EUA) e agulha ultrafina (30 G), o volume injetado foi cuidadosamente aspirado juntamente com o fluido sinovial. Amostras desse lavado foram utilizadas para contagem de células ou armazenadas em freezer (-80 °C) para dosagens de alguns parâmetros bioquímicos.

3.6 Análise do número de células (leucócitos)

Amostras de 20 µl do fluido sinovial foram diluídas em solução PBS (280µl) e submetidas à contagem total e diferencial. Para a contagem total, 10 µl de cristal violeta (0,2% em ácido acético 30%) foram adicionados a uma alíquota de 90 µl de lavado e, em seguida, 10µl desta solução foram diluídas em 90 µl de PBS. A seguir, 10µl dessa solução foram dispostos em câmara de Neubauer para a realização da contagem total de células, onde os valores foram expressos como número de células x 10⁵/ml.

A contagem diferencial dos leucócitos no lavado dos joelhos foi feita pela técnica de citocentrífuga (MOD 2400; Fanem, Brasil). As lâminas foram coradas pelo método de May-Grünwald-Giemsa modificado (Rosenfeld, 1947) e o número de células mononucleares e PMN foi quantificado com o auxílio de microscopia óptica. Os resultados obtidos foram expressos como número de células x10⁵/ml.

3.7 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

A avaliação da atividade da MPO, utilizada como medida indireta da infiltração de leucócitos foi realizada no fluido sinovial dos joelhos IPSI e CONTRA dos animais. Para isto, amostras de 20 μ l do fluido dos joelhos foram diluídas em 20 μ l do tampão contendo o detergente brometo de hexadeciltrimetilamônia (HTAB, preparado em tampão fosfato de potássio, 50 mM, pH 6,0) e aquecidas a 60 °C, durante 2h, para inativação da catalase endógena. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (10.000 g; 5 min) e 10 μ l do sobrenadante de cada amostra foram coletados e adicionados, em microplaca, a 200 μ l de tampão fosfato de potássio (50mM; pH 6,0) contendo dihidrocloro de o-dianisidina (0,164 mg/ml) e H₂O₂ (0,0005%), segundo Bradley *et al.* (1982).

A medida de densidade óptica (DO) foi feita no comprimento de onda de 460nm em leitor de ELISA (Espectra Max plus 384, Sunnyvale, CA, EUA), durante 10min, em intervalos de 11s. Considerando-se que o padrão de 1 μ mol de H₂O₂ corresponde a uma variação 0,0113AU (unidades de absorbância), a atividade de MPO foi expressa em unidades de MPO, baseando-se na fórmula: MPO (U/mg) = $V_{max}/s \times 60 / 0,0113$, onde uma unidade de atividade da MPO é definida como aquela capaz de degradar um micromol de H₂O₂ por minuto (Bradley, *et.al.*,1982). Os resultados foram expressos como unidade de MPO/cavidade.

3.8 Avaliação dos níveis de citocinas no fluido sinovial

A dosagem das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 no fluido sinovial foi realizada pelo teste imunoenzimático (ELISA), seguindo instruções do kit comercial (R&D Systems).O fluido sinovial coletado foi centrifugado (1500 rpm; 10min) e o sobrenadante foi submetido ao teste conforme instruções do fornecedor.

Para dosagem de citocinas, placas de 96 poços (Costar) foram sensibilizadas com 100 μ L de anticorpos monoclonais específicos para cada citocina de acordo com Junqueira *et al.*, (2007): anti-IL-1 β , anti-IL-6 diluídos em tampão carbonato (0.1 M, pH 9.6) e anti-TNF- α diluído em tampão fosfato de sódio (0.2 M, pH 6.5). As placas foram incubadas por 18h a 4 °C. Após lavagem com PBS 0.05% Tween 20 (PBST) as placas foram bloqueadas com 200 μ l/poço de PBST 3% gelatina à 37 °C por 3h. Após novo ciclo de lavagens, 100 μ l das amostras ou dos padrões das citocinas

recombinantes foram adicionados e então as placas foram incubadas por mais 18h a 4 °C. Após lavagem, 100 µl dos respectivos anticorpos biotinilados específicos de detecção para cada citocina e quimiocina (IL-1 β , IL-6, TNF- α) foram acrescentados por mais uma hora à temperatura ambiente. Após lavagem das placas, 100 µl de estreptoatvidina-peroxidase foram adicionados por mais uma hora à temperatura ambiente. As reações foram reveladas pela adição de 100 µl de soluções 3.3' 5.5' tetrametilbenzidina (TMB) e H₂O₂ (1:2) e interrompidas pela adição de 50µl de ácido cítrico (0.2 M) por poço. A leitura da reação foi realizada a 450nm em espectrofotômetro Espectra Max plus 384 (Sunnyvale, CA, EUA). As concentrações das amostras foram calculadas a partir das curvas-padrão obtidas com as citocinas e quimiocinas recombinantes. O limite de detecção para IL-1 β , IL-6, TNF- α foi de 7.8 pg/ml. Os resultados foram expressos como a média aritmética acrescida do erro padrão.

3.9 Determinação dos níveis de IgG no plasma e no fluido sinovial

No quarto dia após a indução da AIA, os ratos foram anestesiados e amostras de 0,5ml sangue obtido por punção cardíaca e de fluído sinovial foram coletadas. Após centrifugação do sangue (3000 rpm por 5 min) e do fluído sinovial (1500 rpm; 10min), tanto o plasma quanto o sobrenadante do fluído sinovial foi reservado em freezer - 80 °C.

As placas de 96 poços foram sensibilizadas com Met-BSA na concentração de 10µg/ml diluído em tampão carbonato (0,06 M, pH 9.6) e incubadas por 18h a 4°C em câmara úmida. Após ciclo de lavagens com PBST foram adicionados 200 µl/poço de solução bloqueadora (PBST 3% gelatina) e as placas foram incubadas por 3h a 37 °C. Após novo ciclo de lavagens, 100 µl das amostras a serem testadas em diluições seriadas no tampão de incubação (PBST 0.1% BSA) foram adicionados. Após uma hora de incubação, o segundo anticorpo anti-IgG de rato conjugado com peroxidase (1:4000; Abcam, UK) foi adicionado e incubado por 1h à 37 °C. Ao final a reação foi revelada pela adição de 100 µl da mistura cromógena ortofenildiaminobenzidina (OPD) mais substrato da enzima (H₂O₂) e interrompida pela adição de 50 µl de ácido cítrico (0.2M). A intensidade da reação foi determinada por leitura da absorbância em espectrofotômetro (Espectra Max plus 384 Sunnyvale,

CA, EUA) a 492 nm. Os resultados foram expressos como a média das diferentes diluições das amostras acrescida do erro padrão.

3.10 Imunohistoquímica

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (60 mg/kg) e submetidos à perfusão transcardíaca, inicialmente com 100ml de solução salina heparinizada (5 U/ml), seguido de solução fixadora constituída de formaldeído a 4% em tampão tetraborato de sódio (0,1 M, pH 9,5 a 4 °C). A solução fixadora foi perfundida inicialmente na velocidade de 50ml/min durante 4min, seguida de perfusão lenta a 30 ml/min durante 20min.

Os segmentos da medula espinal L3 a L5 foram dissecados de acordo com a inserção das raízes dorsais e pós-fixados na mesma solução fixadora durante 4h. As amostras foram submetidos à crioproteção em solução de sacarose a 30% em tampão fosfato de sódio (PBS, 0,1 M, pH 7,4 a 4 °C durante 12h). Os segmentos medulares foram seccionados transversalmente com 30µm de espessura em micrótomo de congelação (SM2000R; Leica Instruments, Nussloch, Germany) e armazenados de maneira seriada (8 séries) em solução anti-congelante a -20 °C.

Duas séries adjacentes de cortes seriados foram processadas para imunoperoxidase como descrito a seguir: os cortes foram lavados (3 x 10min sob temperatura ambiente) em PBS (0,1M, pH 7,4) e pré-tratados com H₂O₂ a 0,3% para inativar a peroxidase endógena. Após várias lavagens em PBS até remover completamente as bolhas, os cortes foram encubados em solução de permeabilização e bloqueio constituída de PBS, Triton X-100 a 0,3% e soro normal de cabra a 3% sob agitação constante a 18 °C durante 12h. Cada série adjacente de cortes foi então encubada na solução descrita anteriormente com adição de anticorpo primário policlonal obtido em coelho anti-SP ou anti-CGRP (1:2000 e 1:4000, respectivamente; Chemicon, Temecula, CA, USA) sob agitação constante a 18 °C durante 24h. Os cortes foram lavados e encubados em solução contendo anticorpo secundário biotinilado (cabra anti-IgG de coelho 1:1.000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) durante 90min a temperatura ambiente, seguido de mais um ciclo de lavagens e encubação em solução contendo o complexo avidina-biotina peroxidase (1:500, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) durante 1h a temperatura ambiente. A reação de revelação foi desenvolvida na

presença de 3,3'-diaminobenzidina a 0,05% e H₂O₂ a 0,03% sob agitação e acompanhadas visualmente em microscópio de luz.

Os cortes foram montados em lâminas de vidro, desidratados e diafanizados em seqüências de concentrações crescentes de álcoois e xilóis e cobertas com lamínulas de vidro e meio de montagem permanente DPX. As concentrações dos anticorpos utilizados foram determinadas através de reações de titulação, enquanto a especificidade da reação foi determinada através da análise de cortes incubados na ausência dos referidos anticorpos primários. Imagens digitais de três cortes histológicos de cada animal foram obtidas dos lados IPSI e CONTRA do corno dorsal da medula espinal com o programa NIS-Elements AR2.30 (Laboratory Imaging, Nikon, versão 2006) e câmera digital (DXM200C, Nikon) acoplada a microscópio (Nikon Eclipse 80i) utilizando sistema de luz e objetiva plana de 20x. Todas as aquisições referentes a um dado neuropeptídeo foram realizadas em sessão única sob condições uniformes de iluminação ambiental e do sistema de microscopia. Todas as imagens sofreram a mesma intensidade de pós-edição para ajuste de brilho e contraste através da aplicação de macro única previamente gravada no software de aquisição.

A densidade de imunomarcacão para SP e CGRP das lâminas superficiais (lâminas I e II) dos terços lateral, médio e medial do corno dorsal da medula espinal foi quantificada a partir de delimitações de áreas circulares uniformes e em triplicata (aproximadamente 7.000, 29.000 e 7.000 pixels, respectivamente para cada terço). As densidades absolutas (*inverse IDV*) foram obtidas com a ferramenta *Spot Denso* do programa Chemilmager 5500 (Alpha Ease FCTM versão 3.2.2, Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, EUA) e relativizadas através da subtração da densidade de fundo observada em região adjacente do corte sem imunorreatividade específica. Através de análise de variância de uma via (ANOVA) das triplicatas, foi determinada a média $\pm$ E.P.M., seguida de análise estatística para comparações entre os lados IPSI e CONTRA e múltiplas entre os diferentes grupos experimentais.

3.11 Análise histopatológica

As articulações IPSI e CONTRA dos joelhos dos animais submetidos à perfusão transcardíaca (como descrito no item anterior) foram removidas e pós-fixadas na mesma solução fixadora a 4 °C durante 24h. Em seguida, as articulações foram descalcificadas em solução de EDTA a 10% em PBS a 4 °C durante 20 dias.

As amostras foram então submetidas a procedimentos de rotina para inclusão em parafina para secção sagital com 5 µm de espessura e método de coloração com hematoxilina e eosina (H&E). Os cortes foram desidratados e diafanizados em concentrações crescentes de álcoois e xilóis, cobertos com lamínulas de vidro e meio de montagem permanente DPX.

Os cortes histológicos foram analisados qualitativamente através de microscopia de luz (Nikon eclipse 80i) para avaliar o padrão e intensidade de alterações teciduais e infiltração de leucócitos para o espaço articular e tecidos subjacentes. Além disso, foi realizada análise semiquantitativa utilizando escalas que variam de 0 a 8 de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório e exsudato fibrinoso encontrado nas articulações (Roth, *et al.*, 2005).

Em determinados grupos experimentais (grupo indometacina, hemopressina 10ug) foram analisadas microscopicamente amostras de tecidos do estômago dos animais.

3.12 Tratamentos Farmacológicos

3.12.1 Hemopressina

A hemopressina foi administrada por duas vias: oral e i.art., conforme doses estabelecidas em estudo anterior (Dale, *et al.*, 2005). A administração oral (20µg/animal) ou local (10 µg ou 20 µg, i.art.) da hemopressina foi realizada mediante gavagem e injeção i.art. em animais anestesiados, respectivamente. O tratamento com hemoressina foi realizado no dia 0 (antes da indução) e diariamente após a indução da AIA nos dias subseqüentes.

A hemopressina foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Emer Suavinho Ferro, do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

3.12.2 Degeneração das fibras sensoriais

O envolvimento de neuropeptídeos foi avaliado pelo tratamento de ratos neonatos com capsaicina, conhecida pela sua propriedade de degenerar fibras sensoriais e depletar estoques de neuropeptídeos (Jancsó, *et al.*, 1967; Costa, *et al.*, 1997). Para tanto, o anestésico cloridrato de lidocaína em gel (50 mg; 2%) foi

distribuído numa porção do dorso de ratos com dois dias de vida. A seguir, foi realizado a injeção subcutânea (s.c.) da solução de capsaicina (50 mg/kg) na região dorsal, no volume de 0,1 ml, enquanto o grupo controle recebeu o volume correspondente do veículo da capsaicina (etanol: tween 80: salina; 1:1:8). Após oito semanas do tratamento, os animais foram submetidos à artrite experimental.

3.12.3 Bloqueio farmacológico do receptor NK_1

Para avaliar o papel do neuropeptídeo pró-inflamatório SP no modelo de AIA, foi utilizado o tratamento i.art. com o antagonista seletivo desse receptor, o SR140333, na dose de 1nmol/sítio, em animais anestesiados durante 4 dias.

O composto SR140333 foi primeiramente dissolvido em metanol (0.5%) e posteriormente diluído em 1 mg para 400 µl de salina para injeção.

O antagonista SR140333 foi gentilmente cedido pela Dra. Estelle Weinling (Sanofi-Aventis, França).

3.12.4 Inibição farmacológica da enzima ciclooxigenase (COX)

A participação da enzima COX no modelo de AIA foi avaliada pelo uso da indometacina, inibidor desta enzima. As doses empregadas foram baseadas em referências bibliográficas consultadas previamente (Egan, *et al.*, 2005).

A indometacina foi preparada em metilcelulose (1%) e administrada na dose de 5mg/kg, pela via i.p., antes da indução da AIA e diariamente após por período de quatro dias.

3.13 Análise estatística

Os dados obtidos foram expressos como média $\pm$ E.P.M. para valores de n animais/amostras. A análise estatística foi realizada via ANOVA (software Prism 4.0), seguido de pós-teste (Bonferroni) ou, quando necessário, teste t pareado ou não. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

3.14 Procedência das drogas e reagentes utilizados

Nome	Procedências
$C_6H_{12}O_6$	Mallinckrodt, Kentucky, PA, EUA
$C_6H_8O_7$	LabShynth, Diadema, SP, Brasil
Capsaicina	Sigma, St. Louis, MO, EUA
CFA	Sigma, St. Louis, MO, EUA
CH_3CH_2OH	LabShynth, Diadema, SP, Brasil
CH_3COOH	LabShynth, Diadema, SP, Brasil
CH_3OH	Sigma, St. Louis, MO, EUA
Cristal violeta	Cromoline, Diadema, SP, Brasil
EDTA	Merck, Darmstadt, Hessen, Alemanha
Formaldeído	LabShynth, Diadema, SP, Brasil
Gelatina	Sigma, St. Louis, MO, EUA
H_2O_2	Merck, Darmstadt, Hessen, Alemanha
Halotano	Cristália, Itapira, SP, Brasil
HTAB	Sigma, St. Louis, MO, EUA
Indometacina	Sigma, St. Louis, MO, EUA
Ketamina	König, Avellaneda, Argentina
KH_2PO_4	Mallinckrodt, Kentucky, PA, EUA
Met-BSA	Sigma, St. Louis, MO, EUA
Metilcelulose	Cromoline, Diadema, SP, Brasil
Na_2CO_3	Mallinckrodt, Kentucky, PA, EUA
NaCl	LabShynth, Diadema, SP, Brasil
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	Fisher, New Jersey, EUA
$NaHCO_3$	Mallinckrodt, Kentucky, PA, EUA
o-dianisidina	Sigma, St. Louis, MO, EUA
OPD	Sigma, St. Louis, MO, EUA
sacarose	LabShynth, Diadema, SP, Brasil
SR140333	Sanofi-Aventis, Paris, França
tetraborato de sódio	Sigma, St. Louis, MO, EUA
TMB	R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA
Triton X-100	Sigma, St. Louis, MO, EUA
Tween 20	USB, Cleveland, OH, EUA
Tween 80	Sigma, St. Louis, MO, EUA
Xilazina	König, Avellaneda, Argentina

Tabela 2 Relação de reagentes e suas respectivas procedências

4 RESULTADOS

4.1 Estudo comparativo do edema articular no modelo de AIA entre as linhagens Wistar e SD

Após 24 h da indução da artrite, a avaliação da resposta edematogênica na articulação IPSI do joelho (medida antero-lateral em mm) de ratos Wistar mostrou um aumento potente (38%), de maneira tempo-dependente ($P < 0,001$, $n = 17$), em relação ao respectivo basal ou do diâmetro do joelho IPSI do grupo *sham* ($n = 5$, Figura 2A).

Em ratos SD, após 24h da injeção i.art. do antígeno, a mesma avaliação revelou um edema potente (45%, $P < 0,001$; $n = 15$) no joelho IPSI desses animais, semelhante ao obtido na linhagem de ratos Wistar, quando comparado ao respectivo volume basal e ao grupo *sham* ($n = 5$; Figura 2B). Ao contrário do rato Wistar, o edema articular no rato SD atingiu resposta máxima ($P < 0,001$) no primeiro dia e manteve-se semelhante nos dias subseqüentes (Figura 2B).

Tanto no grupo *sham* da linhagem Wistar quanto SD, que recebeu a injeção i.art. do veículo, nenhuma alteração significativa foi observada no diâmetro do joelho desses animais durante o período avaliado em relação aos respectivos valores basais (Figura 2A).

A análise comparativa da área sob a curva (AUC) do edema articular da linhagem de ratos Wistar não mostrou diferença significativa da AUC da linhagem SD, mas foi marcadamente diferente dos respectivos grupos *sham* ($P < 0,001$; Figura 2C).

Figura 2. Avaliação temporal e da AUC do edema articular de joelho induzido pela injeção do antígeno nas linhagens de ratos Wistar e Sprague Dawley. O painel A mostra o edema antero-lateral (medido em mm) nos grupos AIA e sham na articulação de ratos Wistar, enquanto o painel B ilustra a mesma resposta na linhagem SD. O painel C ilustra a AUC do mesmo edema no joelho IPSI dos grupos controle (artrite) e seus respectivos grupos sham em ambas as linhagens. Os dados são expressos como a média $\pm$ EPM para $n = 5-17$ animais. *** $P < 0,001$ vs sham.

4.2 Análise comparativa da dor em ratos Wistar e SD com AIA

4.2.1 Avaliação do escore

A análise do escore após a indução da AIA, utilizada como medida indireta da dor incapacitante, revelou que a linhagem de ratos Wistar apresentou aumento significativo do escore nos dias avaliados ($P < 0,001$) quando comparado ao respectivo grupo *sham*. Embora logo no primeiro dia pós-indução, o escore no grupo Wistar mostrou-se marcadamente elevado em relação ao grupo *sham*, nota-se que nos dias subseqüentes este aumento, embora discreto, apresentou-se gradativo, sendo inclusive significativamente maior do que no dia 1 ($P < 0,01$; Figura 3A).

Assim como na linhagem Wistar, os ratos SD exibiram um escore de dor potente, desde o primeiro ao quarto dia ($P < 0,001$), quando comparado ao grupo *sham*. Nesses animais, o valor do escore no quarto dia foi significativamente maior que no primeiro dia ($P < 0,05$; Figura 3B).

Os grupos *sham* das linhagens Wistar e SD não exibiram nenhuma alteração significativa do escore basal ao longo dos dias examinados em relação aos respectivos valores (escore 0) antes da indução (Figura 3A/B).

Assim como observado na resposta edematogênica, a análise da AUC (do primeiro ao quarto dia) do escore de dor não mostrou diferença entre as linhagens Wistar e SD (Figura 3C).

Figura 3. Análise comparativa da dor induzida pela AIA em ratos Wistar e SD. O painel A ilustra o escore da dor em ratos Wistar tratados com o antígeno (controle) e PBS (*sham*), enquanto o painel B mostra o escore em ratos . SD. O painel C mostra a AUC do escore em ratos Wistar e SD injetados i.art. com antígeno ou PBS. Os dados estão representados como média $\pm$ EPM para $n = 5-12$ animais. *** $P < 0,001$ em relação ao grupo *sham*.

4.2.2 Avaliação das pegadas das patas traseiras (*footprint*)

Conforme descrito anteriormente, o grau de severidade da artrite compromete o mecanismo de deambulação. A figura 4 ilustra estas alterações de deambulação nos ratos durante o curso da AIA. Antes da indução da AIA a deambulação desses animais encontra-se normal, pois a impressão das pegadas de ambas as patas traseiras e a distância entre essas mostrou-se uniforme (Figura 4A). Mediante a instalação da AIA, logo no primeiro dia, a impressão dessas pegadas ficou comprometida, pois os animais apresentaram alterações no padrão de deambulação, caracterizada por redução da distância entre as pegadas ou, em casos extremos, a guarda da pata injetada (Figura 4B). O comprometimento no padrão de deambulação se agravou durante o curso da AIA e, ao final do experimento (4º dia), a ausência da impressão da pata IPSI ficou evidente no registro das pegadas, como ilustra a figura 4C.

Figura 4. Registro de pegadas (*footprint*) das patas traseiras de ratos normal e com AIA. A figura A ilustra as pegadas das patas traseiras de rato normal (dia 0). A figura B ilustra as pegadas deste mesmo animal um dia após a indução da artrite. A figura C mostra as pegadas deste animal na fase aguda da doença (4º dia). Note a ausência da pegada da pata IPSI. Esta é uma figura representativa de um animal da linhagem SD. Contudo, esse comportamento não diferiu do rato Wistar

A figura 5A ilustra que em ratos Wistar, a distância (medida em cm) entre as pegadas consecutivas das patas traseiras CONTRA do grupo AIA foi reduzida após 48h ($P<0,05$), 72h ($P<0,05$) e 96h ($P<0,001$) em relação aos valores do grupo *sham* (Figura 5A). Nesse mesmo grupo, nota-se que a distância entre as pegadas consecutivas das patas traseiras IPSI foi marcadamente reduzida 24h após a AIA ($P<0,001$), cuja diferença se manteve até o quarto dia (Figura 5B). Ainda, a distância entre as patas traseiras CONTRA e IPSI foi substancialmente reduzida ($P<0,001$) em relação ao grupo *sham* dessa linhagem (Figura 5C).

Semelhante aos ratos Wistar, a AIA em ratos SD causou redução significativa ($P<0,01$ - $P<0,001$) na distância entre as pegadas consecutivas das patas traseiras CONTRA quando comparada às respectivas pegadas do grupo *sham* SD (Figura 5D). A distância entre as pegadas consecutivas das patas traseiras IPSI dos ratos SD foi afetada após 24h ($P<0,001$), mantendo-se comprometida até o último dia analisado (Figura 5E). A figura 5F mostra que a distância entre as pegadas das patas traseiras IPSI e CONTRA do grupo AIA foi menor ($P<0,001$) do o valor do respectivo grupo. Não foram observadas alterações significativas no registro de locomoção motora no grupo *sham* de ambas as linhagens (Figuras. 5A - 5F).

A distância (medida em cm) das pegadas consecutivas das patas traseiras CONTRA da linhagem Wistar, medida como AUC (do 1º ao 4º dia), não foi diferente daquela obtida com a linhagem SD, muito embora em ambos os casos observou-se uma redução da distância das pegadas ($P<0,001$) em relação aos respectivos grupos *sham* (Figura 6A). Não foram observadas diferenças significativas entre as distâncias das pegadas consecutivas das patas IPSI (Figura 6B) ou CONTRA e IPSI dos ratos Wistar e SD (Figura 6C).

Figura 5. Avaliação da distância entre as pegadas das patas traseiras IPSI e CONTRA de ratos Wistar e SD durante o curso da AIA. Foram analisadas as distâncias entre as impressões das patas traseiras CONTRA (A) ou IPSI (B) da linhagem Wistar. Da mesma forma, os painéis D e F ilustram a distância entre as impressões das patas traseiras CONTRA ou IPSI, respectivamente. Os painéis C e E mostram a distância entre as impressões das patas traseiras CONTRA e IPSI dos grupos Wistar e SD, respectivamente. Os dados estão representados como média $\pm$ EPM para 4-5 animais. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ em relação ao grupo sham.

Figura 6. AUC das distâncias entre as pegadas das patas IPSI e CONTRA de ratos Wistar e SD durante o curso da AIA. O painel A mostra a AUC da distância entre as impressões das patas traseiras IPSI dos grupos artrite e *sham* em ambas as linhagens. O painel B ilustra a mesma resposta para as patas IPSI, enquanto o painel C mostra a distância entre as impressões das patas IPSI E CONTRA dos grupos AIA e *sham* para ambas as linhagens. Os dados estão representados como média $\pm$ EPM para $n = 4-5$ animais. *** $P < 0,001$ em relação ao grupo *sham*.

4.3 Avaliação da perda de peso corpóreo durante a AIA em ratos Wistar e SD

A figura 7A mostra a evolução da variação de peso corpóreo de ratos Wistar durante o curso temporal da AIA. Quando comparado ao respectivo grupo *sham*, nota-se que ao contrário desses, os animais com AIA não apresentaram ganho de peso, sendo essa variação do peso corpóreo estatisticamente diferente após o terceiro e quarto dia da AIA ($P<0,01$ e $P<0,001$, respectivamente).

Em ratos SD a indução da AIA preveniu o ganho de peso nesses animais durante o curso da doença, quando comparado ao respectivo grupo *sham* (Figura 7B). Ainda, diferente dos ratos Wistar, esses animais apresentaram, a partir do primeiro dia, perda do peso corpóreo significativa em relação ao peso inicial, sendo esse efeito revertido no quarto dia (Figura 7B).

Conforme esperado, os grupos *sham* de ambas as linhagens exibiram ganho de peso corpóreo diário.

Os valores de AUC mostram que mediante a AIA a linhagem de ratos SD mostrou-se mais susceptível a perda de peso do que os ratos Wistar ($P<0,001$; Figura 7C).

Figura 7. Peso corpóreo dos ratos Wistar e SD durante o curso da AIA. Os painéis A e B mostram a variação de peso entre os grupos *sham* e AIA das linhagens Wistar e SD, respectivamente, durante o curso da AIA. O painel C mostra a AUC do peso corpóreo. Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM para $n = 5-8$ animais $**P < 0,01$ e $***P < 0,001$ vs *sham*. $###P < 0,001$ vs SD.

4.4 Análise do influxo de células na cavidade articular de ratos com da AIA

As figuras 8A e 8B mostram que durante as seis primeiras horas do curso temporal da AIA, o fluido sinovial de ratos Wistar bem como SD exibiu um aumento significativo ($P < 0,001$) no número total de leucócitos e na atividade da MPO ($P < 0,01$, $P < 0,001$) em relação aos valores obtidos nos respectivos grupos *sham*, que recebeu a injeção i.art. de PBS. Nota-se, contudo, que a contagem de células e atividade da MPO na linhagem SD foi superior ($P < 0,05$) a da linhagem Wistar.

As figuras 9A e 9B mostram que no quarto dia, e portanto último, da avaliação da artrite, o fluido sinovial dos ratos Wistar ou SD com AIA apresentou maior número ($P < 0,05$ – $P < 0,001$) de leucócitos em relação aos valores dos respectivos grupos *sham*. Verificou-se ainda que o influxo de células na cavidade articular IPSI dos ratos SD foi superior ($P < 0,05$) ao encontrado no lavado articular dos ratos Wistar .

De maneira semelhante, a atividade da MPO, no quarto dia, aumentou significativamente no fluido sinovial IPSI comparado ao grupo *sham* nas linhagens Wistar e SD ($P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente). Ainda, é possível observar que os ratos SD do grupo AIA apresentaram maior atividade desta enzima do que os ratos Wistar do mesmo grupo ($P > 0,001$).

Figura 8. Avaliação do número de leucócitos totais e atividade da MPO no lavado articular de ratos Wistar e SD, após 6 horas da AIA. O painel A ilustra a contagem total de células obtidas no lavado articular dos grupos *sham* e artrite para ambas as linhagens. O painel B revela a atividade da enzima para esses mesmos grupos experimentais. Os dados estão representados como média $\pm$ EPM para $n = 3-9$ animais. *** $P < 0,001$ vs *sham* # $P < 0,05$ vs Wistar.

Figura 9. Influxo de leucócitos totais e atividade da MPO no fluido sinovial de ratos Wistar e SD após 4 dias de indução da AIA. O painel A ilustra o valor de leucócitos totais obtidas nos lavados articulares dos grupos *sham* e artrite para ambas as linhagens. O painel B mostra, no mesmo período, a atividade da MPO no fluido sinovial desses mesmos grupos experimentais. Os dados estão representados como média $\pm$ EPM para $n= 3-5$ animais. * $P<0,05$ e *** $P<0,001$ vs *sham* # $P<0,05$ e ### $P<0,001$ vs Wistar.

4.5 Análise da presença de citocinas no fluido sinovial após indução da AIA

A figura 10A mostra que tanto o fluido sinovial do joelho IPSI de ratos Wistar quanto de ratos SD com AIA exibiu, após 6h, um aumento significativo ($P < 0,01$) da concentração da IL-1 β , mas não do TNF α , quando comparado aos respectivos grupos *sham*. Entretanto, nota-se que não houve diferença significativa na concentração dessa citocina entre as linhagens Wistar e SD nesse período. Embora não diferente estatisticamente do grupo *sham*, concentrações da IL-6 foi observada no fluido sinovial ISPI de ratos SD, mas não de ratos Wistar (Figura 10B).

No quarto dias pós-indução da AIA, observa-se ainda um aumento significativo na concentração da IL-1 β no fluido sinovial IPSI de ambas as linhagens em relação aos respectivos grupos *sham* (Figura 10C). Nesse período, entretanto, foi detectado um aumento pronunciado ($P < 0.001$) dessa citocina no fluido sinovial dos ratos SD em relação aos ratos Wistar (Figura 10C).

Nem em fluido sinovial de ratos Wistar e nem de SD, foram detectadas concentrações significativas das citocinas IL-6 e TNF- α após quatro dias da AIA.

Figura 10. Quantificação de citocinas no fluido sinovial de ratos Wistar e SD com AIA.

O painel A e B ilustram os níveis de IL-1 β e IL-6 seis horas após a AIA em ambas as linhagens Wistar e SD. O painel C revela os níveis de IL-1 β no fluido sinovial dos mesmos grupos após quatro dias de AIA. Os dados estão representados como média $\pm$ EPM para n= 3 animais. **P<0,01e ***P<0,001 vs sham +++P<0,001 vs Wistar.

4.6 Concentração de IgG no plasma e no fluido sinovial após indução da AIA

A concentração de IgG anti-Met-BSA foi determinada no plasma e no fluido sinovial dos animais após 4 dias da indução da AIA por meio do teste ELISA. A figura 11A mostra os níveis de IgG no plasma dos animais das linhagens Wistar. Os níveis de IgG do grupo AIA e *sham* foram significativamente diferentes do grupo naïve ($P < 0.001$), mas não apresentaram diferenças estatísticas entre si. Da mesma forma a linhagem SD apresentou concentração significativamente maior de IgG nos grupos AIA e *sham* comparada ao grupo naïve ($P < 0,001$), mas estes grupos também não diferiram entre si (Figura 11B). Não foram encontradas diferenças na concentração de IgG dos grupos experimentais entre as linhagens Wistar e SD.

A figura 12A e B ilustra a dosagem de IgG no fluido sinovial dos animais do grupo naïve, *sham* e AIA de ratos Wistar e SD. Tanto na linhagem Wistar quanto SD, os maiores valores de IgG foram encontrados no grupo AIA IPSI, comparado aos respectivos grupos AIA CONTRA ($P < 0,01$ – $P < 0,001$). O fluido sinovial das articulações IPSI do grupo AIA também apresentaram valores significativamente maiores que ambas as articulações dos grupos *sham* ($P < 0,001$) e naïve ($P < 0,001$), em ambas as linhagens.

Verificou-se que a linhagem SD com AIA apresentou maior concentração de IgG no lavado articular em relação aos demais grupos experimentais, muito embora esse valor não foi diferente estatisticamente dos ratos Wistar. Da mesma forma, não foram encontradas diferenças estatísticas entre as linhagens nos demais grupos experimentais.

Figura 11. Medida da concentração de IgG (anti Met-BSA) plasma de ratos Wistar e SD no 4º dia de AIA. Os painéis A e B mostram os valores de absorbância obtidas nas diferentes concentrações de plasma para os grupos naïve, sham e AIA para as linhagens Wistar e SD, respectivamente. Os dados estão representados como média $\pm$ EPM para $n=3$ animais. *** $P<0,001$ vs naïve.

Figura 12. Valores de IgG anti Met-BSA no fluido sinovial de ratos Wistar e SD no 4º dia da AIA. OS painéis A e B ilustram os níveis de IgG anti Met-BSA nos grupos naïve, *sham* e AIA nas linhagens Wistar e SD, respectivamente. Os dados estão representados como média $\pm$ EPM para $n = 3$ animais. *** $P < 0.001$ vs AIA contra.

4.7 Efeito da hemopressina sobre a AIA

Conforme demonstrado acima, na AIA não foram observadas grandes diferenças nos sinais e sintomas inflamatórios desse modelo experimental entre as linhagens Wistar e SD. Mesmo assim, nota-se que os ratos SD exibiram uma sensibilidade aumentada para alguns parâmetros avaliados. Desta forma, a investigação farmacológica do papel da hemopressina foi realizada nessa linhagem.

4.7.1 Efeitos dos tratamentos oral e local da hemopressina sobre o edema articular de joelho em ratos SD

A figura 13A demonstra que o tratamento i.art. diário de ratos SD a hemopressina, na dose de 10 µg por cavidade, resultou em inibição significativa do edema articular nos dias 1 ($P<0,001$), 2 ($P<0,05$), 3 ($P<0,001$) e 4 ($P<0,001$) seguida a indução da AIA. A injeção i.art. da hemopressina, no dobro desta dose (20 µg/cavidade) também promoveu redução do edema articular nos animais durante o curso temporal da AIA, de forma semelhante ao observado com a menor dose.

A hemopressina, quando administrada pela v.o. na dose diária de 20µg/rato promoveu diminuição significativa do edema articular do joelho IPSI nos dias 3 ($P<0,01$) e 4 ($P<0,001$) pós-indução da AIA.

O efeito inibitório significativo ($P<0,01$ - $0,001$) do tratamento i.art., mas não do oral, com a hemopressina sobre o edema articular no joelho IPSI de ratos pode ser também visualizado pelo gráfico da AUC em relação aos valores de AUC do grupo controle AIA ao longo do período de quatro dias (Figura 13 B).

Figura 13. Efeito inibitório da hemopressina sobre edema articular da AIA em ratos SD. O painel A mostra a média diária do edema articular de joelhos IPSI de ratos controle AIA e AIA com hemopressina, injetada i.art. ou oral. O painel B ilustra a AUC do edema articular no período de quatro dias para os mesmos grupos. Os dados estão representados como média $\pm$ EPM para $n = 5-8$ animais. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ vs AIA.

4.7.2 Avaliação do efeito do tratamentos oral e local da hemopressina sobre a resposta dolorosa em ratos SD com AIA

A hemopressina, na dose i.art. diária de 10 µg, causou redução significativa do escore da dor nos dias 2 ($P<0.05$), 3 ($P<0.01$) e 4 ($P<0.001$) pós-indução da AIA (Figura 14A). Na dose i.art de 20 µg, a hemopressina diminuiu o escore de forma mais eficiente ($P<0.01$), a partir do dia 1 (Figura 14A). O tratamento v.o. com hemopressina inibiu significativamente o escore, mas foi menos evidente ($P<0.05$) e ocorreu somente a partir do dia 2 (Figura 14A).

A figura 14B, que representa a média da AUC de escores para os ratos controle e tratados com hemopressina, mostra que o tratamento local, mas não oral, causou redução significativa da AUC do escore, comparado ao grupo AIA (Figura 14B).

Os tratamentos com hemopressina aumentaram a distância (medida como % da distância em cm) entre as pegadas consecutivas das patas traseiras IPSI, mas sem diferença estatística (Figura15B). Esses tratamentos não afetaram a distância das pegadas das patas CONTRA (Figura15A). A distância % entre as patas IPSI e CONTRA de ratos AIA foi aumentada pela hemopressina, mas somente a dose i.art. de 10 µg mostrou diferença estatística (Figura 15C).

As AUC das distâncias entre as pegadas consecutivas das patas traseiras IPSI (Figura 15D), mas não CONTRA (Figura 15E), bem como a distância entre as pegadas das patas IPSI e CONTRA, foram significativamente aumentadas pelo tratamento i.art. com 10 µg de hemopressina. Na dose de 20 µg, local ou oral, a hemopressina não causou reversão significativa da diminuição entre as pegadas consecutivas das patas IPSI ou entre as pegadas das patas IPSI e CONTRA (Figura15F).

Figura 14. Efeito inibitório da hemopressina sobre edema articular da AIA em ratos SD. O painel A mostra a média diária do edema articular de joelhos IPSI de ratos controle AIA e AIA com hemopressina, injetada i.art. ou oral. O painel B ilustra a AUC do edema articular no período de quatro dias para os mesmos grupos. Os dados estão representados como média $\pm$ EPM para $n = 5-8$ animais. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ vs AIA.

Figura 15. Efeito da hemopressina sobre a avaliação motora no modelo de AIA. O painel A mostra a média (em %) da distância entre as impressões da pata posterior CONTRA dos diferentes grupos experimentais. O painel B ilustra a média (em %) das distâncias entre as impressões consecutivas das patas IPSI dos mesmos grupos. O painel C mostra a média (em %) da distância entre as patas IPSI e CONTRA dos diferentes grupos. Os painéis D, E e F mostram as AUC correspondentes aos gráficos A, B e C, respectivamente. Os dados estão representados como média $\pm$ EPM para $n = 5-8$ animais. * $P < 0,05$ – $P < 0,001$ vs artrite.

4.7.4 Avaliação do efeito do tratamentos oral e local da hemopressina sobre a perda de peso corpóreo em ratos SD com AIA

Conforme demonstrado anteriormente, a AIA promoveu a perda de peso corpóreo em ratos SD, a qual não foi revertida ou prevenida pelos tratamentos dos animais com hemopressina local ou oral (Figura 16). Ao contrário, observou-se que a perda de peso corpóreo de ratos SD durante o curso temporal da AIA foi significativamente exacerbada pelos tratamentos com hemopressina, pela via oral ou local, na dose de 20 µg por cavidade (Figura 16). O tratamento pela via oral mostrou maior efeito sobre a perda de peso, que foi estatisticamente diferente do grupo AIA a partir do primeiro pós-indução da artrite .

Figura 16. Efeito da hemopressina sobre a perda de peso corporal no modelo de AIA em ratos SD. Observa-se que os tratamentos com hemopressina acentuaram a perda de peso nos animais com AIA.. Os dados estão representados como média $\pm$ EPM para $n = 5-8$ animais. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ em relação ao grupo artrite (AIA).

4.7.5 Efeito da hemopressina sobre o aumento do número de leucócitos totais e da atividade da MPO no fluido sinovial de ratos SD com AIA.

A injeção i.art. diária da hemopressina (10 µg) inibiu significativamente o influxo de leucócitos totais no lavado articular do joelho IPSI após quatro dias da indução da AIA, quando comparado ao grupo controle AIA (Figura 17A).

De forma semelhante, esse tratamento reduziu marcadamente o aumento da atividade da MPO no fluido sinovial dos ratos SD no mesmo período em comparação ao grupo controle AIA (Figura 17B).

Figura 17. Efeito da hemopressina sobre a celularidade e atividade da MPO no fluido sinovial de ratos SD com AIA. Os painéis A e B ilustram a contagem total de leucócitos e atividade da MPO, respectivamente, no fluido sinovial de ratos SD com AIA na presença (barras fechadas) e ausência (barras abertas) do tratamento com hemopressina (10 mg/cavidade). Os dados estão representados como média $\pm$ EPM para n= 6-8 animais, Valores de **P<0,01 e ***P<0,01 vs controle AIA.

4.7.6 Efeito da Hemopressina sobre os níveis de citocinas no fluido sinovial

O tratamento com a hemopressina (10 µg) não causou alteração na concentração de IL-1 β no fluido sinovial 6h após a indução da AIA (Figura 18A). No entanto, este tratamento foi capaz de reduzir significativamente a concentração de IL-6 no lavado da cavidade articular IPSI, quando comparado ao grupo AIA (Figura 18B).

Figura 18. Efeito da hemopressina sobre a concentração de citocinas no fluido sinovial após 6 horas da AIA. O painel A ilustra os níveis de IL-1 β nos grupos controle AIA (barras abertas) e tratado com hemopressina (10µg/cavidade; barras fechadas). O painel B apresenta os níveis de IL-6 para os mesmos grupos no mesmo período. **P<0.01 vs AIA. Os dados estão representados como média $\pm$ EPM para n= 3 animais.

4.7.8 Efeito da hemopressina sobre a produção de IgG anti-Met-BSA no plasma e no fluido sinovial de ratos com AIA

No quarto dia pós-indução da AIA, o tratamento com hemopressina (10 µg) não modificou a concentração plasmática de IgG anti Met-BSA, quando comparado ao grupo controle AIA (Figura 19A). Porém, a concentração plasmática desse anticorpo em ambos os grupos foi superior a encontrada em ratos naïve (Figura 19A).

A figura 19B mostra que, quatro dias após a indução da AIA, a concentração de IgG anti Met-BSA no fluido sinovial do joelho IPSI de ratos SD, foi maior ($P < 0.01$) do que o valor encontrado no respectivo joelho CONTRA ou ainda no fluido articular IPSI dos grupos *sham* e naïve ($P < 0.001$). O tratamento i.art. diário, por quatro dias, com a hemopressina não suprimiu os níveis de IgG detectados no fluido sinovial dos animais com AIA. Esse mesmo tratamento não interferiu, de forma significativa, nos valores desse anticorpo no fluido sinovial da pata CONTRA dos animais com AIA.

Figura 19 Efeito da hemopressina sobre a concentração de IgG anti Met-BSA plasmática e no fluido sinovial de ratos SD quatro dias após a indução da AIA. O painel A ilustra os níveis de IgG anti Met-BSA plasmático para os diferentes grupos experimentais, enquanto o painel B mostra as concentrações do IgG no fluido sinovial dos joelhos IPSI e CONTRA nos grupos naíve, *sham*, AIA e AIA + hemopressina. Os dados estão representados como média $\pm$ EPM para $n=3$ animais.

4.7.9 Análise do efeito da hemopressina sobre as alterações morfológicas da AIA

A análise qualitativa de cortes da articulação de joelhos que receberam injeção i.art. de salina (Figura 20A e 20E), revelou um padrão histológico de normalidade, com níveis baixos ou ausência de leucócitos na membrana sinovial (MS). A lâmina íntima apresentava-se normal, com espessura discreta e organizada em camada uni ou bicelular. A subíntima apresentava-se com características típicas de tecido conjuntivo frouxo, com densa vascularização e presença de adipócitos.

Em cortes histológicos IPSI de articulação de joelho de animais submetidos à AIA, foi observado aspectos típicos de artrite aguda, com extenso dano tecidual da MS, invasão do espaço articular por tecido hiperplásico e infiltrado inflamatório constituído principalmente por PMN, além de leucócitos mononucleares (linfócitos, plasmócitos, monócitos e macrófagos), como é possível observar nas figuras 20B e 20F. O nível de dano tecidual da MS não permitia a caracterização visual da lâmina íntima, além de ter sido observado áreas de microhemorragia.

Dentre os aspectos inflamatórios articulares observados pela AIA, o tratamento i.art. com hemopressina reduziu principalmente o infiltrado de leucócitos, enquanto a MS apresentou discreta reversão dos danos teciduais (Figuras 20C e G). Do mesmo modo, o tratamento dos animais com indometacina apresentou efeitos similares aos observados para a hemopressina (Figuras 20D e 20H). Os tecidos articulares ósseo e cartilaginoso não apresentaram sinais de degeneração em nenhum grupo experimental analisado.

A análise semiquantitativa da inflamação articular, realizada de acordo com Roth e colaboradores (2005), corrobora os resultados da análise qualitativa. Na figura 21 podemos observar um aumento significativo do escore histológico nas articulações IPSI em relação às respectivas articulações CONTRA em todos os grupos experimentais ($P < 0,001$). Ainda é possível observar que o tanto o tratamento com hemopressina quanto indometacina, apesar de não reverterem totalmente o quadro inflamatório, resultou em diminuição significativa do escore histológico ($P < 0,001$).

Além das articulações, foram analisadas amostras de tecidos do estômago dos animais tratados com hemopressina (10µg) e indometacina após 4 dias da indução da AIA.. Não foram observadas alterações no estômago dos animais que recebem hemopressina. No entanto, no grupo tratado com indometacina foi observado a presença de um infiltrado inflamatório leve.

Figura 20. Fotomicrografias de pequeno (100X) e grande (400X) aumento obtidas por microscopia de luz de cortes sagitais do joelho corados pelo método H&E. Em A, observe os aspectos de normalidade do espaço articular e MS após injeção i.art. de salina, e em E, note em detalhe a uniformidade da íntima (setas). Em B, observe extenso dano tecidual e infiltrado de PMN causado pela AIA, comprometendo a MS e espaço articular, mostrado em detalhe em F (*). Em C e G, observe o efeito antiinflamatório da hemopressina, menor extensão de lesão tecidual e infiltrado de PMN. Da mesma maneira, evidenciado em D e H, em animais sob ação antiinflamatória da indometacina,. Abreviaturas: ea, espaço articular; li, lâmina íntima; ls, lâmina subintima; f, fêmur; c, cartilagem.

Figura 21. Efeito da hemopressina e indometacina sobre o escore histológico 4 dias após a indução da AIA. A figura apresenta os valores de escore histológico atribuído as articulações IPSI e CONTRA dos grupos AIA, artrite tratado com hemopressina e artrite tratado com indometacina. Os dados estão representados como média $\pm$ EPM para $n = 5-10$ animais. *** $P < 0,001$ vs CONTRA e +++ $P < 0,001$ vs AIA.

4.7.9 Avaliação imunohistoquímica do papel da SP e CGRP na AIA em ratos SD submetidos ao tratamento com hemopressina

A imunorreatividade à SP e ao CGRP (SP- e CGRP-ir) em animais do grupo *sham* foi observada principalmente nas lâminas superficiais (lâminas I e II) do corno dorsal da medula espinal, onde foi possível observar densa marcação em axônios e em pontos terminais, enquanto em lâminas mais profundas, a imunorreatividade foi observada de maneira esparsa em algumas poucas fibras nervosas (Figura 22A e 22E). No caso da SP, também foi observada imunorreatividade na região funicular lateral ao corno dorsal da medula espinal, originária de vias descendentes supra-espinais. Com relação ao CGRP, foi observada também imunorreatividade em pericários de neurônios motores no corno ventral da medula espinal (dados não mostrados).

O padrão de distribuição da imunorreatividade à SP não apresentou diferenças qualitativas ou quantitativas entre os diferentes grupos experimentais, tanto no lado IPSI, como no lado CONTRA à indução da artrite (Figuras 22A-D). O padrão de distribuição da imunorreatividade ao CGRP apresentou discreta diferença qualitativa entre os grupos *sham* e AIA (Figuras 22E e F, respectivamente), mostrando maior densidade e profundidade de imunomarcação nos lados IPSI e CONTRA do corno dorsal da medula espinal, principalmente na porção média do mesmo. Entretanto, a análise quantitativa não revelou diferença estatisticamente significativa (dados não mostrados). Finalmente, os tratamentos dos animais com hemopressina ou indometacina não reverteram as alterações acima citadas observadas após a indução da artrite através de análise qualitativa (Figuras 22F-H) ou quantitativa (dados não mostrados). A omissão de anticorpo primário anti-SP ou anti-CGRP demonstrou a especificidade da imunomarcação, haja vista a reação não ter se desenvolvido nesse procedimento controle experimental.

Figura 22. Fotomicrografias ipsilaterais de médio aumento (200X) obtidas por microscopia de luz de cortes transversais da medula espinal submetidos à IHC. Observe que a SP- e CGRP-ir estão distribuídas preferencialmente em axônios e pontos terminais das lâminas superficiais (I e II) do corno dorsal. Note ausência de diferença no padrão de distribuição da SP-ir entre os grupos *sham*, AIA e tratados com hemopressina ou indometacina (Figuras 22A, B, C e D, respectivamente). À direita, observe discreta diferença no padrão de CGRP-ir no corno dorsal de animais do grupo *sham* em relação ao AIA (Figuras 22E e F, respectivamente). Nas fotomicrografias 22F-H, observe que os tratamentos com hemopressina ou indometacina não reverteram as diferenças no padrão de CGRP-ir decorrentes da AIA no joelho do rato.

4.8 Investigação do papel das fibras C sobre o modelo de AIA

Para investigação do papel das fibras C (e seus neuropeptídeos) sobre o modelo de AIA, utilizou-se animais depletados de neuropeptídeos pelo tratamento neonatal com capsaicina e também pelo bloqueio específico do receptor para SP. Nestas investigações, foram utilizados ratos da linhagem Wistar em consequência do, já bem estabelecido, tratamento com capsaicina.

4.8.1 Efeito da depleção de neuropeptídeos no modelo de AIA

A figura 23A ilustra que em animais tratados com capsaicina, quando neonatos, o edema articular causado pela AIA foi discretamente menor do que o grupo AIA controle. Neste caso, uma diferença estatisticamente menor foi observada entre os grupos no primeiro e no segundo dia após a indução da AIA ($P < 0,001$ e $P < 0,05$, respectivamente). A análise da AUC do edema articular, ao longo dos quatro dias, mostrou diferença significativa entre o grupo tratado e controle ($P < 0,05$; Figura 23B).

A figura 24A mostra que o grupo tratado com capsaicina apresentou uma redução do escore significativa apenas no primeiro dia após a indução da AIA comparado com o grupo controle ($P < 0,05$). Dados semelhantes foram encontrados nas análises das AUC do escore (Figura 24B).

A ausência de neuropeptídeos em animais submetidos ao tratamento com capsaicina não protegeu esses animais da perda de peso corpóreo observado pela indução da AIA, quando comparado ao grupo controle (Figura 25).

O pré-tratamento com capsaicina também não interferiu no influxo de células (Figura 26A) e no aumento da atividade da MPO (Figura 26B) no fluido sinovial dos animais, comparado ao grupo controle.

Figura 23. Efeito do tratamento neonatal com capsaicina sobre o edema articular no modelo de AIA em ratos Wistar. O painel A apresenta o diâmetro dos joelhos IPSI e CONTRA dos grupos AIA e capsaicina ao longo dos quatro dias * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$ vs AIA. O painel B ilustra as AUC do edema articular de ambos os grupos e joelhos IPSI e CONTRA. + $P < 0,05$ vs AIA e. *** $P < 0,001$ vs CONTRA. Os dados estão representados como média $\pm$ EPM para $n = 3-5$ animais.

Figura 24. Efeito da capsaicina sobre o escore em ratos SD durante o curso da AIA. O painel A ilustra o escore dos grupos AIA e AIA previamente tratados com capsaicina. O painel B apresenta as AUC do escore nestes mesmos grupos. * $P < 0.05$ vs AIA. Os dados estão representados como média $\pm$ EPM para $n = 3-5$ animais.

Figura 25. Peso corporal dos animais tratados com capsaicina durante o curso da AIA. A figura apresenta a variação de peso corpóreo dos grupos AIA e AIA + capsaicina durante o curso experimental da artrite . Os dados foram expressos como a média $\pm$ EPM para 3-5 animais.

Figura 26. Efeito do tratamento com capsaicina sobre o influxo celular e atividade da MPO no modelo de AIA. O painel A mostra a contagem de células no fluido sinovial dos animais do grupo AIA e tratado com capsaicina 4 dias após a indução da AIA. O painel B ilustra a atividade da MPO nos mesmos grupos, no qual observa-se um aumento marcante da atividade da MPO no joelho IPSI em relação ao CONTRA em ambos os grupos. Contudo, a análise comparativa entre os joelhos IPSI de ambos os grupos não mostrou alteração significativa. *** $P < 0,001$ vs CONTRA. Os dados estão representados como média $\pm$ EPM para $n = 3-5$ animais.

4.8.2 Efeito do bloqueio farmacológico do receptor NK₁ sobre os parâmetros inflamatórios na AIA

Com o objetivo de avaliar o papel do neuropeptídeo pró-inflamatório substância P, um grupo separado de animais recebeu previamente e diariamente durante o curso da AIA tratamento com SR140333, antagonista do receptor NK₁. A figura 27 mostra o efeito deste tratamento sobre os parâmetros inflamatórios na AIA nestes animais.

Os animais tratados com SR140333 apresentaram edema semelhante ao grupo AIA (Figura 27A). Pode-se observar uma discreta redução neste parâmetro no terceiro e quarto dia após a indução, no entanto, não houve diferença estatística.

A figura 27B mostra que o tratamento com SR140333 não foi capaz de reduzir a dor causada pela indução da AIA, uma vez que não houve diferença estatística entre o grupo AIA e tratado com o antagonista.

Da mesma forma, o bloqueio do receptor NK₁ não interferiu no aumento da atividade da MPO (Figura 27C) no fluido sinovial dos animais, comparado ao grupo AIA.

Figura 27 Efeito do bloqueio do receptor NK_1 sobre o modelo de AIA. O painel A apresenta o diâmetro dos joelhos IPSI e CONTRA dos grupos AIA e tratados com SR140333 ao longo dos quatro dias. O painel B ilustra o escore de ambos os grupos. O painel C mostra a atividade da MPO no fluido sinovial das articulações IPSI e CONTRA dos mesmos grupos *** $P < 0,001$ vs CONTRA. Os dados estão representados como média $\pm$ EPM para $n = 4$ animais.

4.9 Efeito da inibição da enzima COX sobre a AIA em ratos SD

A indometacina, um antiinflamatório potente e bem conhecido por causar redução do processo inflamatório doloroso (agudo e crônico), foi utilizada neste estudo simplesmente como um controle positivo, pois entendemos ser relevante a análise comparativa do efeito supressor deste conhecido agente com os demais agentes teste em estudo (hemopressina e inibição neurogênica) sobre o modelo de AIA em roedores.

4.9.1 Efeito da indometacina sobre o edema e a dor durante a AIA

A figura 28A ilustra que o tratamento diário, pela injeção i.p., da indometacina (5 mg/kg, Egan *et al.*, 2005), um inibidor não-seletivo da COX, promoveu redução gradativa, e de maneira significativa ($P < 0,001$), do edema do joelho IPSI durante o curso temporal da AIA, quando comparada ao grupo controle da artrite, que recebeu o veículo da indometacina. A redução do edema articular pela indometacina foi mais pronunciada após o terceiro e quarto dia, chegando a atingir valores próximos ao volume basal da articulação (Figura 28A). A AUC do edema da articulação IPSI durante o curso da AIA evidencia claramente que a indometacina inibe substancialmente ($P < 0,01$) o edema no joelho de ratos SD (Figura 28B).

Nesses mesmos animais, logo a partir do segundo dia pós-indução da AIA, a indometacina reduziu parcialmente, porém de forma significativa ($P < 0,01$ - $P < 0,001$), os valores médios do escore da dor (Figura 29A). Tal redução foi mais pronunciada no terceiro dia, mas manteve-se inalterada no quarto dia. Assim como o efeito sobre o edema, o grupo AIA tratado com indometacina mostra uma clara redução da dor, expresso como AUC, em relação ao grupo AIA controle (Figura 29B).

A indometacina reverteu ainda a redução da distância entre as pegadas consecutivas das patas traseiras IPSI e na distancia entre as patas IPSI e CONTRA de animais com AIA em comparação ao grupo AIA controle (Figura 30B e C). A diferença entre as distâncias das pegadas consecutivas das patas traseiras CONTRA de ratos com AIA não foi afetada pela indometacina (Figura 30A). Os resultados de AUC confirmam os dados obtidos com os valores absolutos (Figura 30D-F).

Figura 28. Efeito da indometacina sobre o edema articular induzido pela AIA em ratos SD. O painel A apresenta o diâmetro (em mm) dos joelhos nos grupos AIA controle e AIA tratado com indometacina. O painel B ilustra a AUC do edema articular no grupo AIA controle e tratado. Os dados estão representados como média $\pm$ EPM para $n = 8-17$ animais. *** $P < 0,001$ vs AIA.

Figura 29. Efeito analgésico da indometacina na AIA em ratos SD. O painel A ilustra o efeito da indometacina sobre o escore obtido ao longo dos quatro dias, enquanto o painel B apresenta as AUC do escore de ambos os grupos AIA e AIA + indometacina. Os dados estão representados como média $\pm$ EPM para $n = 5-7$ animais. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ vs artrite (AIA).

Figura 30. Efeito da indometacina sobre a distância entre as pegadas (*footprint*) de patas traseiras de ratos SD durante o curso da AIA. O painel A mostra a distância entre as impressões das patas traseiras CONTRA dos grupos AIA e AIA + indometacina. O painel B ilustra a distância entre as patas IPSI de ambos os grupos. O painel C revela a distância entre as impressões das patas IPSI e CONTRA dos mesmos grupos. As figuras D e E representam as AUC das distâncias entre as impressões consecutivas das patas posteriores CONTRA e IPSI, respectivamente. O Painel 7F ilustra as AUC das distâncias entre as patas IPSI e CONTRA de ambos os grupos. Os dados estão representados como média $\pm$ EPM para $n = 5-10$ animais. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ vs AIA.

4.9.2 Efeito da Indometacina sobre a perda de peso corpóreo de ratos SD com AIA

A figura 31 demonstra que o tratamento com indometacina não foi capaz de corrigir a perda de peso corpóreo no evento da AIA nos ratos SD. Assim, tanto o grupo AIA controle quanto aquele tratado com indometacina apresentou redução significativa no peso corporal no primeiro ($P<0,001$), segundo ($P<0,05$) e terceiro ($P<0,05$) dia pós-indução da artrite em relação ao respectivo peso inicial (dia 0).

Figura 31. Ausência de efeito da indometacina sobre a perda de peso corporal em ratos SD durante o curso temporal da AIA. A figura apresenta a variação do peso corpóreo dos grupos AIA e AIA + indometacina durante o curso experimental da artrite. Os dados foram expressos como a média $\pm$ EPM para $n=8$ animais.

4.9.3 Efeito da Indometacina sobre o influxo de células

O esquema terapêutico diário com a indometacina, durante o curso temporal da AIA em ratos SD, inibiu marcadamente o influxo de células totais no fluido sinovial dos ratos, comparado ao grupo controle AIA (Figura 32A). Da mesma forma, o tratamento reduziu significativamente a atividade da MPO no fluido sinovial de ratos artríticos em relação aos ratos AIA controle (Figura 32B).

Figura 32. Efeito da indometacina sobre o influxo articular de leucócitos totais e aumento da atividade da MPO na AIA em ratos SD. No painel A e B, as barras abertas mostram o influxo de células e o aumento da atividade da MPO em ratos SD com AIA após quatro dias. Já as barras preenchidas, nos painéis A e B, ilustram a redução desses efeitos mediante tratamento com indometacina. Os dados estão representados como média $\pm$ EPM para $n = 4-8$ animais. ** $P < 0,01$ vs AIA.

4.9.4 Efeito da Indometacina sobre o aumento da concentração de citocinas no fluido sinovial de ratos SD com AIA

O tratamento com a indometacina não reduziu a concentração de IL-1 β detectada no fluido sinovial de ratos com AIA após 6 horas da indução (Figura 33A). Curiosamente, esse tratamento contribuiu para aumentar, de forma significativa ($P<0,05$), a concentração de IL-6 no lavado sinovial desses animais em relação ao grupo controle AIA (Figura 33B).

Figura 33. O tratamento com indometacina não reduz a concentração de citocinas no fluido sinovial após 6 horas da AIA. O painel A e B ilustram as concentrações de IL-1 β e IL-6, respectivamente, para os grupos AIA controle (barras abertas) e AIA com indometacina (barras hachuradas). Os dados estão representados como média $\pm$ EPM para $n=3$ animais. * $P<0.05$ vs AIA.

4.9.5 Efeito do tratamento com indometacina sobre os níveis de IgG no plasma e no fluido sinovial de ratos com AIA

No quarto dia pós-indução da AIA, a concentração de IgG anti Met-BSA no plasma de ratos SD tratados com indometacina não foi diferente do grupo AIA controle (Figura 34A). Da mesma forma, os níveis de IgG no fluido sinovial das articulações IPSI (ou CONTRA) do grupo AIA tratado com indometacina não foi diferente dos valores obtidos no grupo AIA controle (Figura 34B).

Figura 34. Efeito do tratamento com indometacina na produção de IgG anti Met-BSA no plasma e no fluido sinovial de ratos SD após 4 dias da indução da AIA. O painel A ilustra os níveis de IgG anti Met-BSA no plasma dos grupos naïve, sham, AIA e AIA com indometacina. O painel B mostra os níveis de IgG no fluido sinovial desses mesmos grupos. Os dados estão representados como média $\pm$ EPM para $n = 3$ animais.

5 DISCUSSÃO

A artrite reumatóide (AR) representa uma das doenças inflamatórias crônicas de grande prevalência, com impacto social e econômico bastante elevado (Felts e Yelin, 1989; Walsh, *et al.*, 2005). Seu tratamento consiste na combinação de um ou mais fármacos do arsenal terapêutico (Ex.: AINEs, AIES, DMARDs, agentes biológicos ou alternativos como a glucosamina e condroitina), embora nem sempre a conduta clínica aplicada funciona para todos os pacientes (Doan e Massarotti, 2005; Gaffo, *et al.*, 2006; Fan e Leong, 2007). Somado a isso, o preço elevado de novas terapias farmacológicas mais efetivas pode constituir um fator limitante para o tratamento, visto que tanto o paciente quanto o serviço público de saúde, principalmente em países em desenvolvimento, pode sucumbir devido ao alto custo dos mesmos e do longo período de tratamento (Felts e Yelin, 1989; Kvien, *et al.*, 2006). Diante disto, a busca constante de novas terapias efetivas ou alternativas e com custos mais realistas, aumentou bastante nesta última década (Kroesen, *et al.*, 2003; Fleischmann, *et al.*, 2003). Neste sentido, a pesquisa, experimental é de extrema importância, principalmente, para melhor compreensão de mecanismos fisiopatológicos e de ação de novos fármacos.

O enfoque primário deste trabalho consistiu em investigar o possível efeito antiinflamatório da hemopressina, um peptídeo conhecido por seu efeito antinociceptivo (Dale, *et al.*, 2005), gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Emer Suavinho Ferro (Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, ICB-USP), no modelo de AIA em ratos. Além disso, a participação de componentes neurogênicos, por meio da depleção das fibras C pela capsaicina e bloqueio do receptor para SP, foi investigada neste modelo de artrite experimental.

Dentre os vários modelos experimentais de artrite, este estudo utilizou o modelo de AIA, pois compartilha muitas das características da AR em humanos, tais como hiperplasia da membrana sinovial, infiltrado inflamatório na articulação e destruição da cartilagem articular (Bräuer, *et al.*, 1994). A utilização de modelos animais fornecem dados de mecanismos que desencadeiam a doença, o que normalmente não é possível identificar no curso da AR em humanos. Por este

motivo e em virtude da gravidade dos sinais promovidos pela AIA, avaliou-se somente a fase aguda desse modelo.

Além de diferentes modelos, muitas espécies animais e suas diferentes linhagens são utilizadas. Apesar da variedade de espécies e linhagens animais compatíveis com os modelos de artrite, a literatura mostra dados discrepantes em relação à sensibilidade desses animais à artrite e outras doenças de etiologia imunológica. No entanto, não foram encontrados dados sobre a susceptibilidade de linhagens de ratos ao modelo de AIA, embora muitas linhagens diferentes sejam utilizadas. Diante disso, previamente à avaliação farmacológica dos agentes testes em estudo, foi realizada a caracterização do modelo de AIA em de duas linhagens de ratos, Wistar e SD. Tais linhagens foram escolhidas por apresentarem vantagens, como a facilidade da indução da doença e a análise dos parâmetros da mesma, associada à maior comodidade na obtenção e acondicionamento desses animais.

Assim, ao investigar os múltiplos aspectos clínicos da AIA, avaliou-se comparativamente a intensidade de alguns sinais inflamatórios clássicos da artrite em ambas as linhagens, incluindo a perda de peso, formação de edema articular (joelho injetado), dor, influxo de células inflamatórias (PMN) para a cavidade articular, presença de citocinas no fluido sinovial e aumento dos níveis séricos e no fluido sinovial de IgG.

A indução da AIA nos animais baseou-se na injeção de Met-BSA (Brackertz, *et al.*, 1972), cujo início da doença se dá logo no primeiro dia após a injeção desse antígeno. Dentre os primeiros sinais da instalação da doença, a perda de peso corporal representa um fator preponderante, pois sugere a falta de apetite como resultado do desconforto do animal ao processo inflamatório e doloroso que se instala (Menetrey, *et al.*, 1982; Banik, *et al.*, 2002).

Verificou-se que tanto os ratos Wistar quanto SD ganharam menos peso após a indução da AIA, quando comparados aos respectivos grupos sham. Tal efeito foi mais evidente a partir do segundo dia. Na linhagem SD o impacto da doença sobre o peso corpóreo foi mais severo, pois além desses animais não ganharem peso ao longo do curso avaliado da doença, eles também apresentaram perda de peso, quando comparado ao peso inicial. Este resultado indica que a linhagem SD, mais do que Wistar, apresentou maior susceptibilidade à perda de peso corpóreo frente à instalação da AIA.

A dor incapacitante (dor em repouso exacerbada por movimentos) é freqüentemente observada nas doenças articulares de origem inflamatória ou não (Schaible, *et al.*, 2002). Reforçando esse conceito, von Banchet e colaboradores (2000) observaram que o comportamento da guarda da pata do joelho inflamado instala-se nas primeiras quatro semanas pós-indução da AIA, sendo este efeito mais evidente nas duas primeiras semanas. Ao avaliar tal comportamento em nosso estudo, observou-se que logo após 24h da indução da AIA, tanto os ratos Wistar quanto SD apresentaram escores nociceptivos crescentes em relação ao grupo sham, os quais foram classificados como 0 (locomução normal), 1 (distúrbio leve na locomoção), 2 (guarda intermitentemente da pata IPSI) e 3 (guarda definitiva da pata IPSI) (Otsuki, *et al.*, 1986; Kissin, *et al.*, 2005). O aumento desse escores apresentou um perfil tempo-dependente, mas não estatisticamente diferente entre as linhagens.

Os escores exibidos por ambas linhagens corroboram os resultados de outro teste nociceptivo deste estudo (*footprint*), que registra as pegadas de patas traseiras desses animais, no sentido de ilustrar possíveis alterações na locomoção decorrentes da inflamação articular. Tanto os ratos Wistar quanto SD apresentaram redução da distância entre as pegadas das patas IPSI, e em alguns casos falhas na impressão da pata traseira IPSI, indicando a guarda definitiva da pata. Com base nos resultados, sugere-se que os testes comportamentais aplicados neste estudo refletem sinais clínicos comuns de desconforto na articulação com artrite (dor) dos animais. Diante destes resultados, conclui-se que ambas as linhagens são apropriadas para o estudo da dor na AIA, pois exibiram padrões nociceptivos semelhantes.

Estabelecido que o presente modelo de artrite promove as mesmas respostas já estabelecidas em outros estudos, tais como perda de peso e alterações comportamentais compatíveis com o sintoma de dor incapacitante, investigou-se a seguir se esse sintoma estaria associado ao edema nas articulações, considerado um dos sinais mais característicos da artrite em humanos. Os resultados obtidos revelam que a injeção i.art. do antígeno no joelho IPSI de ratos Wistar e SD foi capaz de promover, após 24h, edema articular potente, que se estendeu ao longo dos quatro dias. Em relação ao efeito entre as linhagens, nota-se que a instalação do edema em ratos Wistar, após 24h, foi menor do que na linhagem SD. Porém, a avaliação do edema nos dias subseqüentes não mostrou diferença significativa na progressão dessa resposta entre as linhagens, que atingiu um platô no terceiro dia.

As análises das AUC do edema nos joelhos de ambos os grupos indicam que, pelo menos neste modelo de AIA, não existe diferença significativa sobre o edema articular nessas linhagens. Nem os ratos Wistar e nem os SD apresentaram alterações no diâmetro do joelho CONTRA, confirmando que a AIA constitui um modelo de monoartrite (Cooke, *et al.*, 1972).

O componente celular da reação inflamatória aguda é representado, primordialmente, pelo influxo inicial de leucócitos PMN e, posteriormente, das células mononucleares (MN) em direção ao foco da lesão. Esse processo obedece a um gradiente de concentração de mediadores inflamatórios e, finalmente, observa-se o acúmulo dos PMN no foco da lesão. Curiosamente, evidências recentes sugerem que em determinadas condições inflamatórias, as células MN chegam juntamente com os PMN no local da lesão (Henderson, *et al.*, 2003; Costa, *et al.*, 2006). No evento da artrite, é comum que as articulações comprometidas apresentem um infiltrado celular na sinóvia, constituído de células T CD4 e CD8, células B, linfoblastos, plasmócitos, macrófagos e neutrófilos (Müller-Ladner, *et al.*, 2004).

Em continuidade ao presente estudo, verificou-se que a contagem de células no fluido sinovial bem como a avaliação histopatológica das articulações dos ratos Wistar e SD revelou um influxo significativo de células inflamatórias, formada principalmente por neutrófilos, após 6h e 4 dias da indução da AIA. O aumento da atividade da enzima MPO no lavado da articulação desses animais vai ao encontro do resultado anterior, sugerindo o influxo primordial de neutrófilos. Tal achado reflete outra característica importante do processo inflamatório articular, a qual valida o modelo experimental empregado e está de acordo com outros estudos da literatura (Bräuer, *et al.*, 1994; von Banchet, *et al.*, 2000). Por outro lado, é importante ressaltar que tanto a atividade da MPO quanto a migração de leucócitos na cavidade articular da linhagem SD foi substancialmente maior do que em ratos Wistar, indicando que essa última apresenta, frente ao antígeno em estudo, maior resistência à migração de células. Essa maior resistência da linhagem Wistar foi também observada na artrite induzida por CFA em relação ao rato Lewis (Banik, *et al.*, 2002). Ainda, não é novidade que a diferença de linhagens é condição básica para o desenvolvimento de determinadas doenças em espécies animais, incluindo aquelas de natureza autoimune como, por exemplo, a encefalomielite (Bergsteinsdottir, *et al.*, 2000; Gold, *et al.*, 2000; Tonelli, *et al.*, 2001.).

Desta forma, embora o motivo da discrepância da resposta celular entre essas linhagens esteja claro, dados da literatura sugerem a diferença de respostas biológicas está relacionada ao estado de ativação funcional de células inflamatórias durante a resposta imune inata (Andersson, *et al.*, 2004), a qual parece ser crucial para promover maior resistência ou susceptibilidade na indução e perpetuação da resposta imunológica. Além disto, acredita-se que a variação dos níveis séricos de anticorpos IgM e IgG podem influenciar no grau de severidade da artrite entre diferentes linhagens (Claque, *et al.*, 1980).

A produção de anticorpos contra antígenos próprios ou exógenos é uma característica marcante na AR e pode ser responsável pelo início e pela perpetuação dos processos inflamatórios desta doença (Chaiamnuay, *et al.*, 2005). Um dos fatores de ativação de neutrófilos mais importantes na AR parece ser imunocomplexos contendo IgG (Robinson, *et al.*, Cross, *et al.*, 2005). Sendo o modelo de AIA desencadeado pela deposição de imunocomplexos e conseqüente ativação do complemento, que resulta na inflamação aguda (Brauer, *et al.*, 1988; Inata, *et al.*, 1997), é provável que a produção de anticorpos nesse modelo experimental seja um fator importante na determinação das diferenças no influxo de células para a cavidade articular de ambas as linhagens em estudo.

Contudo, a análise comparativa dos níveis séricos e no fluido sinovial do anticorpo IgG anti-met-BSA mostrou valores elevados semelhantes para ambas linhagens, quando comparados aos respectivos ratos *naïve*. Conseqüentemente, este resultado exclui a possibilidade de que diferenças entre a produção de anticorpos seja o fator crucial para promover maior influxo de leucócitos na cavidade articular de ratos SD.

Outros autores sugerem que a sensibilidade imunológica entre as diferentes linhagens está associada à produção de fatores endógenos, incluindo mediadores pró-inflamatórios, ou maior expressão de células inflamatórias como mastócitos e macrófagos (Andersson, *et al.*, 2004; Hershko, *et al.*, 2004). Além disso, sabe-se que os aspectos celular, bioquímico e molecular responsáveis pelo acúmulo de leucócitos no foco inflamatório é um fenômeno complexo, que depende da interação leucócito-endotélio, moléculas de adesão e geração local de mediadores químicos como as citocinas. Essas substâncias também apresentam papel relevante na ativação celular, proliferação, diferenciação celular, adesão, migração e síntese de proteínas da fase aguda. Estudos clínicos e experimentais apontam as citocinas

como alvo em doenças crônicas, como a AR e doenças pulmonares obstrutivas crônicas (Chung, 2006; Scrivo, *et al.*, 2007). Outros mostram que o TNF- α , além de recrutar leucócitos no foco da inflamação, aumenta a aderência de neutrófilos e monócitos à matriz celular, estimula a proliferação de fibroblastos e a produção de outras citocinas inflamatórias (Toussiot, *et al.*, 2007).

Acredita-se que uma rede complexa de citocinas está envolvida na AR e em outros processos inflamatórios experimentais (Boe, *et al.*, 1999; Pohlers, *et al.*, 2005). Dentre as citocinas envolvidas nas reações inflamatórias crônica, o TNF- α , IL-1 β e IL-6 parecem exercer um papel de destaque, pois altas concentrações dessas substâncias foram encontradas no fluido sinovial de pacientes com AR (Ulfgren, *et al.*, 2000; Matsumoto, *et al.*, 2006) e em animais com artrite experimental (van de Loo, *et al.*, 1995; Boe, *et al.*, 1999; van den Berg, *et al.*, 1999; Gabay, *et al.*, 2001).

Conforme estabelecido, a AIA, baseada na pré-imunização com uma proteína exógena, envolve a ativação de células T e anticorpos (van den Berg, *et al.*, 2001). O processo inicial é dependente da produção de TNF- α e IL-1 β (Wooley, *et al.*, 1993, van de Loo, *et al.*, 1995). Ainda, a IL-6 parece ser indispensável para o estabelecimento da AIA, uma vez que camundongos nocautes dessa citocina não desenvolveram a doença (Boe, *et al.*, 1999).

Neste estudo, a quantificação dessas citocinas no fluido sinovial de ratos SD e Wistar revelou um marcado aumento da geração de IL-1 β , após 6h ou quatro dias da indução. É importante ressaltar que, neste caso, a concentração de IL-1 β no quarto dia da indução da doença foi significativamente maior na linhagem SD do que Wistar. Nessa mesma linhagem, mas não na Wistar, foi possível detectar concentrações de IL-6, muito embora essa resposta não mostrou diferença significativa em relação ao grupo sham. Diante destes achados, é possível sugerir que a maior neutrofilia observada na articulação de ratos SD artríticos é, em grande parte, decorrente da gênese aumentada da IL-1 β e, em menor proporção, da IL-6. De fato, a IL-1 β está envolvida no recrutamento de leucócitos e no processo de destruição do tecido ósseo e cartilaginoso na AR (Burger, *et al.*, 2006). Há sugestões que a IL-6 também participa na regulação da resposta mediada por células B e T, além de ativar e recrutar neutrófilos (Hirano, *et al.*, 1990; Romano, *et al.*, 1997; Boe, *et al.*, 1999).

Curiosamente, níveis detectáveis da citocina TNF- α não foram observados fluido sinovial dos animais com AIA, muito embora esteja estabelecido que essa citocina juntamente com a IL-1 β , são importantes na patogênese da artrite (Nissler, *et al.*, 2004; Pohlers, *et al.*, 2005). De fato, a terapia biológica atual baseia-se em substâncias biológicas anti-IL1 e TNF. A sugestão de que a detecção de TNF- α , ao contrário de IL-1 β , é mais difícil no fluido e em tecidos sinoviais corrobora nossos resultados (Van Den Berg, *et al.*, 2000). Desta forma, a participação do TNF- α neste estudo não pode ser totalmente descartada, visto que a análise da mesma foi somente feita em dois intervalos durante os quatro dias de avaliação da doença. Além disto, outras evidências mostram que ocorre predominância de algumas citocinas em diferentes modelos experimentais de inflamação (Van Den Berg, *et al.*, 2005). O TNF- α , por exemplo, mostrou-se o principal candidato na indução do edema e influxo celular durante a fase aguda de artrite experimental. A IL-1 β parece ser igualmente crucial em modelos imunológicos, como na artrite induzida por imunocomplexos ou mediada por células T. No conjunto, tais observações indicam que diferentes citocinas podem ser mais ou menos importantes em determinadas condições experimentais, assim como em casos clínicos onde o tratamento com agentes biológicos apresenta resultados distintos em pacientes.

Em suma, os resultados sobre a gênese dessas citocinas na cavidade articular IPSI neste modelo de AIA indicam que, durante os períodos avaliados, os ratos SD apresentaram maior predisposição quando comparado aos ratos Wistar. Contudo, em ambas as linhagens, não foram observados níveis detectáveis do TNF- α .

Estabelecido que a AIA em ratos produz sinais clínicos compatíveis à AR em humanos, mas que a linhagem SD apresenta maior sensibilidade com relação ao influxo de células inflamatórias, perda de peso corpóreo e gênese de citocinas, investigou-se a seguir a influência do tratamento farmacológico com o peptídeo hemopressina sobre os sinais inflamatórios da AIA em ratos SD.

A importância de peptídeos endógenos na modulação da dor e inflamação é bem conhecida. O fragmento α da hemoglobina serve como precursor endógeno para uma série de peptídeos com atividade opióide, denominados hemorfinas (Ivanov, *et al.*, 1997; Lantz, *et al.*, 1999). Mais recentemente, Dale e colaboradores (2005) demonstraram que a hemopressina inibe a hiperalgesia periférica induzida

por carragenina e bradixinina em ratos (Dale, *et al.*, 2005). Com base neste conhecimento prévio, investigou-se aqui a capacidade desta substância em inibir a atividade inflamatória e nociceptiva da AIA em ratos SD. Por outro lado, diferente das hemorfinas, esses mesmos autores observaram que o efeito anti-nociceptivo da hemopressina não é dependente de mecanismos opioidérgicos.

Utilizando as mesmas doses e vias descritas previamente (Dale, *et al.*, 2005), os resultados do presente estudo mostram que a injeção i.art. diária desse composto nos animais artríticos, tanto na dose de 10 µg quanto 20 µg por cavidade, foi capaz de reduzir, de forma significativa, o edema no joelho e a dor. Estes dados indicam que a hemopressina possui, além da atividade analgésica, ação anti-edematogênica. Ao contrário deste achado, Dale e colaboradores (2005) não observaram o mesmo efeito inibitório sobre o edema induzido pela carragenina. Com base na literatura atual, esta é a primeira vez que tais atividades para hemopressina foram reportadas na AIA.

Em continuidade ao presente estudo, averiguou-se que o tratamento com a maior dose da hemopressina não exerceu, em geral, um efeito inibitório sobre os sinais da AIA estatisticamente superior à menor dose, muito embora evidenciou-se uma melhora no perfil de deambulação (*footprint*) desses animais. Tais achados estão de acordo com aqueles descritos anteriormente na hiperalgesia induzida pela carragenina (Dale, *et al.*, 2005; 2006) e confirmam um papel relevante para esse peptídeo na redução da dor e, agora, sobre o edema.

Curiosamente, verificou-se ainda que o tratamento com a hemopressina, em especial na maior dose, resultou numa surpreendente perda de peso nos animais durante a evolução da doença. Neste caso, não se sabe ao certo se os animais reduziram a ingestão de alimento ou se o metabolismo dos mesmos foi acelerado por essa substância. Por outro lado, a análise histopatológica do estômago de animais tratados com hemopressina não revelou lesões ou quaisquer alterações morfológicas quando comparadas ao estômago de ratos controle. Assim, em virtude do desconhecimento do mecanismo pelo qual esse efeito ocorre, a menor dose de hemopressina foi empregada para os estudos subseqüentes.

Em continuidade ao estudo do papel da hemopressina sobre a AIA foi observado, assim como na inibição do edema e dor, que a hemopressina causou potente redução do influxo de células inflamatórias e da atividade da MPO no lavado sinovial dos animais, indicando assim um novo papel para esse peptídeo na

supressão do influxo de leucócitos PMN na AIA. Este efeito fica bem evidente na análise histopatológica, a qual mostra a redução do infiltrado inflamatório na articulação dos animais desse grupo experimental. Contudo, tal resultado é intrigante considerando que a hemopressina não interferiu na inibição da produção de citocinas e anticorpos. Desta forma, exclui-se a possibilidade de que a ação antiinflamatória desse peptídeo depende da supressão da produção dessas substâncias.

Evidências mais recentes mostram que além da ação opióide, as hemorfinas inibem a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA). Isto sugere um possível papel desses peptídeos na regulação da pressão sanguínea (Lantz, *et al.*, 1991; Zhao, *et al.*, 1994). É interessante mencionar que, assim como as hemorfinas, a hemopressina apresentou ação hipotensora em ratos (Rioli, *et al.*, 2003), que foi posteriormente confirmada em coelhos e camundongos (Blais, *et al.*, 2005). De acordo com Lipton e colaboradores (2006), a ação hipotensora da hemopressina depende da biossíntese do NO, visto que o inibidor da síntese de NO reverteu esse efeito. Sabendo que o NO também está envolvido nos processos patológicos da artrite (Cruzzocrea, 2006), uma hipótese interessante seria que a hemopressina pode regular a biossíntese dessa molécula na vascularização do joelho, contribuindo assim para seu efeito antiinflamatório. No entanto, esta hipótese precisa de futuras investigações que não foram incluídas no presente estudo.

É importante mencionar que, de acordo com recente estudo (Dale, *et al.*, 2006), a hemopressina ainda apresenta efeito analgésico quando administrada por via oral, o que é surpreendente, pois por se tratar de um peptídeo, esse é rapidamente degradado por enzimas no trato gastrointestinal. No entanto, acredita-se que fragmentos deste peptídeo exerçam algumas funções biológicas do peptídeo íntegro. Esta é uma propriedade intrigante, mas interessante para o desenvolvimento de ensaios clínicos com este peptídeo no futuro. De forma semelhante, observou-se neste estudo que a hemopressina, utilizada na mesma dose que o estudo anterior, promoveu redução significativa do edema e da dor; entretanto, em menor proporção que o tratamento local. No conjunto, estes dados atuais com a hemopressina permitem sugerir que esse peptídeo possui atividade analgésica e antiinflamatória importante sobre alguns sinais clássicos (ex. edema, influxo de células,) da AIA experimental, tanto administrado localmente quanto por via oral.

A seguir, considerando que a hiperalgesia induzida pela carragenina ou bradicinina em ratos foi marcadamente inibida pela hemopressina e que este modelo hiperalgésico possui um componente neurogênico periférico bem como um mecanismo de sensibilização central, optamos por avaliar a influência das fibras sensoriais e seus principais neuropeptídeos pró-inflamatórios SP e CGRP na modulação da resposta antiinflamatória mediada pela hemopressina.

Como mencionado anteriormente, a inflamação articular pode causar sensibilização periférica e central que contribui para a sintomatologia dolorosa na artrite. Os neuropeptídeos SP e CGRP, expressos em corpos celulares de neurônios ganglionares sensoriais da raiz dorsal, são transportados retrogradamente pelas terminações nervosas do corno dorsal da medula espinal, onde modulam a transmissão de estímulos nociceptivos e o desenvolvimento de hiperalgesia inflamatória através da indução de hiperexcitabilidade neuronal após artrite induzida na articulação do joelho do rato (Neugebauer, *et al.*, 1995; Neugebauer, *et al.*, 1996). Dessa maneira, foi investigado se o efeito analgésico da hemopressina estaria relacionado com alterações de SP e CGRP no corno dorsal da medula espinal.

Utilizando a técnica imunohistoquímica, em animais imunizados com CFA, mas injetados com salina na articulação (*sham*), foi observado que a SP- e CGRP-ir estava presente preferencialmente nas lâminas superficiais (I e II) do corno dorsal da medula espinal, como descrito previamente (Mapp, *et al.*, 1993). Quatro dias após a AIA, observamos diferenças qualitativas discretas no padrão de distribuição da CGRP-ir, com aumento bilateral na densidade, difusão e área marcada. Essas alterações foram mais evidentes no terço médio do corno dorsal, de acordo com dados anteriores (Mapp, *et al.*, 1993; Sluka e Westlund, 1993). Essa região espinal recebe a maior densidade de inervação de projeções centrais de fibras sensoriais primárias que inveram a articulação do joelho (Craig, *et al.*, 1988). Entretanto, através de análise quantitativa, não observamos diferença estatisticamente significativa na densidade de CGRP-ir nas diferentes áreas do corno dorsal analisadas após a AIA. A análise qualitativa e quantitativa do padrão de CGRP-ir demonstrou não haver diferenças entre os grupos AIA após o tratamento com hemopressina ou indometacina.

A análise qualitativa e quantitativa do padrão imunorreativo à SP não revelou qualquer diferença no animal com AIA em relação ao sham ou mediante os referidos tratamentos. Contudo, é importante ressaltar que o próprio processo de imunização

dos animais com CFA pode desencadear alterações no padrão de imunorreatividade espinal desses neuropeptídeos (Mapp *et al.*, 1993). Além do mais, em tempos experimentais iniciais como o adotado no presente estudo, a literatura tem se mostrado bastante controversa. Postula-se que durante o desenvolvimento do processo inflamatório, a liberação desses neuropeptídeos pode ser um processo ativo, porém altamente variável em pequenos intervalos temporais, em detrimento dos níveis de expressão e transporte dos mesmos. Por outro lado, em estudos com análises do padrão de imunorreatividade desses neuropeptídeos em períodos crônicos de diferentes modelos de artrite, a literatura mostra-se mais definida e aponta para um aumento na expressão e liberação dos mesmos (Sluka e Westlund, 1993; Schaible e Grubb, 1993). Dessa maneira, e tendo em vista as limitações da técnica empregada, podemos sugerir que a ação antinociceptiva da hemopressina não seja mediada de maneira direta através de alterações na sinalização desses neuropeptídeos no corno dorsal da medula espinal.

Em continuidade à investigação do possível envolvimento de mecanismos neurovasculares na ação antiinflamatória da hemopressina, avaliamos inicialmente o papel dos neuropeptídeos em alguns parâmetros inflamatórios da AIA em ratos Wistar.

De longa data sabe-se que o tratamento de ratos neonatos com a capsaicina causa depleção de neuropeptídeos devido a degeneração dos neurônios aferentes sensíveis à capsaicina (NASC; Jancsó, *et al.*, 1967; Costa, *et al.*, 1997). As fibras sensoriais dos NASC inervam densamente os tecidos periféricos, incluindo a membrana sinovial de ratos e humanos (Mapp, *et al.*, 1990; Iwasaki, *et al.*, 1995) e, com isto, participam da transmissão nociceptiva. De fato, uma literatura vasta mostra o envolvimento de componentes neurogênicos em processos inflamatórios agudos induzidos por diferentes estímulos químicos e físicos (Costa, *et al.*, 1997; Cão, *et al.*, 2000; Niisalo, 2002; Sawynok, 2003; Keeble, *et al.*, 2005; Grant, *et al.*, 2005; Costa, *et al.*, 2006). Contudo, o envolvimento desses componentes em doenças articulares é controverso. Por exemplo, Colpaert e colaboradores (1989) mostram que o tratamento com capsaicina reduziu de maneira significativa o edema articular e a perda de peso em ratos submetidos à artrite com adjuvante. Outras evidências do papel protetor das fibras sensoriais e seus neuropeptídeos (ex.: SP) sobre a artrite em modelo animal foram comprovados por exames radiográficos (Levine *et al.*, 1987). No entanto, outros achados (Hara, *et al.*, 1984; Cervero, *et al.*, 1987) não

confirmam o mesmo efeito no modelo de AIA. Em suporte aos achados experimentais, evidências clínicas mostram que níveis elevados de SP foram encontrados nas articulações de pacientes com AR (Larsson, *et al.*, 1991; O'Connor, *et al.*, 2004).

Neste estudo, ao contrário do que mostram as evidências experimentais descritas na literatura acima, a depleção de neuropeptídeos pelo tratamento com capsaicina em ratos neonatos Wistar não interferiu significativamente nas respostas inflamatórias induzida pela AIA (edema, influxo celular, perda de peso e teste nociceptivo). Diante destas evidências, conclui-se que, ao contrário da inflamação aguda, os neuropeptídeos não apresentam um papel relevante na AIA e também não regulam o efeito protetor observado pela hemopressina. É provável que as discrepâncias encontradas entre este e os demais estudos de artrite possam ser explicados pelas diferenças metodológicas, linhagens animais e tipos de antígenos (McQueen, 1999). Além disso, alguns tipos de fibras são resistentes ao efeito da capsaicina e, dessa forma, poderiam continuar íntegras e liberando mediadores mesmo após o tratamento com esse irritante (McQuenn, *et al.*, 1999; Kontinen, *et al.*, 2006).

O tratamento neonatal com capsaicina destrói seletivamente as fibras C e, conseqüentemente, possui o poder de reduzir o conteúdo de neuropeptídeos pró-inflamatórios como é o caso da SP e CGRP. Segundo Levine e colaboradores (1984), o tratamento de ratos neonatos com capsaicina, depleta apenas uma classe de fibras nervosas (fibras C) responsáveis pelo componente neurogênico na inflamação articular induzida no modelo de artrite experimental induzido pelo adjuvante. Acredita-se que a perda de fibras C na articulação pelo tratamento com capsaicina nem sempre modula a resposta hiperalgésica ou pode está relacionada à presença de SP na articulação. Isto é possível porque, mesmo em menor quantidade, as fibras remanescentes podem aumentar a produção desse peptídeo no local (McQueen, 1999). Assim, ao contrário do que se afirmava anteriormente (Jancsó, *et al.*, 1967), o tratamento químico com capsaicina em animais neonatos não depleta estoques de neuropeptídeos, pois segundo Gamse e colaboradores (1983), apenas 76% do conteúdo de SP foi depletado na pele de animais tratados com capsaicina, quando neonatos (Gamse, *et al.*, 1980). Além disso, sabe-se atualmente que outras fontes não neuronais (ex. células inflamatórias como macrófagos, eosinófilos, células dendríticas, queratinócitos) produzem e estocam a

SP. Desta forma, a participação desse mediador em processos inflamatórios não pode ser excluída pelo simples tratamento com capsaicina (Levine, 1986; Mapp, *et al.*, 1990; Rawlingson, *et al.*, 2004). Conseqüentemente, neste modelo, a exclusão definitiva desse mediador somente foi confirmada mediante o tratamento farmacológico com antagonistas específicos.

Corroborando os achados com capsaicina, observou-se aqui que o tratamento dos animais com o SR140333, antagonista do receptor NK₁ para SP, não inibiu os parâmetros inflamatórios (edema, dor e influxo de células no fluido sinovial) provocados pela AIA. Apesar de alguns estudos terem demonstrado a participação da SP na artrite (von Banchet, *et al.*, 2000), as nossas evidências indicam que este não é o caso no modelo de AIA utilizado. Vale ressaltar que de acordo com Marshall e colaboradores (1997), a depleção de SP e CGRP causada pelo tratamento com capsaicina não ocasionou melhora na inflamação. Estes dados suportam os resultados obtidos neste estudo, e nos leva a reafirmar que o modelo experimental empregado não apresenta a participação da sinalização aferente taquicininérgica.

Por fim, tendo em mente que os AINES (ex. aspirina e outros mais seletivos para COX-2) estão entre os fármacos mais utilizados para o alívio dos sinais inflamatórios e retardamento da progressão da artrite (Scott, *et al.*, 1998; Dannhardt, *et al.*, 2000; Gaffo *et al.*, 2006), este estudo foi utilizado como um controle positivo. A indometacina é, assim como a histórica aspirina descrita há mais de cem anos, um inibidor não seletivo da COX (Vane, 1971; Ferreira, *et al.*, 1971). Essa enzima oxida lipídios presentes nas membranas das células (ácido araquidônico; AA), dando origem aos mediadores endógenos, conhecidos como eicosanóides (p. ex. PGs). Em condições inflamatórias, alguns desses mediadores exercem papel importante como vasodilatação e aumento de permeabilidade vascular. Além disso, as PGs sensibilizam nociceptores periféricos, contribuindo para a sintomatologia dolorosa em doenças inflamatórias (Dannhardt, *et al.*, 2000).

Há, aproximadamente, 7 anos atrás, foi estabelecida a existência de duas isoformas da COX, COX1 e COX2 (Weinberg, 2000; Spektor e Fuster, 2005). A COX1, presente em quase todos os tecidos é responsável pela produção de prostanóides, os quais dentre outras funções protegem o estômago e o rim contra lesões. A COX2 é induzida mediante estímulos inflamatórios (ex. citocinas) ou em resposta a lesões teciduais e infecções. É descrito que a geração de prostanóides resultante da ação da COX2 sobre o AA contribui para a progressão da AR por

interferir na expressão de genes de moléculas pró-inflamatórias e receptores envolvidos em diversas respostas celulares (Martel-Pelletier, *et al.*, 2003)

Conforme esperado, o tratamento diário com indometacina em ratos SD com AIA resultou em inibição significativa da resposta edematogênica no joelho desses animais em relação ao grupo não tratado. Embora o tratamento tenha resultado somente em redução parcial dos escores (resposta nociceptiva), este efeito foi estatisticamente diferente do controle, a partir do segundo dia. A inibição do influxo de células na articulação dos animais com AIA pela indometacina é indicativo que a inibição da COX apresenta um papel importante na migração de leucócitos para a cavidade sinovial neste modelo de AIA. Várias evidências mostram que a redução da resposta inflamatória e nociceptiva pelo bloqueio da COX é mediada por múltiplos fatores, incluindo a inibição da produção de PGs (Turini, *et al.*, 2002; Martel-Pelletier, *et al.*, 2003), redução da expressão de múltiplos fatores genéticos, tais como aqueles relacionados com a síntese de quimiocinas, moléculas de adesão, enzimas e receptores (Kagoshima, *et al.*, 2003), os quais são regulados pelos fatores de transcrição genética como o fator nuclear kappa B (NF- κ B). Ainda, a indometacina inibe a proliferação de células T e a produção de IgG-antígeno específica (Seng, *et al.*, 1990; Jaramilo, *et al.*, 1992; Yamaki, *et al.* 2003).

Embora a eficácia do efeito antiinflamatório dos fármacos AINES seja comprovada no tratamento da artrite há várias décadas, os efeitos adversos associados a esse tratamento são também bastante conhecidos, principalmente os danos causados no estômago (Brooks e Day, 1991; Radi *et al.*, 2006). Análises histológicas semi-quantitativas feitas no estômago dos animais tratados com indometacina, durante 4 dias, evidenciaram um processo inflamatório.

Em suma, foi possível observar que a hemopressina compartilha muitas das propriedades antiinflamatórias da indometacina sobre o modelo de AIA. Isto nos leva a sugerir que este peptídeo pode constituir uma terapia promissora para doenças inflamatórias e dolorosas como a AR. No entanto, muito pouco se sabe sobre seus mecanismos de ação e efeitos adversos. Diante disso, futuras investigações *in vivo* e *in vitro* são necessárias para melhor compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos.

6 CONCLUSÕES

1. À semelhança dos sinais clínicos observados na AR em humanos, a AIA em ratos resultou em potente edema, dor, perda de peso corpóreo, imunorreatividade aumentada à CGRP nas lâminas I e II, gênese aumentada de IL1 β e IL-6 no fluido sinovial e IgG sérica e no fluido, influxo de leucócitos no fluido sinovial bem como alterações morfológicas na articulação injetada, caracterizada por dano tecidual na membrana sinovial, denso infiltrado de neutrófilos, invasão do espaço articular por tecido hiperplasiado e desorganização de lâmina íntima;
2. À exceção da magnitude da perda de peso corpóreo, influxo celular e gênese de citocinas na articulação IPSI de ratos SD, os demais sinais inflamatórios foram equipotentes para a linhagem Wistar, sugerindo uma susceptibilidade discretamente aumentada para a linhagem SD;
3. Pela primeira vez, demonstrou-se que o peptídeo hemopressina causa redução significativa de vários parâmetros inflamatórios da AIA, excetuando a produção de IgG e citocinas e perda de peso corpóreo, indicando que o mecanismo inibitório desse peptídeo é independente da geração de citocinas ou anticorpo.
4. Em conclusão, o efeito antiinflamatório da hemopressina na AIA não depende de componentes neurogênicos, pois essa não reduziu a imunorreatividade para CGRP nas lâminas I e II, e nem o tratamento com capsaicina (ou com antagonista de SP) reverteu os sinais inflamatórios da doença. No conjunto, estes resultados levam à sugestão de que a hemopressina poderá se constituir em uma nova ferramenta farmacológica importante no tratamento de doenças reumáticas, como a AR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ajuebor MN, Singh A, Wallace JL. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin D(2) is an early anti-inflammatory signal in experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000 Jul;279(1):G238-44.

Alamanos Y, Voulgari PV, Drosos AA. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum*. 2006 Dec;36(3):182-8.

Andersson A, Kokkola R, Wefer J, Erlandsson-Harris H, Harris RA. Differential macrophage expression of IL-12 and IL-23 upon innate immune activation defines rat autoimmune susceptibility. *J Leukoc Biol*. 2004 Dec;76(6):1118-24.

Azzolina A, Bongiovanni A, Lampiasi N. Substance P induces TNF-alpha and IL-6 production through NF kappa B in peritoneal mast cells. *Biochim Biophys Acta*. 2003; 1643: 75-83.

Banik RK, Kasai M, Mizumura K. Reexamination of the difference in susceptibility to adjuvant-induced arthritis among LEW/Crj, Slc/Wistar/ST and Slc/SD rats. *Exp Anim*. 2002 Apr; 51(2):197-201.

Bensen W. Aim for remission or "personal best" using combination DMARD therapy with methotrexate and hydroxychloroquine. *Clin Exp Rheumatol*. 1999;17(6 suppl 18):S95-101.

Bergsteinsdottir K, Yang HT, Pettersson U, Holmdahl R. Evidence for common autoimmune disease genes controlling onset, severity, and chronicity based on experimental models for multiple sclerosis and rheumatoid arthritis. *J. Immunol*. 2000; 164,1564-1568.

Blais PA, Cote J, Morin J, Larouche A, Gendron G, Fortier A, et al. Hypotensive effects of hemopressin and bradykinin in rabbits, rats and mice. A comparative study. *Peptides* 2005; 26:1317-22.

Boe A, Baiocchi M, Carbonatto M, Papoian R, Serlupi-Crescenzi O. Interleukin 6 knock-out mice are resistant to antigen-induced experimental arthritis. *Cytokine*. 1999 Dec;11(12):1057-64.

Brackertz D, Muller W. Arthritis and liver diseases. *Schweiz Med Wochenschr*. 1972 May 27;102(21):730-2.

Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol*. 1982; 78:206-09.

Brain SD, Cox HM. Neuropeptides and their receptors: innovative science providing novel therapeutic targets. *Br J Pharmacol*. 2006; 147(Suppl 1): S202-11.

Brantl V, Gramsch C, Lottspeich F, Mertz R, Jaeger KH, Herz A. Novel opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins. *Eur J Pharmacol* 1986;125:309–10.

Bräuer R, Kittlick PD, Thoss K, Henzgen S. Different immunological mechanisms contribute to cartilage destruction in antigen-induced arthritis. *Exp Toxicol Pathol*.1994; 46(4-5):383-8.

Bräuer R, Thoss K, Henzgen S, Waldmann G. Significance of cell-mediated and humoral immunity in the acute and chronic phase of antigen-induced arthritis in rabbits. *Exp Pathol*. 1988;34(4):197-208.

Bräuer R, Thoss K, Henzgen S, Waldmann G. Significance of cell-mediated and humoral immunity in the acute and chronic phase of antigen-induced arthritis in rabbits. *Exp Pathol*. 1988;34(4):197-208.

Brooks PM, Day RO. Nonsteroidal antiinflammatory drugs--differences and similarities. *N Engl J Med*. 1991 Jun 13;324(24):1716-25.

Brooks PM. Clinical management of rheumatoid arthritis. *Lancet* 1993; 341: 286-290.

Buchner E, Bräuer R, Schmidt C, Emmrich F, Kinne RW. Induction of flare-up reactions in rat antigen-induced arthritis. *J Autoimmun*. 1995; 8:61-74.

Buckwalter JA, Martin J, Mankin HJ. Synovial joint degeneration and the syndrome of osteoarthritis. *Instr Course Lect*. 2000; 49:481-9.

Burger D, Dayer JM, Palmer G, Gabay C. Is IL-1 a good therapeutic target in the treatment of arthritis? *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2006 Oct;20(5):879-96.

Cai X, Wong YF, Zhou H, Xie Y, Liu ZQ, Jiang ZH, Bian ZX, Xu HX, Liu L. The comparative study of Sprague-Dawley and Lewis rats in adjuvant-induced arthritis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2006 May;373(2):140-7

Cao T, Pinter E, Al-Rashed S, Gerard N, Hoult JR, Brain SD. Neurokinin-1 receptor agonists are involved in mediating neutrophil accumulation in the inflamed, but not normal, cutaneous microvasculature: an in vivo study using neurokinin-1 receptor knockout mice. *J Immunol*. 2000 May 15;164(10):5424-9.

Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 2000;288:306–13.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997 Oct 23;389(6653):816-24.

Cervero F, Plenderleith MB. Spinal cord sensory systems after neonatal capsaicin. *Acta Physiol Hung*. 1987;69(3-4):393-401.

Chaiamnuay S, Bridges SL Jr. The role of B cells and autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Pathophysiology*. 2005 Oct;12(3):203-16.

Choy EH, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2001; 344(12):907-16.

Chung KF. Inflammatory mediators in chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005 Dec;4(6):619-25.

Cooke TD, Jasin HE. The pathogenesis of chronic inflammation in experimental antigen-induced arthritis. I. The role of antigen on the local immune response. *Arthritis Rheum*. 1972 Jul-Aug;15(4):327-37.

Costa SK, De Nucci G, Antunes E, Brain SD. Involvement of vanilloid receptors and purinoceptors in the Phoneutria nigriventer spider venom-induced plasma extravasation in rat skin. *Eur J Pharmacol*. 2000; 391(3):305-15.

Costa SK, de Nucci G, Antunes E, Brain SD. Phoneutria nigriventer spider venom induces oedema in rat skin by activation of capsaicin sensitive sensory nerves. *Eur J Pharmacol*. 1997 Nov 27;339(2-3):223-6.

Costa SK, Yshii LM, Poston RN, Muscara MN, Brain SD. Pivotal role of endogenous tachykinins and the NK1 receptor in mediating leukocyte accumulation, in the absence of oedema formation, in response to TNF α in the cutaneous microvasculature. *J Neuroimmunol*. 2006;171(1-2):99-109.

Craig AD, Heppelmann B, Schaible HG. The projection of the medial and posterior articular nerves of the cat's knee to the spinal cord. *J Comp Neurol*. 1988 Oct 8;276(2):279-88.

Cross A, Bakstad D, Allen JC, Thomas L, Moots RJ, Edwards SW. Neutrophil gene expression in rheumatoid arthritis. *Pathophysiology*. 2005 Oct;12(3):191-202

Cruwys SC, Garrett NE, Kidd BL. Sensory denervation with capsaicin attenuates inflammation and nociception in arthritic rats. *Neurosci Lett*. 1995 193: 205-207.

Cuzzocrea S. Role of nitric oxide and reactive oxygen species in arthritis. *Curr Pharm Des*. 2006;12(27):3551-70.

Dale CS, Pagano Rde L, Rioli V, Hyslop S, Giorgi R, Ferro ES. Antinociceptive action of hemopressin in experimental hyperalgesia. *Peptides* 2005; 26:431-6.

Dale CS, Pagano Rde L, Rioli V, Hyslop S, Giorgi R, Ferro ES. Small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels are implicated in the anti-hyperalgesia induced by hemopressin. *Peptides* 2006. in press

Dannhardt G, Kiefer W. Cyclooxygenase inhibitors--current status and future prospects. *Eur J Med Chem*. 2001 Feb;36(2):109-26.

Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, et al. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*. 2000 ;405:183-7.

De Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol*. 1982;77:634-43.

Decaris E, Guingamp C, Chat M. Evidence for neurogenic transmission inducing degenerative cartilage damage distant from local inflammation. *Arthritis Rheum*. 1999; 42: 1951-1960.

Doan T, Massarotti E. Rheumatoid arthritis: an overview of new and emerging therapies. *J Clin Pharmacol*. 2005; 45(7):751-62.

Dumonde DC, Glynn LE. The production of arthritis in rabbits by an immunological reaction to fibrin. *Br J Exp Pathol*. 1962 Aug;43:373-83.

Egan CG, Lockhart JC, Ferrell WR. Pathophysiology of vascular dysfunction in a rat model of chronic joint inflammation. *J Physiol*. 2004;557:635-43.

Fan PT, Leong KH. The use of biological agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Ann Acad Med Singapore*. 2007 Feb;36(2):128-7

Felts W, Yelin EH. The economic impact of the rheumatic diseases in the United States. *J Rheumatol* 1989; 16: 867-884.

Ferreira SH, Moncada S, Vane JR. Indomethacin and aspirin abolish prostaglandin release from the spleen. *Nat New Biol*. 1971 Jun 23;231(25):237-9.

Firestein GS, Zvaifler NJ. How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis? *Arthritis Rheum*. 1990 Jun;33(6):768-73.

Fleischmann RM, Schechtman J, Bennett R, et al. Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist (r-metHuIL-1ra), in patients with rheumatoid arthritis: a large, international, multicenter, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*. 2003;48:927-934.

Gabay C, Marinova-Mutafchieva L, Williams RO, Gigley JP, Butler DM, Feldmann M, Arend WP. Increased production of intracellular interleukin-1 receptor antagonist type I in the synovium of mice with collagen-induced arthritis: a possible role in the resolution of arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 2001; 44: 451-462.

Gabriel SE. The epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2001 May;27(2):269-81.

Gaffo A, Saag KG, Curtis JR. Treatment of rheumatoid arthritis. *Am J Health Syst Pharm*. 2006 Dec 15;63(24):2451-65.

Gamse R, Heuberger S. Release of neurotensin from rat spinal cord in vitro. *Neurosci Lett*. 1983 Mar 28;36(1):87-91.

Gamse R, Holzer P, Lembeck F. Decrease of substance P in primary afferent neurones and impairment of neurogenic plasma extravasation by capsaicin. *Br J Pharmacol*. 1980 Feb;68(2):207-13.

Geenen R, Godaert GLR, Jacobs JWG. Diminished autonomic nervous system responsiveness in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1996; 23: 258-264.

Gold R, Hartung HP, Toyka KV. Animal models for autoimmune demyelinating disorders of the nervous system. *Mol Med Today*. 2000 Feb;6(2):88-91.

Graham GJ, Stevens JM, Page NM. Tachykinins regulate the function of platelets. *Blood*. 2004; 104: 1058-1065.

Grant AD, Pinter E, Salmon AM, Brain SD. An examination of neurogenic mechanisms involved in mustard oil-induced inflammation in the mouse. *Eur J Pharmacol*. 2005 Jan 10;507(1-3):273-80.

Griffiths RJ. Characterisation and pharmacological sensitivity of antigen arthritis induced by methylated bovine serum albumin in the rat. *Agents Actions*. 1992; 35:88-95.

Hara A, Sakurada T, Sakurada S, Matsumura H, Kisara K. Antinociceptive effects of neonatal capsaicin in rats with adjuvant arthritis. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1984 Jun;326(3):248-53.

Harris ED. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med* 1990; 322: 1277-89.

Henderson AC, Ingenito EP, Atilah H, Israel E, Suki B, Lutchen KR. How does airway inflammation modulate asthmatic airway constriction? An antigen challenge study. *J Appl Physiol.* 2003 Aug;95(2):873-82; discussion 863. Epub 2003 Apr 18.

Heppelmann B, Messlinger K, Neiss WF, Schmidt RF. Ultrastructural three-dimensional reconstruction of group III and group IV sensory nerve endings ("free nerve endings") in the knee joint capsule of the cat: evidence for multiple receptive sites. *J Comp Neurol.* 1990 Feb 1;292(1):103-16.

Hershko AY, Ulmansky R, Moallem E, Naparstek Y. Susceptibility and resistance to experimental adjuvant arthritis. *Front Biosci.* 2004 Sep 1;9:3268-75.

Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T. Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunology Today.* 1990; 11:443-449.

Hood VC, Cruwys SC, Urban L. The neurogenic contribution to synovial leukocyte infiltration and other outcome measures in a guinea pig model of arthritis. *Neurosci Lett.* 2001; 299: 201-204.

Inata S, Yoshino S, Haque MA, Ogata Y, Kohashi O. Clonal anergy is a potent mechanism of oral tolerance in the suppression of acute antigen-induced arthritis in rats by oral administration of the inducing antigen. *Cell Immunol.* 1997 Jan 10;175(1):67-75.

Ivanov VT, Karelin AA, Philippova MM, Nazimov IV, Pletnev VZ. Hemoglobin as a source of endogenous bioactive peptides: the concept of tissue-specific peptide pool. *Biopolymers* 1997;43:171-88.

Iwasaki A, Inoue K, Hukuda S. Distribution of neuropeptide-containing nerve fibers in the synovium and adjacent bone of the rat knee joint. *Clin Exp Rheumatol.* 1995 Mar-Apr;13(2):173-8.

Jancso N, Jancso-Gabor A, Szolcsanyi J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br J Pharmacol Chemother.* 1967 Sep;31(1):138-51.

Jaramillo A, Bhattacharjee P, Sonnenfeld G, Paterson CA. Modulation of immune responses by cyclo-oxygenase inhibitors during intraocular inflammation. 1992; *Curr Eye Res* 11:571-579.

Kagoshima M, Cosio B, Adcock IM. How signaling pathways interact with gene transcription. *Monaldi Arch Chest Dis.* 2003 Jan-Mar;59(1):30-7.

Karelin AA, Blishchenko EYu, Ivanov VT. Fragments of functional proteins: role in endocrine regulation. *Neurochem Res.* 1999 Sep; 24(9):1117-24.

Karelin AA, Philippova MM, Karelina EV, Strizhkov BN, Grishina GA, Nazimov IV, Ivanov VT. Peptides from bovine brain: structure and biological role. *J Pept Sci.* 1998 May;4(3):211-25.

Keane J, Gershon S, Wise RP, et al. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor (alpha)-neutralizing agent. *N Engl J Med*. 2001;345:1098-1104.

Keeble J, Blades M, Pitzalis C, Rocha AIC, Brain SD. The role of substance P in microvascular responses in murine joint inflammation. *Brit J Pharmacol*. 2005; 144: 1059-1066.

Khurana R, Berney SM. Clinical aspects of rheumatoid arthritis. *Pathophysiology*. 2005 Oct; 12(3):153-65.

Kissin EY, Freitas CF, Kissin I. The effects of intraarticular resiniferatoxin in experimental knee-joint arthritis. *Anesth Analg*. 2005 Nov;101(5):1433-9

Kontinen YT, Tiainen VM, Gomez-Barrena E, Hukkanen M, Salo J. Innervation of the joint and role of neuropeptides. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Jun;1069:149-54.

Kremer JM. Methotrexate and emerging therapies. *Rheum Dis Clin North Am*. 1998;24:651-658.

Kroesen S, Widmer AF, Tyndall A, Hasler P. Serious bacterial infections in patients with rheumatoid arthritis under anti-TNF-alpha therapy. *Rheumatology (Oxford)*. 2003;42:617-621.

Kvien TK, Uhlig T, Odegard S, Heiberg MS. Epidemiological Aspects of Rheumatoid Arthritis: The Sex Ratio. *Ann. NY Acad. Sci* 2006; 1069: 212–222.

Lantz I, Glamsta EL, Talback L, Nyberg F. Hemorphins derived from hemoglobin have an inhibitory action on angiotensin converting enzyme activity. *FEBS Lett* 1991;287:39–41.

Larsson J, Ekblom A, Henriksson K, Lundberg T, Theodorsson E. Concentration of substance P, neurokinin A, calcitonin gene-related peptide, neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide in synovial fluid from knee joints in patients suffering from rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*. 1991;20(5):326-35.

Levine JD, Clark R, Devor M. Intraneuronal substance P contributes to the severity of experimental arthritis. *Science*. 1984; 226: 547-548.

Levine JD, Dardick SJ, Roizen MF, Helms C, Basbaum AL. Contribution of sensory afferents and sympathetic efferents to joint injury in experimental arthritis. *J Neurosci*. 1986; 6: 3423-3429.

Levine JD, Goetzl EJ, Basbaum AI. Contribution of the nervous system to the pathophysiology of rheumatoid arthritis and other polyarthritides. *Rheum Dis Clin North Am*. 1987 Aug;13(2):369-83.

Levine JD, Khasar SG, Green PG. Neurogenic inflammation and arthritis. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Jun;1069:155-67.

Lippton H, Lin B, Gumusel B, Witriol N, Wasserman A, Knight M. Hemopressin, a hemoglobin fragment, dilates the rat systemic vascular bed through release of nitric oxide. *Peptides* 2006; 27:2284-8.

Maggi CA. The mammalian tachykinin receptors. *Gen Pharmacol*. 1995 Sep;26(5):911-44.

Mapp PI, Kidd BL, Gibson SJ, Terry JM, Revell PA, Ibrahim NB, Blake DR, Polak JM. Substance P-, calcitonin gene-related peptide- and C-flanking peptide of neuropeptide Y-

immunoreactive fibres are present in normal synovium but depleted in patients with rheumatoid arthritis. *Neuroscience*. 1990;37(1):143-53.

Mapp PI, Terenghi G, Walsh DA, Chen ST, Cruwys SC, Garrett N, Kidd BL, Polak JM, Blake DR. Monoarthritis in the rat knee induces bilateral and time-dependent changes in substance P and calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the spinal cord. *Neuroscience*. 1993 ;57:1091-6.

Marshall KW, Theriault E, Homonko DA. A single capsaicin injection partially depletes neuropeptides but does not ameliorate inflammation severity in established feline antigen induced arthritis. *J Rheumatol*. 1997 Sep;24(9):1765-8.

Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Fahmi H. Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. *Semin Arthritis Rheum*. 2003 Dec;33(3):155-67.

Matsumoto T, Tsurumoto T, Shindo H. Interleukin-6 levels in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis correlated with the infiltration of inflammatory cells in synovial membrane. *Rheumatol Int*. 2006 Oct;26(12):1096-100.

McDougall JJ, Karimian SM, Ferrell WR. Alteration of substance P-mediated vasodilatation and sympathetic vasoconstriction in the rat knee joint by adjuvant-induced inflammation. *Neurosci Lett*. 1994 Jun 20;174(2):127-9.

McQuenn DS. Inflammatory pain and the joint. In: Brain SD, Moore PK, editors. *Pain and Neurogenic inflammation*. Berlin: Birkhauser Verlag press; 1999. p.137-166.

McVey DC, Vigna SR. The capsaicin VR1 receptor mediates substance P release in toxin A-induced enteritis in rats. *Peptides*. 2001 Sep;22(9):1439-46.

Menetrey D, Besson JM. Electrophysiological characteristics of dorsal horn cells in rats with cutaneous inflammation resulting from chronic arthritis. *Pain*. 1982 Aug;13(4):343-64.

Metz GA, Merkler D, Dietz V, Schwab ME, Fouad K. Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats. *Brain Res*. 2000; 883(2):165-77.

Moisan S, Harvey N, Beaudry G, Forzani P, Burhop KE, Drapeau G, et al. Structural requirements and mechanism of the pressor activity of Leu-Val-Val-hemorphin-7, a fragment of hemoglobin beta-chain in rats. *Peptides* 1998;19:119–31.

Morand EF. Effects of glucocorticoids on inflammation and arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2007 May;19(3):302-7.

Muller-Ladner U, Pap T, Gay RE, Neidhart M, Gay S. Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2005 Dec;1(2):102-10.

Nakagawa H, Hiura A. Capsaicin, transient receptor potential (TRP) protein subfamilies and the particular relationship between capsaicin receptors and small primary sensory neurons. *Anat Sci Int*. 2006 Sep;81(3):135-55.

Neugebauer V, Rümenapp P, Schaible HG. Calcitonin gene-related peptide is involved in the spinal processing of mechanosensory input from the rat's knee joint and in the generation and maintenance of hyperexcitability of dorsal horn-neurons during development of acute inflammation. *Neuroscience*. 1996 ;71:1095-109.

- Neugebauer V, Weiretter F, Schaible HG. Involvement of substance P and neurokinin-1 receptors in the hyperexcitability of dorsal horn neurons during development of acute arthritis in rat's knee joint. *J Neurophysiol.* 1995 73:1574-83.
- Niisalo S, Hukkanen M, Imai S, Törnwall J, Kontinen YT. Neuropeptides in experimental and degenerative arthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 966: 384-399,
- Nissler K, Pohlers D, Hückel M, Simon J, Bräuer R, Kinne RW: Anti-CD4 monoclonal antibody treatment in acute and early chronic antigen-induced arthritis: influence on macrophage activation. *Ann Rheum Dis* 2004, 63:1470-1477.
- O'Connor TM, O'Connel J, O'Brien D I, Goode T, Bredin CP, et al. The role of substance p in inflammatory disease. *J Cell Physiol.* 2004; 201: 167-180.
- O'Dell JR. Methotrexate use in rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 1997;23:779-796.
- 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.* 1986 Feb 19;365(2):235-40.
- Pohlers D, Siegling A, Buchner E, Schmidt-Weber CB, Palombo-Kinne E, Emmrich F, Bräuer R, Kinne RW. Expression of cytokine mRNA and protein in joints and lymphoid organs during the course of rat antigen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(3):R445-57.
- Radhakrishnan R, Moore SA, Sluka KA. Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. *Pain.* 2003; 104(3):567-77.
- Radi ZA, Khan NK. Effects of cyclooxygenase inhibition on the gastrointestinal tract.
- Rawlingson A, Costa SK, Brain SD. Role of Thachykinins in neurogenic inflammation of the skin and other external surfaces. *Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer Verlag, Swiss; 2004. p. 1–569.
- Rioli V, Gozzo FC, Heimann AS, Linardi A, Krieger JE, Shida CS, Almeida PC, Hyslop S, Eberlin MN, Ferro ES. Novel natural peptide substrates for endopeptidase 24.15, neurolysin, and angiotensin-converting enzyme. *J Biol Chem* 2003; 278:8547-55.
- Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, et al. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity.* 1997; 6:315–325.
- Rosenfeld G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancromicos e estudo de diversos fatores. *Mem Inst Butantã.* 1947, 20: 315-28.
- Rosenthale ME. A comparative study of the Lewis and Sprague Dawley rat in adjuvant arthritis. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1970 Nov;188(1):14-22.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N. Animal models of arthritis caused by systemic alteration of the immune system. *Curr Opin Immunol.* 2005;17(6):589-94.
- Sakai K, Matsuno H, Tsuji H, Tohyama M. Substance P receptor gene expression in synovial fluid in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Scan J Rheumatol.* 1998; 27: 135-141.
- Sawynok, J. Topical and peripherally acting analgesics. *Pharmacol Rev.*;55(1):1-20, 2003.

Schaible HG, Del Rosso A, Matucci-Cerinic M. Neurogenic aspects of inflammation. *Rheum Dis Clin North Am*. 2005;31(1):77-101.

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

Schaible, H.G.; Grubb, B.D. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain*. 1993 Oct;55(1):5-54

Schratzberger P, Reinisch N, Prodinger WM, Kahler CM, Sitte BA, Bellmann R, et al. Differential chemotactic activities of sensory neuropeptides for human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol*. 1997; 158(8): 3895-3901.

Scott DL, Shipley M, Dawson A, Edwards S, Symmons DP, Woolf AD. The clinical management of rheumatoid arthritis and osteoarthritis: strategies for improving clinical effectiveness. *Br J Rheumatol*. 1998;37(5):546-54.

Scivo R, Di Franco M, Spadaro A, Valesini G. The immunology of rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Jun;1108:312-22. Review.

Sculco TP. The knee joint in rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 1998 Feb;24(1):143-56.

Seng GF, Benensohn J, Bayer BM. Changes in T and B lymphocyte proliferative responses in adjuvant-arthritic rats: antagonism by indomethacin. 1990; *Eur J Pharmacol* 178:267–273.

Senna ER, De Barros AL, Silva EO, Costa IF, Pereira LV, Ciconelli RM, Ferraz MB. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. *J Rheumatol*. 2004 Mar;31(3):594-7.

Seymour RM, Henderson B. Pro-inflammatory--anti-inflammatory cytokine dynamics mediated by cytokine-receptor dynamics in monocytes. *IMA J Math Appl Med Biol*. 2001 Jun;18(2):159-92.

Silman AJ, Pearson JE. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*. 2002; 4 Suppl 3:S265-72.

Slemmon JR, Wengenack TM, Flood DG. Profiling of endogenous peptides as a tool for studying development and neurological disease. *Biopolymers*. 1997; 43(2):157-70.

Sluka KA, Westlund KN. Behavioral and immunohistochemical changes in an experimental arthritis model in rats. *Pain*. 1993 Dec;55(3):367-77.

Spektor G, Fuster V. Drug insight: cyclo-oxygenase 2 inhibitors and cardiovascular risk--where are we now? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2005 Jun;2(6):290-300.

Spindler A, Bellomio V, Berman A, Lucero E, Baigorria M, Paz S, et al. Prevalence of rheumatoid arthritis in Tucumán, Argentina. *J Rheumatol*. 2002 Jun;29(6):1166-70.

Sweeney SE, Firestein GS. Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Mar;36(3):372-8.

Swierkot J, Szechinsk J. Methotrexate in rheumatoid arthritis *Pharmacol Rep* 2006; 58:473-92.

Szekanecz Z, Koch AE. Update on synovitis. *Curr Rheumatol Rep*. 2001 Feb;3(1):53-63.

Theriault E, Marshall KW, Homonko DA. Maintained peptidergic innervation of the knee joint in an animal model of antigen-induced arthritis. *Regul Pept.* 1993 Jul 2;46(1-2):204-7.

Todorovic V, Janic B, Koko V, Micev M, Nikolic JA, Ratkovic M, Leposavic G, Jankovic T, Knezevic-Usaj S, Milicevic Z. Colonic vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in ulcerative colitis--a radioimmunoassay and immunohistochemical study. *Hepatogastroenterology.* 1996 May-Jun;43(9):483-8.

Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron.* 1998 Sep;21(3):531-43.

Tonelli L, Webster JI, Rapp KL, Sternberg E. Neuroendocrine responses regulating susceptibility and resistance to autoimmune/inflammatory disease in inbred rat strains. *Immunol Rev.* 2001 Dec;184:203-11.

Toussiot E, Wendling D. The use of TNF-alpha blocking agents in rheumatoid arthritis: an update. *Expert Opin Pharmacother.* 2007 Sep;8(13):2089-107.

Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature.* 2002; 420: 853-859.

Turini ME, DuBois RN. Cyclooxygenase-2: A therapeutic target. *Annu Rev Med.* 2002; 53:35-57.

Ulfgren AK, Gröndal L, Lindblad S, Khademi M, Johnell O, Klareskog L, Andersson U. Interindividual and intra-articular variation of proinflammatory cytokines in patients with rheumatoid arthritis: potential implications for treatment. *Ann Rheum Dis.* 2000 Jun;59(6):439-47.

Van de Loo AAJ, Arntz OJ, Bakker AC, van Lent PLEM, Jacobs MJM, van den Berg WB. Role of interleukin-1 in antigen-induced exacerbations of murine arthritis. *Am J Pathol.* 1995;146:239-249.

van den Berg WB, Joosten LA, Kollias G & van de Loo FA. Role of tumour necrosis factor alpha in experimental arthritis: separate activity of interleukin 1beta in chronicity and cartilage destruction. *Ann Rheum Dis* 1999; 58(sup 1): 140-48.

van den Berg WB. Animal models of arthritis. What have we learned? *J Rheumatol Suppl.* 2005 Jan;72:7-9.

van den Berg WB. Anti-cytokine therapy in chronic destructive arthritis. *Arthritis Res.* 2001; 3(1): 18-26.

van den Berg WB. Arguments for interleukin 1 as a target in chronic arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2000 Nov; 59 (Suppl 1):i81-4.

Van Lent PL, Van De Loo FA, Holthuysen AE, Van Den Bersselaar LA, Vermeer H, Van Den Berg WB. Major role for interleukin 1 but not for tumor necrosis factor in early cartilage damage in immune complex arthritis in mice. *J Rheumatol.* 1995 Dec;22(12):2250-8.

Vandenbroucke JP, Hazevoet HM, Cats A. Survival and death in rheumatoid arthritis: a 25 year prospective follow up. *J Rheumatol* 1984; 11: 158±161.

Vane JR. 1971. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol.* 1971 Jun 23;231(25):232-5

von Banchet GS, Petrow PK, Bräuer R, Schaible HG. Monoarticular antigen-induced arthritis leads to pronounced bilateral upregulation of the expression of neurokinin 1 and bradykinin 2 receptors in dorsal root ganglion neurons of rats. *Arthritis Res.* 2000; 2(5):424-7.

Walsh NC, Crotti TN, Goldring SR, Gravalles EM. Rheumatic diseases: the effects of inflammation on bone. *Immunol Rev.* 2005; 208:228-51.

Watanabe N, Horie S, Michael GJ, Keir S, Spina D, Page CP, Priestley JV. Immunohistochemical co-localization of transient receptor potential vanilloid (TRPV)1 and sensory neuropeptides in the guinea-pig respiratory system. *Neuroscience.* 2006 Sep 1;141(3):1533-43.

Watanabe T, Kubota Y, Muto T. Substance P containing nerve fibers in rectal mucosa of ulcerative colitis. *Dis Colon Rectum.* 1997;40:718–72.

Weinberg JB. Nitric oxide synthase 2 and cyclooxygenase 2 interactions in inflammation. *Immunol Res.* 2000;22(2-3):319-41.

Wooley PH, Whalen JD, Chapman DL, Berger AE, Richard RA, Aspar DG, Staite ND. The effect of IL-1ra protein on type II collagen-induced arthritis and antigen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum.* 1993;36:1305–1314.

Yamaki K, Uchida H, Harada Y, Yanagisawa R, Takano H, Hayashi H, Mori Y, Yoshino S. J. Effect of the nonsteroidal anti-inflammatory drug indomethacin on Th1 and Th2 immune responses in mice. *Pharm Sci.* 2003; 92(8):1723-9.

Yukhananov RY, Glamtsa EL, Nyberg F. Interaction of hemorphins with opioid receptors in the rat vas deferens and guinea-pig ileum. *Regul Pept* 1994;(Suppl. 1):S239–42.

Zeidler HK, Kvien TK, Hannonen P, Wollheim FA, Forre O, Geidel H, et al. Progression of joint damage in early active severe rheumatoid arthritis during 18 months of treatment: comparison of low-dose cyclosporin and parenteral gold. *Br J Rheumatol.* 1998; 37(8):874-82.

Zhao Q, Sannier F, Garreau I, Guillochon D, Piot JM. Inhibition and inhibition kinetics of angiotensin converting enzyme activity by hemorphins, isolated from a peptic bovine hemoglobin hydrolysate. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Oct 14;204(1):216-23.

Zhu J, Zou LP, Bakhiet M, Mix E. Resistance and susceptibility to experimental autoimmune neuritis in Sprague-Dawley and Lewis rats correlate with different levels of autoreactive T and B cell responses to myelin antigens. *J Neurosci Res.* 1998 Nov 1;54(3):373-81.